



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

**“DISEÑO DE UN SISTEMA REPORTERO PARA EL  
ESTUDIO DEL PROCESAMIENTO  
POSTRANSCRIPCIONAL EN EL VIRUS DEL  
PAPILOMA HUMANO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

PRESENTA

I.B.Q. JOSE LUIS GONZALEZ MONTOYA

TUTOR: DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ

MÉXICO, D.F.

JULIO 2009





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.

---

**ÍNDICE GENERAL**

ÍNDICE GENERAL.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
RESUMEN.....	0
INTRODUCCIÓN .....	2
1. PROCESAMIENTO DEL RNA Y SUS MODIFICACIONES.....	2
2. ANTECEDENTES SOBRE EL ESTUDIO DEL PROCESAMIENTO .....	7
3. EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) .....	10
4. REGULACIÓN DE LA EXPRESION DE LOS GENES EN VPH16.....	11
5. LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP) Y SUS APLICACIONES. ....	14
6. ANTECEDENTES SOBRE LA GFP Y EL PROCESAMIENTO POR SPLICING .....	16
HIPÓTESIS .....	17
OBJETIVO GENERAL .....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	18
MATERIALES Y METODOS.....	19
Cultivo de Líneas Celulares .....	19
Extracción de DNA y RNA .....	19
PCR de fragmentos de VPH 16 .....	20
Ensayos de restricción. ....	21
Relleno de extremos cohesivos 3' con DNA Polimerasa I (Fragmento Klenow) .....	21
Fosforilación de fragmentos con T4 polinucleótido cinasa.....	22
Ligación de Fragmentos con T4 DNA Ligasa .....	23
Transformación de bacterias DH5α de <i>E.coli</i> competentes. ....	23
Mutagénesis sitio dirigida.....	24
Selección de transformantes. ....	25
Extracción de DNA plasmídico.....	25
Transfección transitoria de plásmidos en líneas celulares.....	26
Transcripción Reversa seguida de PCR (RT-PCR).....	27
Secuenciación .....	27

Características de los plásmidos utilizados. ....	28
Características de las líneas celulares. ....	29
Diseño de oligonucleótidos. ....	29
RESULTADOS.....	31
Caracterización del plásmido pEGFP-C1.....	31
Generación del plásmido pORF-B.....	31
Obtención del plásmido pGFIE6*I. ....	34
Las primeras transfecciones no muestran fluorescencia. ....	34
Procesamiento del intrón en el plásmido pGFIE6*I. ....	34
Secuencia de los cDNAs amplificados por RT-PCR. ....	40
Segunda modificación al plásmido pEGFP-C1 .....	41
Generación del plásmido pGFSO .....	41
Generación del plásmido pGFIE6 .....	41
Modificación al gen LacZ que codifica a la proteína $\beta$ -galactosidasa.....	45
DISCUSIÓN .....	49
PERSPECTIVAS.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Condiciones de reacción para la PCR.....	20
Tabla 2. Condiciones de incubación de enzimas de restricción.....	21
Tabla 3. Condiciones de reacción de la enzima Klenow.....	22
Tabla 4. Condiciones de reacción de Fosforilación con T4 polinucleótido cinasa. ....	23
Tabla 5. Condiciones de ligación con T4 DNA ligasa .....	23
Tabla 6. Condiciones de la reacción de mutagénesis dirigida.....	24
Tabla 7. Condiciones de reacción para secuenciación.....	27
Tabla 8. Características de los plásmidos utilizados. ....	28
Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados.....	30

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Secuencias consenso dentro de los mensajeros procesados por el spliceosoma .. 2

Figura 2. Etapas del procesamiento del pre-mRNA por el spliceosoma..... 4

Figura 3. Diferentes tipos de procesamiento del pre-mRNA ..... 5

Figura 4. Las vías de reconocimiento de intrónes y exónes..... 6

Figura 5. Otras modificaciones durante el procesamiento del pre-mRNA ..... 7

Figura 6. Estructuras "R" de adenovirus ..... 8

Figura 7. Esquema de diferenciación de los genes sexuales en *Drosophila* ..... 9

Figura 8. Organización y expresión de los genes de VPH16..... 11

Figura 9. Procesamiento tardío en VPH 16 ..... 13

Figura 10. Mapa transcriptómico del VPH 16 ..... 13

Figura 11 Estructura de la EGFP y el cromóforo..... 14

Figura 12. Mapa del plásmido pEGFP-C1 ..... 32

Figura 13. Caracterización del plásmido pEGFP-C1..... 32

Figura 15. Localización de los adaptadores sintéticos ..... 33

Figura 14. Modificación y caracterización de los plásmidos pBKLB y pORF-B ..... 33

Figura 16. Obtención del plásmido pGFIE6\*I ..... 35

Figura 17. Secuencia del intrón del plásmido pGFIE6\*I ..... 36

Figura 18. Actividad de GFP en C33A ..... 37

Figura 19 . Actividad de GFP en SiHa..... 37

Figura 20. El intrón es procesado en todas líneas celulares. .... 38

Figura 21. Procesamiento del intrón ..... 40

Figura 22. Sitio donde se realizó la segunda modificación al plásmido pGFP-C1 ..... 42

Figura 23. Generación del plásmido pSKLS ..... 42

Figura 24. Generación del plásmido pEGFSO..... 42

Figura 25. Generación del plásmido pEGFIE6. .... 42

Figura 26. El intrón se remueve y la GFP conserva su fluorescencia ..... 44

Figura 27. Mapa del plásmido pSV-β-galactosidasa..... 46

Figura 28. Generación del plásmido pSVβKS..... 46

Figura 29. Generación del plásmido pSVβSO ..... 46

Figura 30. Generación del plásmido pSVβIE6..... 48

Figura 31. No se pudo obtener una buena modificación a la β-galactosidasa ..... 48

Figura 32. Esquematización del modelo *in vitro* ..... 53

## RESUMEN

Los virus de DNA tumorigénicos utilizan el procesamiento de maduración alternativo (“splicing”) para generar diversos RNAs mensajeros complejos desde la compacta información de sus genomas. Dentro de estos destacan los virus del papiloma humano (HPV), donde el tipo 16 muestra el patrón de procesamiento más complejo con hasta 20 transcritos diferentes identificados que resultan de la maduración alternativa (“alternative splicing”) de sus mensajeros. Los genes E6 y E7 se transcriben desde el mismo promotor (p97) como un solo transcrito bicistrónico y por maduración alternativa produce las isoformas E6\*I, E6\*II y E6^E7. Son estos transcritos los que finalmente dan lugar a las onco-proteínas que se encargan de la transformación maligna.

Con la finalidad de encontrar un buen sistema reportero para estudiar el procesamiento de los intrones en el VPH, en el presente trabajo se modificaron dos reporteros ampliamente utilizados en el laboratorio: la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) de *Aequorea victoria* y la proteína  $\beta$ -galactosidasa (LacZ) de *E.coli*, añadiendo sitios de restricción en su región codificante donde fue clonado el intrón del transcrito E6\*I de VPH16. Estas construcciones fueron transfectadas en 5 líneas celulares diferentes.

Los resultados muestran que aunque en un primer intento no fue posible mantener la fluorescencia en la construcción que contenía el intrón, ensayos de RT-PCR y secuenciación de cDNA demostraron que el sistema era capaz de procesar al mensajero y dar origen al mRNA de GFP procesado. En una segunda ronda la modificación fue exitosa y la fluorescencia pudo retenerse, por lo que se pudo generar un reportero fluorescente donde se pueden estudiar los intrones de VPH. La proteína  $\beta$ -galactosidasa no pudo retener su actividad después de ser modificada en una primera ronda, por lo que será necesario hacer una nueva modificación al gen. Estos reporteros serán una herramienta útil para el estudio del procesamiento de VPH 16 en un modelo de diferenciación in vitro (RAFT cell culture), y potencialmente pueden utilizarse para el estudio de las señales intrónicas de procesamiento en otros modelos celulares.

## ABSTRACT

DNA tumor viruses use alternative splicing to generate complex messages from their compact genomes. Among these, in human papilloma viruses (HPVs), type 16 shows the most complex pattern with 20 different transcripts identified so far, generated by alternative splicing. E6 and e7 genes are transcribed from the same promoter (p97) as a single bicistronic transcript. Isoforms E6\*I, E6\*II and E6<sup>^</sup>E7 are produced by alternative splicing of the same transcript.

To find a good reporter system for studying HPV intron processing, in the present work, genes from two reporter proteins widely used in laboratory were modified: enhanced green fluorescent protein (EGFP) from *Aequorea victoria* and  $\beta$ -galactosidase from *E. coli*. Both reporter were modified by adding restriction sites to their coding region and by cloning intron 1 from e6\*I transcript of HPV16. These constructs were transfected in 5 different cell lines.

Results showed that despite of the lack of fluorescence in the first modification of GFP, the intron was removed from the final transcript. RT-PCR and cDNA sequencing showed the lack of fluorescence was a consequence from the GFP coding region modification and not the lack of intron processing. A second modification to GFP was able to retain fluorescence after intron processing so this reporter could be used to study HPV intron processing.  $\beta$ -galactosidase was unable to retain activity in the first round modification. These reporters will be useful systems to study HPV intron processing in HPV16 and could be used to study intronic processing signals in other cellular systems.

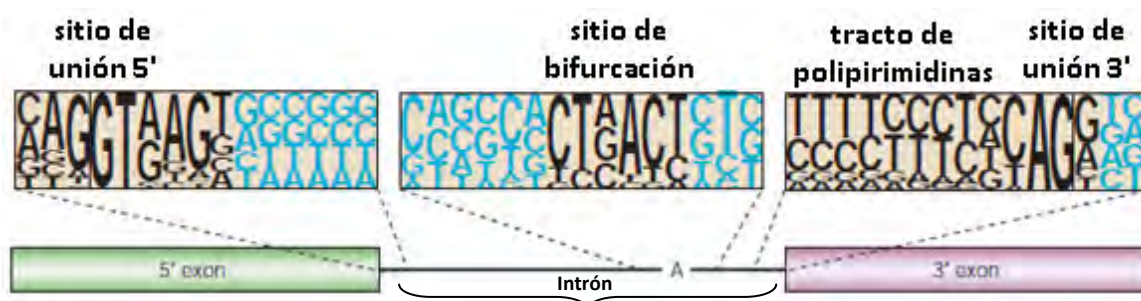


# INTRODUCCIÓN

## 1. PROCESAMIENTO DEL RNA Y SUS MODIFICACIONES.

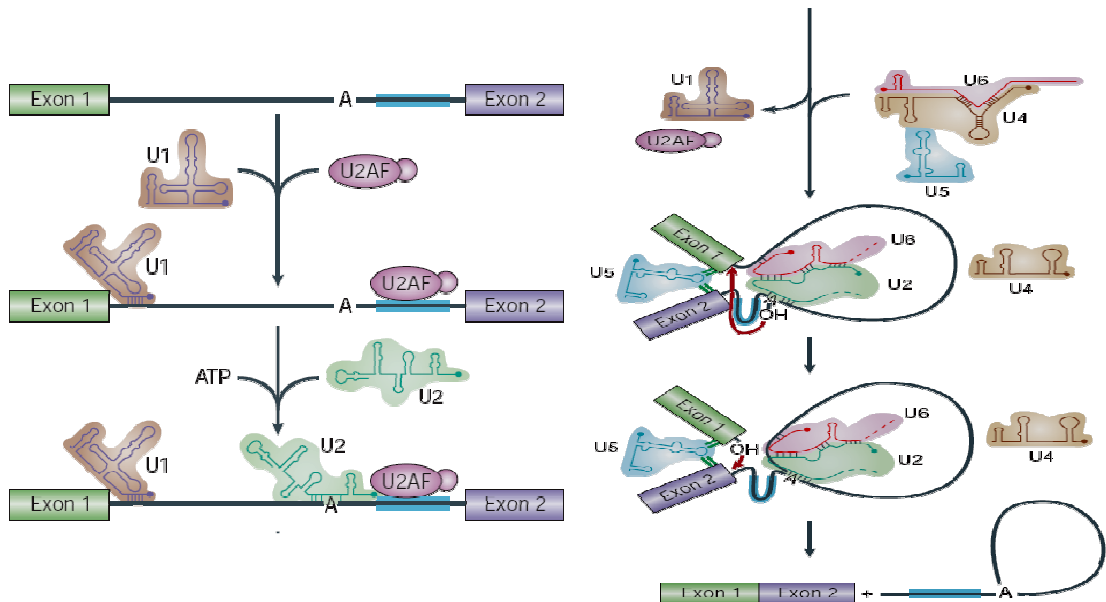
A diferencia de los procariontes, la mayoría de los genes de los eucariontes están constituidos de una parte codificadora (exón) y una parte espaciadora no codificante (intrón). Sin embargo, las secuencias no codificantes deben removerse de la cadena del RNA que se ha transcrito para dar lugar a un mRNA maduro, que será finalmente exportado al citoplasma para su traducción. Esta maduración del mRNA se lleva a cabo mediante un procesamiento de corte y empalme de secuencias (conocido en inglés con el nombre de "splicing"), que asegura que solo las secuencias codificantes formen parte del transcrito maduro que se exportará al citoplasma.

La mayoría de los genes eucariontes lleva a cabo el proceso de maduración mediante un complejo de snRNAs (RNAs pequeños nucleares) y proteínas asociadas, conocidas como snRNPs (partículas ribonucleoprotéicas pequeñas nucleares). Todos estas snRNPs forman un gran complejo que se encarga del procesamiento el cual es conocido como spliceosoma[5, 6]. El spliceosoma reconoce secuencias dentro del pre-mRNA, la mayoría de las cuales están localizadas dentro del intrón. A pesar de que se han identificado secuencias consenso dentro de los sitios de reconocimiento de las snRNPs, así como en los sitios adyacentes, no es posible definir una secuencia única necesaria para el procesamiento por splicing. La especificidad de reconocimiento de las snRNPs, está dada por la complementariedad de bases que se establece entre las que contactan directamente al mRNA (U1, U2, U5 y U6), así como la interacción entre las mismas snRNPs, tal es el caso de U4 que participa en el rearrreglo del complejo durante algún paso de la catálisis[7].



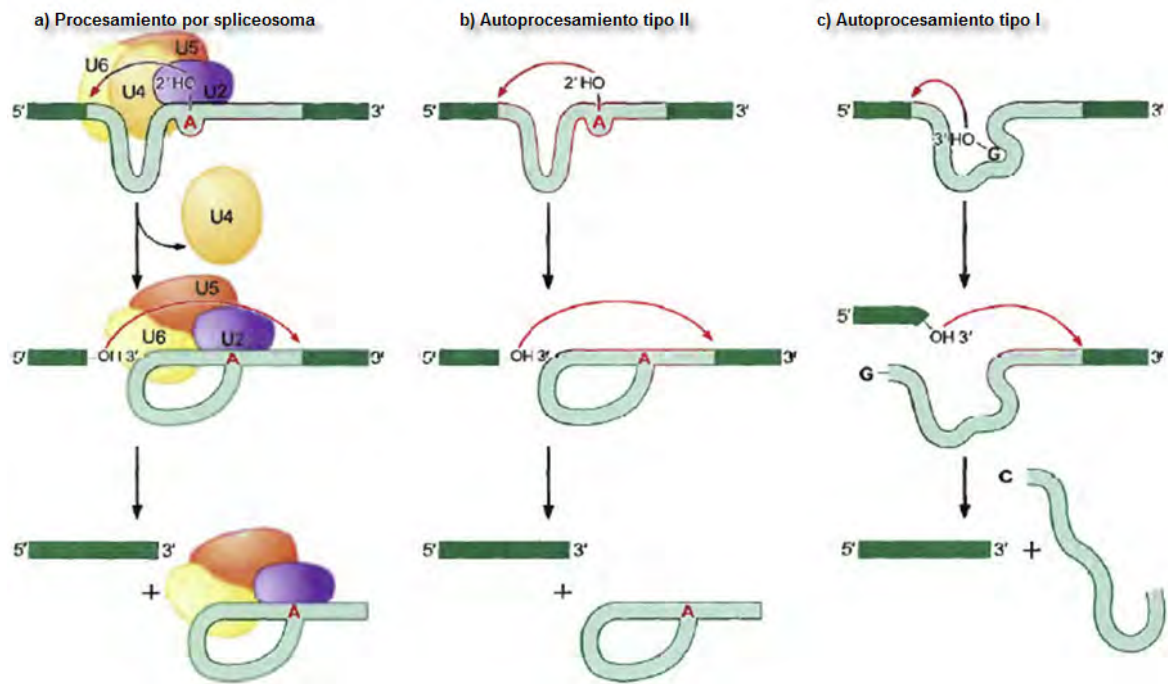
**Figura 1. Secuencias consenso dentro de los mensajeros procesados por el spliceosoma.** En la gráfica se muestran las zonas donde se ubican las secuencias. En color negro se muestran aquellas que interactúan directamente, por complementariedad con las snRNPs, y en azul se muestran las que no interactúan. El tamaño de cada letra es relativa a la ocurrencia encontrada en mamíferos. Tomado de [3].  
Diferentes snRNPs se van ensamblando en el spliceosoma de acuerdo como se va requiriendo a lo largo del procesamiento, que en general se describe a continuación. Primero la snRNPs U1 se une al 5'ss (sitio de splicing 5') y el factor

auxiliar U2ASF se une al tracto de polipirimidinas ubicado hacia el final del intrón, esta unión ayuda a que la proteína BBP (proteína de unión al punto de bifurcación) se una. Otra subunidad de U2ASF (de 35KDa), se une al 3'ss (sitio de splicing 3'). A este arreglo de proteínas y RNA se le denomina complejo temprano (E). Después, U2 mediante la complementariedad de su componente de RNA con la cadena, se une al punto de bifurcación con ayuda de U2ASF, desplazando a BBP. Este nuevo arreglo produce que la complementariedad de bases entre U2 y la hebra de RNA sea tal, que la adenina del punto de bifurcación salga un poco de la cadena, y quede expuesta así para producirse la reacción de transesterificación posterior. A este arreglo se le denomina complejo A. En el siguiente paso, entra al complejo una tripartícula de snRNPs formada por U4, U5 y U6. En esta partícula U4 y U6 se encuentran unidos por complementariedad de bases en sus componentes de RNA, mientras que U5 está unido al complejo con menos fuerza. Después de este ensamblaje el complejo adquiere el nombre de complejo B. Siguiendo, ahora U1, sale del complejo y es remplazada por U6 en el 5'ss, para lo cual la interacción entre la secuencia de U1 se rompe y U6 se une también por complementariedad de secuencia. Al quedar de esta manera ensamblado por completo el complejo, el siguiente paso da inicio a la catálisis. El primer rearrreglo ocurre al salir U4 del complejo, lo que permite que U2 y U6 interactúen mediante sus componentes de RNA dando lugar así además a la formación del sitio catalítico, dicha unión acerca al 5'ss y al sitio de bifurcación, lo que facilita la primer reacción de transesterificación. Donde el 2'OH de la adenina produce un ataque nucleofílico sobre el fosforilo del de la guanina del sitio 5'ss. En la siguiente reacción, U5 ayuda a traer a proximidad a los exones de los sitios 5'ss y 3'ss, que completan la segunda reacción de transesterificación entre el 3'OH formado por la primer reacción y el fosforilo de la guanina del 3'ss. Finalmente se libera el mRNA y las snRNPs, las cuales siguen unidas la estructura en forma de lazo resultante (denominada en inglés "lariat"), formada por la unión entre el punto de bifurcación y el 5'ss recién formado. Al degradarse el RNA que forma el "lariat" las snRNPs son liberadas y recicladas para su nuevo uso[8, 9].



**Figura 2. Etapas del procesamiento del pre-mRNA por el spliceosoma.** Las diferentes snRNPs se van incorporando en diferentes pasos del proceso hasta la formación de una estructura en forma de lazo o "lariat" y la unión de los dos exones. Tomado [3].

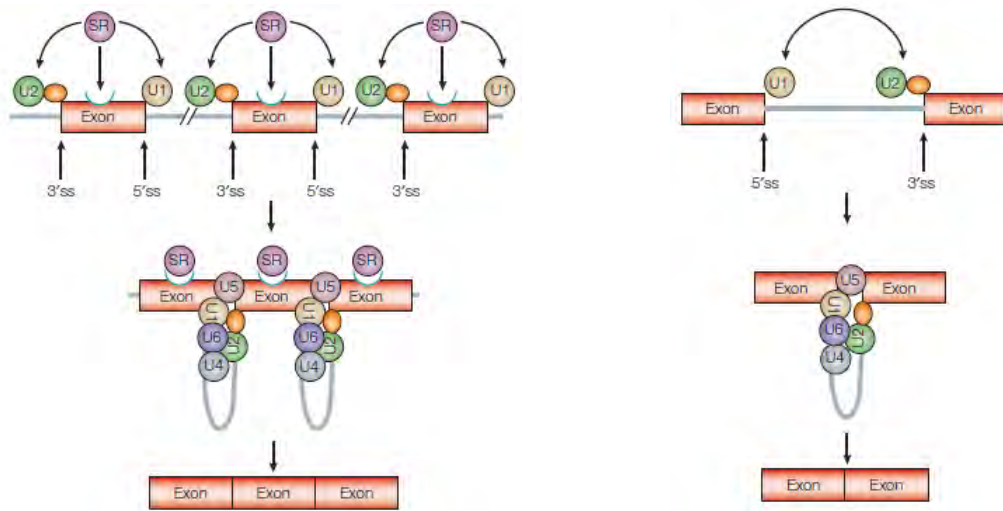
Además del procesamiento del pre-mRNA por el spliceosoma, se conocen otros dos tipos de mecanismos mediante los cuales se remueven los intrones: el procesamiento de tipo I; incluye intrones que son capaces de auto procesarse utilizando guanina (G) en el punto de bifurcación como donador del grupo 2'OH que habrá de atacar el fosfato del 5' del exón, dando paso a la primer reacción de transesterificación. Los intrones del grupo II se autoprocenan de la misma forma que el spliceosoma lleva a cabo su procesamiento, pero no utilizan a las snRNPs para llevarlo a cabo[10]. De hecho, se considera que este tipo de procesamiento puede ser el antecesor evolutivo del procesamiento del pre-mRNA como se conoce ahora[2].



**Figura 3. Diferentes tipos de procesamiento del pre-mRNA.** a) Los intrones que se procesan por el spliceosoma utilizan a las snRNPs descritas para unir a las secuencias codificantes. b) Los intrones del tipo II son el precursor evolutivo del spliceosoma ya que son capaces de unir las secuencias codificantes sin necesitar el complejo de snRNPs. c) Los intrones del tipo I utilizan guanidina (G) en el sitio de bifurcación y también son capaces de autoprocésarse sin necesitar a las snRNPs. Modificado de *Molecular Biology of the Gene, Fifth Edition*[1].

Un gen humano promedio tiene 28,000 nucleótidos y está conformado de 8.8 exones, donde cada exón está formado en promedio de ~120 nucleótidos. A pesar, de que estas secuencias exónicas pequeñas se encuentran dentro de grandes regiones intrónicas, la maquinaria del spliceosoma debe ser capaz de reconocerlas y eliminar los intrones para poder generar a los mensajeros maduros[11].

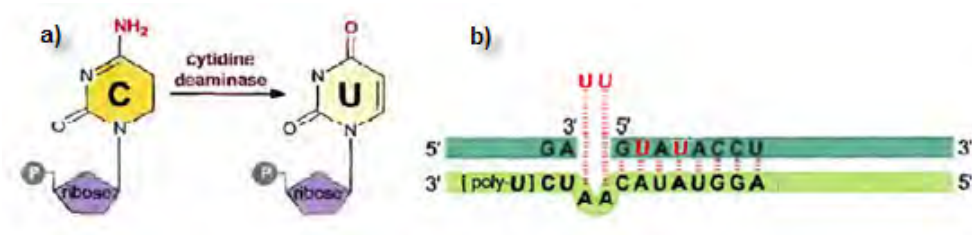
Para explicar este reconocimiento de las secuencias que serán removidas o reconocidas como intrones, y aquellas que serán reconocidas como exones, se han desarrollado principalmente 2 conceptos. La definición del exón (**conocido en inglés como "exon definition", ED**) propone que son las secuencias contenidas dentro del exón principalmente los ESEs (Exonic splicing enhancers) que unen a proteínas SR, las cuales ayudan al ensamblaje de la maquinaria de procesamiento y reclutan a las snRNPs a los intrones cercanos para que estos sea removidos y los exones puedan unirse[12]. La definición de intrón (**conocido en inglés como "intron definition", ID**) por otro lado, propone que son como tal secuencias contenidas en el intrón (el sitio de bifurcación, el tracto de polipirimidinas y los sitios de unión 3' y 5') los que son directamente reconocidas por la maquinaria para su procesamiento y exclusión del mRNA maduro final[13].



**Figura 4. Las vías de reconocimiento de intrónes y exónes.** Del lado izquierdo, se esquematiza la definición de exón (ED) que propone son las secuencias del exón las que permiten que sea reconocido y diferenciado de los exónes. En el lado derecho, se muestra la definición de intrón (ID) que propone son las secuencias del intrón las que permiten que el intrón sea reconocido y removido del mRNA sin tomar en cuenta al exón. Tomado de [2]

Ambos conceptos no son mutuamente excluyentes y en ambos casos son necesarias secuencias que unen a proteínas que funcionan como represoras o activadoras de dichos sitios. Se ha establecido también que el proceso de ED se encuentra de manera más común en los eucariontes superiores como los mamíferos, mientras que el proceso de ID es más común en eucariontes unicelulares como las levaduras cuyos genes contienen pocos intrónes.

Además de este procesamiento, otras modificaciones en que el mRNA modifican la expresión de los genes. Las más conocidas son las desaminaciones sitio-específicas. Esta se lleva a cabo por la citidin desaminasa, que convierte la citosina en uracilo, alterando la secuencia de mRNA produciendo cambios de fase o codones de paro dentro de la secuencia del mensajero. La otra modificación por desaminación es la generada por la ADAR (desaminasa de adenosina que actúa sobre el RNA), que convierte la adenosina en inosina. La inosina puede unirse al uracilo formando puente de hidrógeno, así que esta modificación puede llevar al mal reconocimiento de un tRNA en la traducción del mensajero[14].



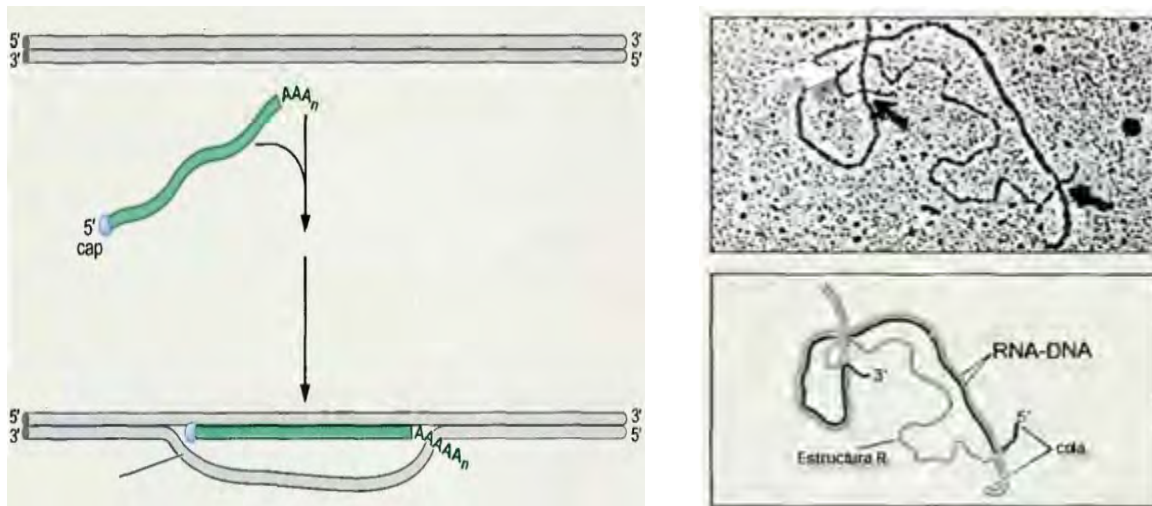
**Figura 5. Otras modificaciones durante el procesamiento del pre-mRNA.** a) La desaminación sitio específica altera también la secuencia del RNA, modificando su traducción. b) Los gRNAs (RNAs guía) modifican la secuencia insertando uracilos entre el transcrito modificando el marco de lectura de la proteína. Modificado [1].

## 2. ANTECEDENTES SOBRE EL ESTUDIO DEL PROCESAMIENTO

Los primeros estudios en bacterias y fagos, llevaron a la observación de que los mRNAs que se transcribían eran una copia exacta de la molécula de DNA de donde se originaban. Fue en 1977 cuando por primera vez se observó que existían mRNAs eucariontes a los cuales carecían de una parte del DNA de donde se originaron, a estos genes se les denominó "Split genes" o genes segmentados debido a la diferencia que marcaban con respecto a lo que hasta ese momento se conocía.

Los estudios se realizaron en adenovirus por Roberts y Sharp[15]. Lo que hicieron fue incubar mRNA de adenovirus con un segmento obtenido por restricción del genoma de adenovirus, y al hacerlo el mRNA alinea con su complemento dentro de una de las hebras del DNA desplazando a la otra. Esto generaba una estructura que al verse en el microscopio electrónico tenía forma de una "R", por lo que se le denominó "estructura circular R". Mucho se aprendió de estos experimentos sobre la organización de los mRNAs eucariontes, pero lo más importante fue la conclusión de que en la secuencia del DNA del adenovirus existen algunas secuencias que no se alineaban con secuencias complementarias del mRNA, lo que hacía suponer que dichas secuencias debían perderse y al verlos en formas de estructuras "R" [1].

Los siguientes experimentos que marcaron una gran diferencia en el estudio del procesamiento fueron los realizados en la mosca *D. melanogaster*[16]. Estos sentaron las bases en el estudio de lo ahora se conoce como maduración alternativa (alternative splicing) y que es uno de los procesos de regulación postranscripcional más importantes ya que en parte contribuye a la diferenciación celular y la generación de muchas isoformas de proteínas que tienen diferentes actividades biológicas dentro de los diferentes tipos celulares.

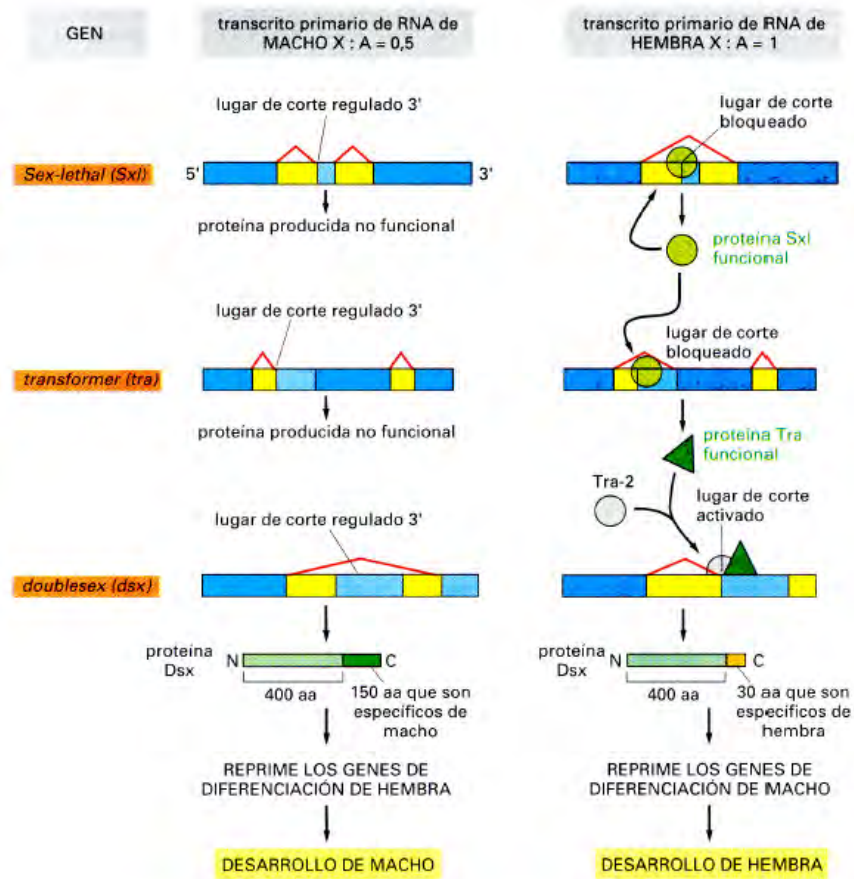


**Figura 6. Estructuras “R” de adenovirus.** Se muestra del lado izquierdo la esquematización de la formación de una estructura R cuando se incuba RNA con la cola de poli A, junto con un fragmento de DNA obtenido por restricción de adenovirus. La hebra no complementaria se desplaza y se forma la estructura. En el lado derecho se muestra la micrografía electrónica de transmisión (superior) de uno de los experimentos donde se vieron las estructuras, y la esquematización gráfica (inferior) de los diferentes sitios del mRNA que hibridan con el DNA. Las flechas negras muestran el inicio y el fin, la flecha blanca muestra el lugar donde que no se encuentra en el DNA (intrón). Tomado de [1]

En estos estudios se pudo demostrar que el proceso de diferenciación sexual en la mosca dependía de una serie de eventos de maduración alternativa regulados. En los machos, cuyo cociente cromosómico X/autosoma es de 0.5, el primer transcrito de la vía que produce a *Sex-lethal* (SXL) es procesado para producir una versión no funcional de la proteína. Esto permite que el siguiente transcrito, llamado *transformer* (TRA) también sea procesado para producir de la misma forma una versión no funcional de la proteína. La falta de TRA permite a su vez la producción de una isoforma de la proteína *doublesex* (DSX), que reprime la diferenciación de los genes femeninos, por lo que la mosca se desarrolla como macho. En las hembras por el otro lado, cuyo cociente cromosómico X/autosoma es de 1, la proteína SXL es producida de manera funcional. Esto debido a que la misma proteína funciona como represor al unirse al sitio de polipirimidinas de su transcrito para bloquear el procesamiento alternativo del transcrito. Así mismo la proteína SXL funciona como represora en el transcrito *tra*, bloqueando de la misma forma un sitio de maduración 3', permitiendo así la formación de la versión funcional de la proteína TRA. La proteína TRA funcional actúa con la proteína constitutiva TRA-2 para ambas funcionar como activadores permitiendo el reconocimiento de un sitio de maduración sobre el transcrito *dsx* que no era reconocido antes. Esto da como resultado una isoforma de la proteína DSX que reprime la diferenciación de los genes masculinos y por ello las moscas se desarrollan como hembra. El esquema inferior muestra los diferentes pasos que siguen los genes en *Drosophila* para la

diferenciación sexual. Este sistema es el mejor ejemplo que describe como la maduración de los transcritos puede darse de manera alternativa y que esto tiene una relación directa con el tipo celular.

Además pone de manifiesto la existencia de factores protéicos promotores o represores del procesamiento de maduración alternativa.



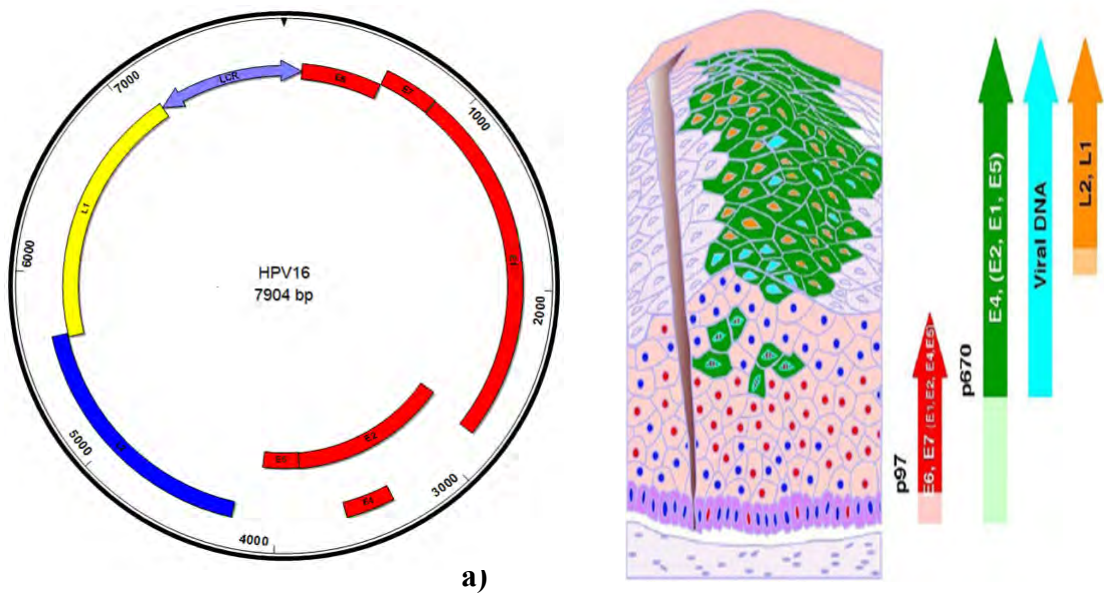
**Figura 7. Esquema de diferenciación de los genes sexuales en *Drosophila*.** En los machos mediante una serie de transcritos procesados alternativamente se producen versiones no funcionales de las proteínas que llevan a la represión de los genes de diferenciación de la hembra. En las hembras son producidas las versiones funcionales, las cuales actúan como represores y como activadores de otros sitios de procesamiento lo que genera la represión final de los genes de diferenciación de macho. Tomado de [17]

### 3. EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

El Virus del papiloma humano (VPH) es considerado como el agente necesario para el desarrollo del cáncer cérvico uterino. Hasta la fecha se han encontrado más de 200 tipos diferentes de VPHs y se han secuenciado de manera completa casi 100, de los cuales los pertenecientes a la especie  $\alpha$  son considerados



carcinogénicos. El más importante de este grupo es el VHP16, que se ha encontrado asociado a más del 50% de los casos de cáncer cérvico uterino[18]. El VPH infecta a los queratinocitos localizados en la capa basal del epitelio escamoso estratificado, se replica y ensambla en el núcleo de las células basales, pero su ciclo viral está determinado de una manera muy particular por el proceso de diferenciación del queratinocito[19]. El proceso de diferenciación lleva a la expresión de 6 genes considerados como tempranos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) expresados en queratinocitos indiferenciados o intermediamente diferenciados; y dos genes tardíos que se expresan en queratinocitos que se encuentran en diferenciación terminal (L1 y L2). E4 continúa expresándose en queratinocitos que se encuentran en diferenciación terminal. E1 y E2 están involucrados en la replicación del DNA viral y en la regulación de la transcripción de genes tempranos y tardíos[20]. E4 se expresa en etapas de infección productivas asociada al rompimiento de los filamentos del citoesqueleto lo que se cree ayuda a la liberación de viriones en la fase productiva del virus[21]. E6 y E7 son oncogenes virales involucrados en la degradación de supresores de tumores celulares como pRB y p53, induciendo la inmortalización y transformación celular. L1 y L2 son las encargadas del ensamblaje de la cápside viral, coincidiendo con la fase productiva del virus.



**Figura 8. Organización y expresión de los genes de VPH16.** a) Mapa del genoma de VPH 16, en rojo se muestran los genes tempranos dentro de los cuales se encuentran los oncogenes E6 y E7, y en azul y amarillo los genes tardíos que codifican para las proteínas de la cápside. b) La expresión de los genes depende del grado de diferenciación de las células en el epitelio estratificado en un proceso altamente regulado a nivel transcripcional, se muestra el momento en el que se encenderían los promotores p97 (temprano) y p670 (tardío) desde los cuales se transcriben los genes.

#### 4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES EN VPH16

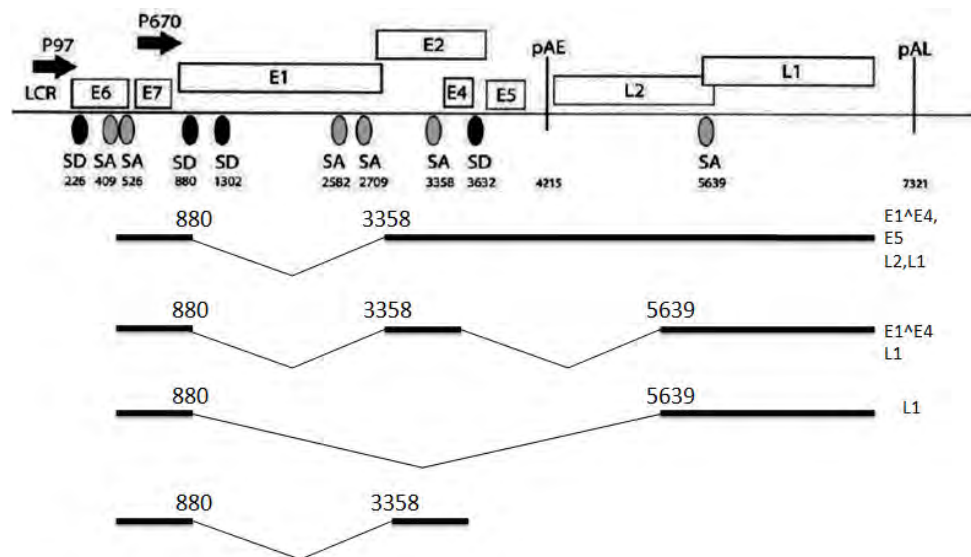
Las proteínas L1 y L2 que forman la cápside viral son los principales productos de la expresión de los genes tardíos. La cápside se forma con 72 pentámeros capsoméricos de 360 proteínas L1 (proteína mayor de la cápside) y 12 proteínas L2 (proteína menor de la cápside). L1 es una proteína de ~55KDa, capaz de unirse a 3 tipos diferentes de receptores: La integrina  $\alpha 6\beta 4$ , el heparan sulfato y otros glicosaminoglicanos. De estos, la integrina  $\alpha 6\beta 4$  se ha considerado el receptor putativo y responsable de la internalización de los viriones, llevando a cabo dicha internalización por endocitosis mediada por clatrina y claveolina[22]. El heparan sulfato, que es componente de la matriz extracelular en forma de proteoglicano, se puede considerar el receptor primario ya que es el primero al que se unen los viriones y es el que concentra los viriones colocándolos en el lugar apropiado para que la integrina  $\alpha 6\beta 4$  pueda internalizarlos[23]. L1 tiene la capacidad de autoensamblarse para formar cápsides. L2 es una proteína de ~72KDa que se ha propuesto es necesaria para la eficiencia de encapsidación y para la unión del genoma de VPH a la cápside. Además la proteína L2 interacciona con la  $\beta$ -actina citoplásmica del huésped para transportar de manera eficiente el virus al núcleo[24].

La transcripción de los genes tardíos en VPH 16 se lleva a cabo desde el promotor P670 localizado en el ORF (Open Reading Frame o *Marco de Lectura Abierto*) del gen temprano E7, cuya activación depende de varios factores celulares que solo están presentes en las células de las capas más diferenciadas del epitelio[25]. En contraparte la transcripción de los genes tempranos se lleva a cabo en el promotor P97[25]. Tanto los transcritos tardíos como los tempranos deben poliadenilarse para poder producir mRNAs maduros que puedan ser exportados al citoplasma y eficientemente traducidos. Se han caracterizado dos zonas de poliadenilación una para los transcritos tempranos conocida como pAE, localizada río arriba del ORF de L2 (nt 4215), y otra para los transcritos tardíos conocida como pAL localizada dentro de la región 3' UTR del genoma de VPH (nt 7321), al terminar el codón de paro de L1, antes del inicio de la LCR. La poliadenilación es uno de los factores clave en el cambio de expresión de transcritos tempranos a tardíos y además es un proceso íntimamente ligado al procesamiento [24].

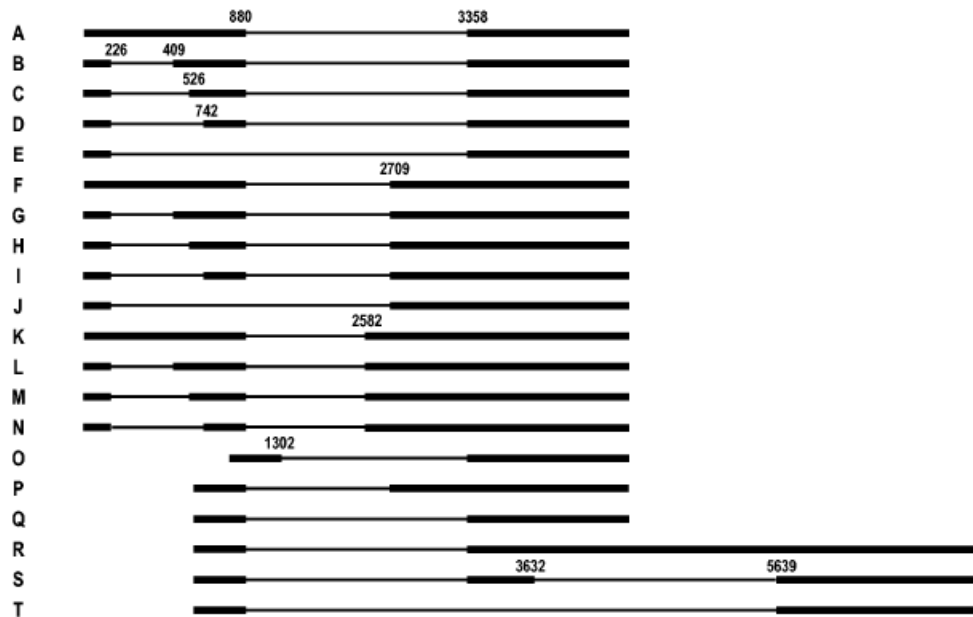
Se encontró que seis motivos GGG consecutivos de unión a la hnRNP H, están fuertemente relacionados con este cambio de expresión ya que se encuentran 174 nt río abajo de la pAE y esta ribonucleoproteína está involucrada en el

reclutamiento de la maquinaria de poliadenilación. Además, se encontró que en la capa basal del epitelio la hnRNP H se encuentra altamente expresada mientras que en las capas superiores su expresión se va perdiendo [26]. Se han encontrado además ESSs (Exonic splicing Silencers), mapeados en los primeros 517 nucleótidos de L1 que contienen motivos de unión a hnRNP A1, la cual impide el posicionamiento de la maquinaria basal de procesamiento y por lo tanto la utilización del sitio de procesamiento 3' en L1 (nt 5639). Esta ribonucleoproteína está involucrada en la regulación del procesamiento de genes tardíos regulando el nivel del mRNA de L1 y del *idem*, además de permitir con su apagamiento el uso del 3'ss dando lugar a los genes tardíos [27].

Se ha caracterizado además otros sitios importantes en la regulación del procesamiento en la zona temprana, particularmente dentro del ORF de E4 se ha caracterizado un ESE (Exonic splicing Enhancer) que promueve el ensamblamiento de la maquinaria de procesamiento en este sitio y la utilización de un 5'ss dentro del ORF de E4 [28]. Es la pérdida de este sitio al llevarse a cabo la integración del genoma viral al genoma celular, uno de los mecanismos que pueden promover la producción de transcritos tardíos al sobrepasar el sitio de poliadenilación temprana y favorecer la utilización del sitio de poliadenilación tardía [28].



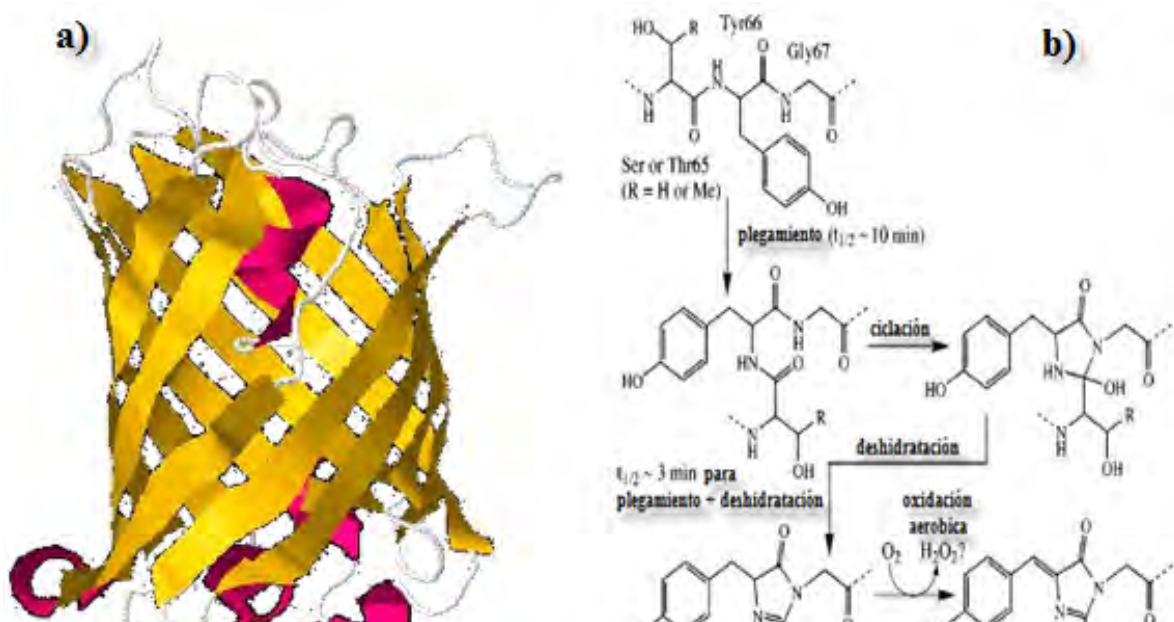
**Figura 9. Procesamiento tardío en VPH 16.** Los transcritos tardíos generados muestran claramente que el sitio 880 es el sitio donador más fuerte en el procesamiento de los transcritos tardíos[29]. Se muestran los sitios donadores (SD) y sitios aceptores (SA) caracterizados en el genoma del VPH 16, además de las zonas de poliadenilación temprana (pAE) y tardía (pAL) utilizadas para el procesamiento de cada tipo de transcritos. A la derecha de cada transcrito se muestra el potencial codificante. El último transcrito SD 880-SA 3358, es un potencial transcrito truncado que se poliadenila en la pAE y genera un transcritor pequeño sin función biológica aparente.



**Figura 10. Mapa transcriptómico del VPH 16.** Se muestran los diferentes transcritos policistrónicos que dan origen a las proteínas virales. Los transcritos de la A a la N, se transcriben mayormente desde el promotor p97, y se consideran tempranos. Los transcritos de la O a la T, se transcriben desde el promotor p670 inducible por diferenciación, localizado dentro de E7 y éstos se consideran como tardíos. Los números indican el nucleótido que se ha reconocido como donador o aceptor dentro del procesamiento de los transcritos. Tomado de [24]

## 5. LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP) Y SUS APLICACIONES.

La proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) fue descubierta y aislada por primera vez de la medusa *Aequorea victoria* en los laboratorios Friday Harbor en Washington, USA por el científico Osamu Shimomura y sus colaboradores en 1962 [30]. La proteína fue descubierta al estudiar otra proteína quimioluminiscente de unión a iones  $Ca^{2+}$  de nombre aequorina, llamada así por el organismo de donde se extraía. Desde entonces se han descubierto otras proteínas bioluminiscentes de propiedades importantes como



**Figura 11 Estructura de la EGFP y el cromóforo.** a) La estructura cristalográfica de la EGFP (PDB ID: 1S6Z), donde se muestra el barril de hojas  $\beta$  y las hélices  $\alpha$  que entran al cromóforo. b) Mecanismo de reacción propuesto por *cubitt et al*[4] para la formación del cromóforo a partir de la Treonina 65, Tirocina 66 y Glicina 67 de la GFP.

la GFP de los celenterados *Obelia* y *Renilla reniformis*, pero sólo la GFP de *Aequorea* y últimamente la GFP de *Renilla* han sido utilizadas en el estudio de la biología molecular y celular. El cromóforo de la proteína es 4-hidroxibencilideno-imidazolina-5-ona, y se forma con los residuos 65,66 y 67 (Ser-Tyr-Gly) de la proteína. La reacción comienza con el ataque nucleofílico de la amida de la glicina 67, sobre el carbonilo de la Serina 65 lo que permite su ciclación. Seguido se produce una deshidratación para finalmente dar paso a una oxidación en la que el oxígeno molecular sustrae el hidrógeno del enlace C $\alpha$ -C $\beta$  del de la Tirosina 66, conjugando el anillo fenólico con la imidazolinona. Es hasta después de esto que el cromóforo adquiere absorbancia y es capaz de fluorescer [4]. El avance mayor en su estudio llegó cuando se pudo clonar el gen en 1992 y después se demostró que la proteína era capaz de sintetizarse *in vitro*, y que además podía producirse en otros organismos. Con lo que se concluyó que era funcional y podía generar fluorescencia sin necesidad de ninguna otra enzima específica de la medusa.

Después de resolver la estructura terciaria de la proteína se pudo observar que estaba compuesta de 11 hojas  $\beta$ , con una  $\alpha$ -hélice que las une en uno de los ejes superiores; al final de esta hélice se encuentra el cromóforo, enterrado en entre el barril de hojas  $\beta$ . Esto hace que el cromóforo quede protegido en un centro altamente hidrofóbico que permite que siga fluoresciendo [31]. Se han caracterizado diferentes mutaciones sobre la proteína que le permiten tener características particulares, la más documentada es el cambio de la Serina 65 por una Treonina, lo que permite un cambio en el máximo de emisión de la proteína pasando de 504 nm a 507 nm. Otras mutaciones cerca de la zona del cromóforo como de la Fenilalanina 64 por Leucina, ha permitido que la proteína pueda plegarse de manera correcta y madurar el cromóforo a 37°C, aún cuando la temperatura óptima de la proteína original estaba por debajo de este valor, ya que en su ambiente la medusa vive en temperaturas debajo de los 20°C. Además de este par de mutaciones, se han optimizado todos los codones de la proteína original para adaptar a las preferencias de uso de células de mamífero. Se han hecho además otras modificaciones que permiten mejorar la expresión en estos sistemas, tales como la inserción de un IRES antes del codón de inicio de la proteína, conocido como secuencia de Kozak, y la inserción de la señal de poliadenilación del virus SV40 al final del marco de lectura. A esta versión modificada de la proteína se le conoce con el nombre de EGFP y es la que se utilizó en el presente trabajo. Otra propiedad importante de la proteína es su tendencia dimerizarse, lo que bajo ciertas circunstancias puede causar que la

agregación molecular impida al cromóforo ionizarse y por lo tanto inhiba su fluorescencia. En cuanto al pH se sabe que la proteína pierde su absorbancia a pH superior a 11, y es también apagada a pH ácido, siendo el caso de la EGFP, que se ha visto disminuida su fluorescencia hasta en un 50% a pH inferior a 5.5.

## **6. ANTECEDENTES SOBRE LA GFP Y EL PROCESAMIENTO POR SPLICING**

Se ha descrito ya un sistema donde se ha utilizado a la GFP como reportero relacionado con el procesamiento por splicing.

Este fue descrito por Morin et al. en 2001 [32]. Lo que se hizo en este modelo estudiado en *Drosophila melanogaster*, fue construir un mini exón reportero, uniendo sitios donadores (SD) y sitios aceptores (SA) de procesamiento por splicing, a la secuencia original de la GFP. Además colocaron éste mini exón dentro de un elemento transponible (P element), con la intención de que una vez que el elemento P tuviera actividad y se transpusiera en diversos sitios dentro del genoma, pudieran mapear los genes de fusión que se generan al incluir un exón en su marco que ahora contiene a la GFP. Una de las principales aportaciones de su modelo fue observar que efectivamente se pueden generar proteínas de fusión que contengan un exón que exprese la GFP. Sin embargo, el procesamiento detectado no fue general, los mensajeros procesados eran mayormente de proteínas multiméricas pertenecientes a la matriz extracelular y citoesqueleto, o proteínas que forman algún tipo de fibra en la célula. Por lo que su uso está restringido al estudio de este tipo de proteínas.

### **HIPÓTESIS**

Los intrónes del Virus del Papiloma Humano 16 son capaces de definir su procesamiento.

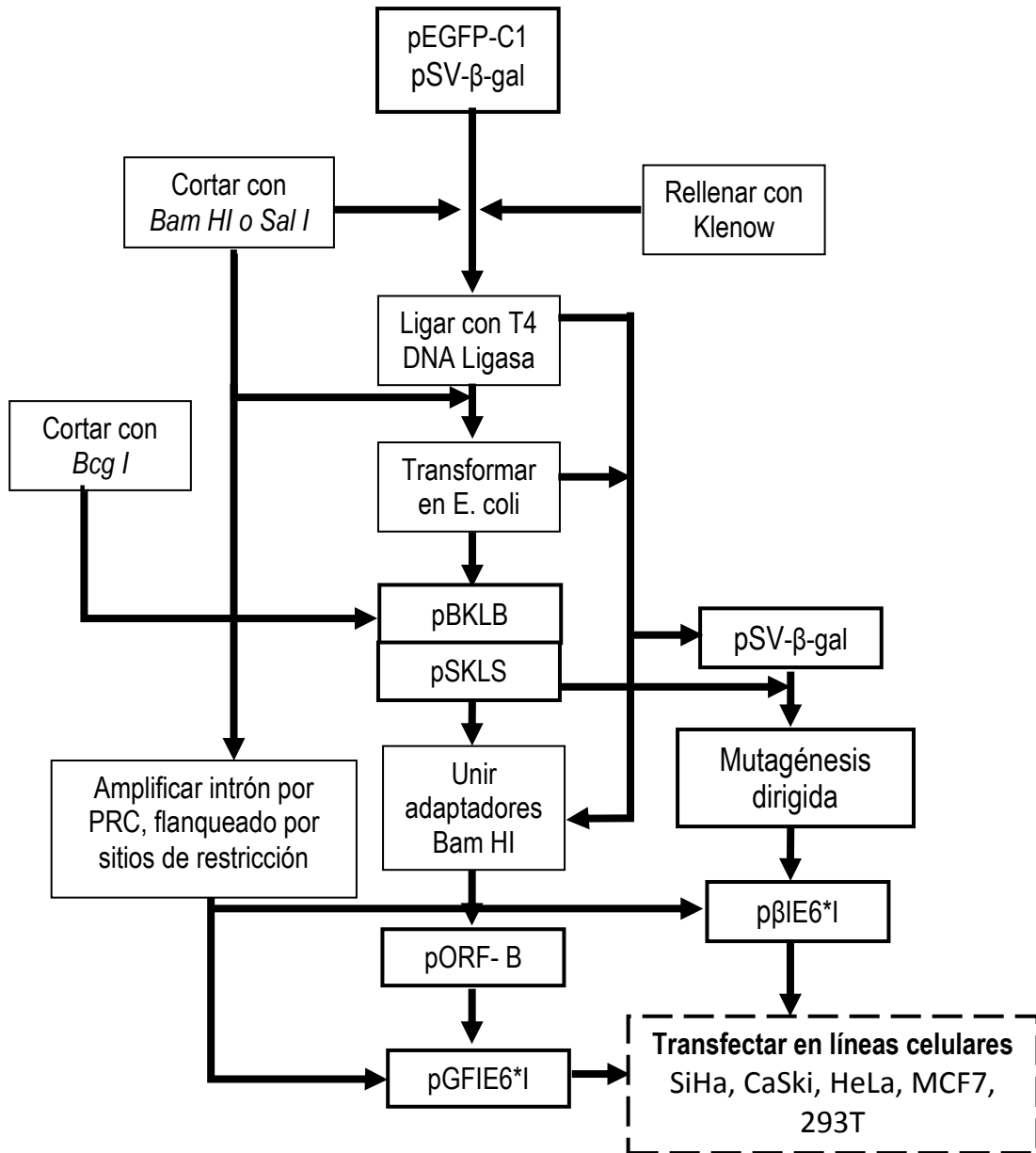
### **OBJETIVO GENERAL**

Construir sistemas reporteros para estudiar el procesamiento de los transcritos tempranos y tardíos del VPH 16.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Modificar el vector pEGFP-C1 para usarlo como reportero de procesamiento transcripcional.
- ✓ Amplificar y clonar intrones de genes del VPH16 e introducirlos en el sistema reportero.
- ✓ Introducir las construcciones en líneas celulares para observar el procesamiento *in vivo* de los intrones generados.

**DISEÑO EXPERIMENTAL**





## MATERIALES Y METODOS

### Cultivo de Líneas Celulares

Las líneas celulares se cultivaron utilizando medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) al cual se le agregó 10 % de suero bovino fetal y 10 µl/ml de antibiótico estreptomina/penicilina. Un vial de cultivo primario de células se coloca en 10 ml de DMEM y se incuba a 37° C durante aprox. 3-4 días para SiHa, de 5-7 días para Caski, y 2-3 días para HeLa y MCF-7. Se cosechan las células cuando se encuentran entre un 90-100% de confluencia y se pasan alícuotas de 1 ml a diferentes cajas conteniendo 9 ml de DMEM. Si se cosechan las células para guardarlas para uso posterior, se agregan 150 µl de DMSO (dimetil sulfóxido) por cada mililitro de DMEM suplementado con 10% SFB y se guardan a -80°C. Si se cosechan las células para la futura extracción de DNA o RNA, se mezclan 500 µl de células con 500 µl de amortiguador TD al 30% de glicerol y se guardan a -80°C.

### Extracción de DNA y RNA

#### **Antecedente**

El primer paso crítico para el ensayo es obtener DNA y RNA de buena calidad, la extracción del RNA se hizo utilizando el protocolo de extracción del estuche RNAeasy de la compañía QUIAGEN, para obtener RNA total, y la extracción de DNA se hizo utilizando el protocolo de extracción del estuche DNA Wizard Genomic de la compañía PROMEGA; los cuales se describen brevemente a continuación.

Para el RNA, se cultiva una caja de células hasta alcanzar entre un 80 y 90% de confluencia y se depositan en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se agregan 600 µl del amortiguador de extracción incluido en el estuche, que contiene sales de guanidina que por ser una sal caotrópica desnaturaliza las proteínas. Seguido, se homogeniza la muestra en un vortex agitando durante 1 min, o hasta que la muestra pase de consistencia viscosa a una consistencia fluida. Una vez homogenizado se agrega 1 volumen de etanol al 70% y se mezcla por pipeteo. Esta mezcla se carga en una columna de sílica RNAeasy incluida en el estuche, acoplada a un tubo de recuperación. Se centrifuga por 15 seg a 10 000 rpm y se descarta el flujo que queda en el tubo. Luego se agregan 500 µl del amortiguador de estabilización y se centrifuga nuevamente por 15 seg a 10 000 rpm, se descarta el flujo que queda en

el tubo. Luego se lava la columna 2 veces primero 2 min y luego 1 min, ambas veces a 10000 rpm con 500  $\mu$ l de amortiguador PE que contiene etanol para eliminar el resto de sales. Finalmente, se eluye la columna con 30  $\mu$ l de amortiguador TE, que contiene Tris-EDTA, para recuperar el RNA unido a la columna. Se divide en alícuotas y se guarda a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para el DNA, se siguió el protocolo descrito por el estuche de la compañía PROMEGA para la extracción de DNA genómico, el cual se describe brevemente. Se cultivan las células hasta un  $\sim 80\%$  de confluencia, se retiran de la caja por raspado con un gendarme o utilizando tripsina para removerlas y depositarlas en un tubo de plástico. Se centrifugan las células durante 5 min a 14000 rpm, para formar una pastilla compacta. Se deja secando la pastilla durante 1 hr a temperatura ambiente. Seguido, se agregan 600  $\mu$ l del amortiguador de lisis nuclear y 18.5  $\mu$ l de Proteinasa K, para disgregar las membranas y lisar las células. Se incuban toda la noche a  $55^{\circ}\text{C}$  en agitación constante. Al día siguiente, se agregan 200  $\mu$ l de la solución de precipitación de proteínas, se mezcla y se incuba durante 5 min en hielo. Se centrifuga durante 5 min a 14 000 rpm, y se rescata el sobrenadante en un tubo nuevo. Se agregan 600  $\mu$ l de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcla y se centrifuga de nuevo durante 5 min a 14 000 rpm. Se descarta el sobrenadante y se agregan 600  $\mu$ l de etanol al 70% para el lavado final, se centrifuga durante 5 min a 14 000 rpm. Finalmente se descarta el sobrenadante, se seca la pastilla formada y se resuspende en 50  $\mu$ l de solución rehidratadora (amortiguador TE). Se guarda la solución a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### PCR de fragmentos de VPH 16

Se utilizó como herramienta para la amplificación y extracción de los intrónes la técnica de PCR. Se describe a continuación las condiciones de reacción, la secuencia de los oligonucleótidos iniciadores utilizados se detalla más adelante.

Tabla 1. Condiciones de reacción para la PCR

	Volumen	Conc.
1. $\text{MgCl}_2$ 25mM	2.5 $\mu$ l	2.5 mM
2. Regulador de la <i>Pfu Polimerasa</i> 10X	2.5 $\mu$ l	1X
3. dNTPs 2mM	2.5 $\mu$ l	200 $\mu$ M
4. Iniciador directo 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l	.8 $\mu$ M
5. Iniciador reverso 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l	.8 $\mu$ M
6. $\text{H}_2\text{O}$ desionizada	c.b.p. 25 $\mu$ l	-
7. Enzima <i>Pfu Polimerasa</i> (5U/ $\mu$ l)	0.3 $\mu$ l	1.5U
8. DNA genómico de Caski (20 ng/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l	100 ng

Se utilizó *Pfu polimerasa* para asegurar la fidelidad en copia de la secuencia del intrón ya que al tratarse de una enzima con capacidad de edición de lectura nos da una certeza mayor al copiar el fragmento que clonaremos en el vector y conservar las señales de procesamiento intactas.

Se amplificó con el siguiente programa: primero desnaturalización por 2 min a 94°C, después 35 ciclos de: desnaturalización por 30 seg a 94°C, alineamiento por 1 min a temperatura variable dependiendo de los iniciadores (ver tabla de los iniciadores utilizados), y extensión a 72°C por 1 min. Finalmente se hace una extensión de 3 min. a 72°C.

### Ensayos de restricción.

Las enzimas de restricción utilizadas en los ensayos fueron *Bam HI*, *Sal I*, *Hind III* y *Bcg I*. Las condiciones de incubación son las mismas para todas las enzimas, exceptuando a *Bcg I*, que además utiliza a la SAM (S-adenosilmetionina) como cofactor extra en la reacción. Las reacciones se prepararon de acuerdo a lo marcado en la tabla en tubos de 1.5 ml, se incubaron las muestras a 37°C durante 1hr. La restricción se verificó llevando a electroforesis la mitad de la mezcla en un gel de agarosa al 1%.

Tabla 2. Condiciones de incubación de enzimas de restricción

	<b>Volumen</b>	<b>Conc.</b>
1. Regulador de la Enzima 10X	1 $\mu$ l	1X
2. DNA plasmídico	~ 1 $\mu$ g	~40 ng/ $\mu$ l
3. Enzima de Restricción <i>Pst</i> I (10U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	5U/ $\mu$ l
4. H <sub>2</sub> O desionizada estéril	c.b.p. 25 $\mu$ l	-

### Relleno de extremos cohesivos 3' con DNA Polimerasa I (Fragmento Klenow)

#### **Antecedente**

El fragmento grande de la DNA polimerasa I de *E.coli*, conocido con el nombre de Klenow, es un fragmento que retiene la capacidad de polimerización 5'-3', y la actividad de exonucleasa 3'-5', que además ha perdido la capacidad de exonucleasa 5'-3', por lo que la enzima hace crecer las cadenas hacia el 3' sin degradar los extremos 5'. El objetivo de este ensayo es rellenar los extremos protruyentes del vector generados por el corte con la enzima *Bam HI* de tal forma que al rellenarse el sitio de restricción original se pierda.

La reacción se prepara de acuerdo a lo siguiente:

Tabla 3. Condiciones de reacción de la enzima Klenow

	Volumen	Conc.
1. Regulador EcoPol 10X	5 $\mu$ l	1X
2. DNA cortado con enzima de restricción	10 $\mu$ l ( 20 ng/ $\mu$ l)	~200 ng
3. dNTPs	1 $\mu$ l	33 $\mu$ M
4. H <sub>2</sub> O desionizada estéril	c.b.p. 50 $\mu$ l	-
5. Enzima klenow polimerasa	1 $\mu$ l	0.5 U

La reacción se detiene incubando 15 min a 65°C y se purifica usando 1 vol de fenol-cloroformo, se precipita con 1 vol de etanol absoluto y 15  $\mu$ l de acetado de amonio. Finalmente se resuspende en 20  $\mu$ l de agua libre de RNAsas y se guarda a -20°C para su uso posterior.

### Fosforilación de fragmentos con T4 polinucleótido cinasa.

#### **Antecedente**

Una vez que el vector ha perdido el sitio de restricción *Bam HI* (GGATCC), se hizo una restricción con la enzima *Bcg I*, que corta al vector en el marco de lectura de la GFP y mediante dos cortes libera un fragmento de 32 pb con 2 extremos 3' protruyentes. Se unió al vector un adaptador sintético de 43 pb (Directo: 5'TGGATCCGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAA3', Reverso: 5'GCCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCGACGGATCCAAC3') que contenía la secuencia liberada de 32 pb, además de un sitio de restricción *Bam HI* (marcado en negro) que serviría para la clonación de los intrones de VPH 16. Los oligonucleótidos sintéticos utilizados como adaptadores se fosforilaron previo a su unión al vector, utilizando la enzima T4 polinucleótido cinasa, de acuerdo al siguiente protocolo:

Primero se mandan sintetizar los oligonucleótidos, purificados por PAGE o por HPLC. De lo que el proveedor mande, se resuspenden los oligonucleótidos a una concentración final de 100  $\mu$ M. Se colocan 10  $\mu$ l de cada uno en un tubo y se adicionan 20  $\mu$ l de amortiguador para adaptadores (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1mM EDTA). Se incubó la mezcla a 94 °C y después se enfrían en baño de agua a temperatura ambiente.

La reacción de fosforilación se prepara de acuerdo a lo siguiente:

Tabla 4. Condiciones de reacción de Fosforilación con T4 polinucleótido cinasa.

	Volumen	Conc.
1. Regulador de PNK 10X	2 $\mu$ l	1X
2. Adaptadores alineados	8 $\mu$ l	~10nmol
3. Solución de ATP 1 mM	1 $\mu$ l	50 $\mu$ M
4. H <sub>2</sub> O desionizada estéril	c.b.p. 20 $\mu$ l	-
5. Polinucleótido cinasa (PNK)	1 $\mu$ l	10 U

Después se unen los adaptadores al vector utilizando T4 DNA ligasa, de acuerdo a las condiciones descritas en la tabla 3, utilizando 3 proporciones de vector/adaptador (1/1, 1/5 y 1/10). Finalmente se transforman células competentes de *E. coli* con las construcciones usando el vector sin adaptador como control negativo.

### Ligación de Fragmentos con T4 DNA Ligasa.

#### **Antecedente**

Los fragmentos que fueron cortados y cuyos extremos se rellenaron con la polimerasa Klenow, fueron ligados usando T4 DNA ligasa para recircularizar el plásmido y permitir su inserción en la bacteria mediante la transformación química. Se utilizó además T4 DNA ligasa para unir los fragmentos de los intrones amplificados por PCR al vector generado.

La reacción se colocó de acuerdo a la siguiente relación:

Tabla 5. Condiciones de ligación con T4 DNA ligasa

	Volumen	Conc.
1. Regulador de ligasa 10X	2 $\mu$ l	1X
2. DNA rellenado con klenow	10 $\mu$ l ( 10 ng/ $\mu$ l)	~100ng
3. H <sub>2</sub> O desionizada estéril	c.b.p. 20 $\mu$ l	-
4. T4 DNA ligasa	1 $\mu$ l	1 U

La mezcla se incubó durante 18 hrs a 16°C, después se divide en dos partes: una de ellas fue cortada de nuevo con *Bam HI* para seleccionar solo los plásmidos ligados que fueron rellenados previamente, la otra se guardó a -20°C. Los plásmidos que solo fueron cortados y se religan sin rellenarse, se perderán con esta última restricción lo que aumentará la frecuencia de transformantes positivas en la placa.

### Transformación de bacterias DH5 $\alpha$ de *E.coli* competentes.

Una alícuota de 50  $\mu$ l de bacterias de la cepa DH5 $\alpha$  de *E.coli* químicamente competentes, preparadas por el método de RbCl<sub>2</sub> se descongeló en hielo, se le

adicionó a un tubo de 1.5 ml la mitad de la mezcla de ligación y las células, y se colocaron en hielo por 10 min. Se llevó el tubo que contenía las células a choque térmico calentando por 45 seg a 42°C y después se regresó el tubo al hielo por 3 min adicionales. Se adicionaron 950 µl de medio SOC precalentado y se incubó por 1 hr a 37°C, con agitación a 1200 rpm. Se inocularon por espatulado, 100 µl de la solución de las células transformadas en placas que contenían medio LB y kanamicina (a una concentración de 50 µg/ml) o ampicilina (a una concentración de 100 µg/ml), utilizados como marcadores de selección. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C.

### Mutagénesis sitio dirigida

La mutagénesis se llevo a cabo con el estuche de la compañía STRATAGENE, que lleva por nombre QuickChange II Site Mutagenesis Kit, el cual se basa en la modificación por PCR del sitio a mutagenizar, la digestión del DNA parental y la final transformación de la mezcla de mutagénesis en una cepa de *E.coli* supercompetente. El protocolo general se describe brevemente a continuación:

Primero, se diseñaron los oligonucleótidos para la mutagénesis utilizando la herramienta en línea para diseño de oligonucleótidos de la página web [www.stratagene.com](http://www.stratagene.com). Las características esenciales de los oligonucleótidos son: que sea de por lo menos 21 bases, que la secuencia a mutagenizar se encuentre en medio de la secuencia, es decir que esté flanqueado por 10 bases en el caso de ser mutaciones puntuales o más en el caso de sustituciones o deleciones, que no forme demasiadas estructuras secundarias que inhiban la PCR y por último que sea purificado por PAGE o por HPLC. Siguiendo, se obtuvieron los plásmidos a mutagenizar, purificándolos por columna mediante el protocolo previamente descrito para las columnas de QUIAGEN. Se cuantificaron y se verificó su integridad y pureza por espectrometría y por electroforesis en gel. Se coloca entonces la mezcla de PCR de la mutagénesis la cual tiene la siguiente composición:

Tabla 6. Condiciones de la reacción de mutagénesis dirigida

	<b>Volumen</b>	<b>Conc. Final</b>
1. DNA del plásmido a mutagenizar	2 µl (20ng)	1µl(1ng/µl)
2. Amortiguador de la polimerasa	2 µl	1X
3. Oligonucleótido Directo (125 ng)	1 µl	6.25 ng/µl
4. Oligonucleótido Reverso (125 ng)	1 µl	6.25 ng/µl
5. dNTPs	1 µl	
6. H <sub>2</sub> O desionizada estéril	c.b.p. 20 µl	-
7. <i>Pfu</i> HF Polimerasa (1U/µl)	3 µl	1U

La mezcla se coloca en el termociclador durante 18 ciclos: 30 seg a 95°C, 30 seg a 55 °C y 1 min/Kb a 68°C. Al finalizar los 18 ciclos, se agrega 1 µl (5U) de la enzima *Kpn I* la cual digiere en DNA bacteriano metilado parental, se incuba la mezcla de reacción durante 1 hr a 37°C. Dejando de esta manera sólo el DNA resultante de la mutagénesis con huecos en las orillas, que serán reparados por la bacteria competente en la que se introducirá. La mezcla de control de la mutagénesis se realiza bajo las mismas condiciones, la diferencia es el plásmido que se utiliza (pWhiteScript) y los oligonucleótidos.

Finalmente, se transforman de 1-4 µl de la reacción en la cepa supercompetente ( $10^8$ ) de *E.coli* XL1-Blue. Se transforma también la mezcla de control la cual debe dar más de 300 colonias que restituyan su fenotipo azul al ser incubadas en agar LB con X-gal e IPTG.

#### Selección de transformantes.

De las colonias que crecieron en la placa con antibiótico fueron seleccionadas 5 colonias al azar, se les realizó la extracción del DNA plasmídico, y posteriormente se llevaron a digestión con las enzimas correspondientes para generar los mapas de restricción necesarios.

#### Extracción de DNA plasmídico.

Se siguió la técnica de lisis alcalina [33] con algunas modificaciones, la cual se describe a continuación. Se extrajo una colonia de la placa de transformantes con la ayuda de un palillo estéril, se inoculó en 4 ml de medio LB líquido con kanamicina a una concentración de 50 µg/ml y se incubó en agitación a 250 rpm por 8 hrs a 37°C. Se colocó la solución en un tubo de 1.5 ml y se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 192 µl de solución I (glucosa 50mM, Tris-HCl 25mM a pH 8.0, EDTA 10mM a pH 8.0) a la que se le añaden previamente RNAsa (10 mg/ml) con la ayuda de un agitador de vórtice, posteriormente se añadieron 300 µl de la solución II (NaOH 0.2N, SDS al 1%) que sirve para lisar las células, se agitó por inversión y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Se adicionaron 400 µl de la solución III (acetato de Potasio 3M, ácido acético glacial al 11.5%, pH final 5.5) para precipitar las membranas, se agitó por inversión y se incubó en hielo durante 20 min, se centrifugó a 13 000 rpm durante 15 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se precipitó el DNA por adición de 680 µl de isopropanol frío, incubando la mezcla a -20°C durante 3 hrs. Se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min para

recuperar la pastilla de ácidos nucleicos. La pastilla se lavó dos veces con 500  $\mu$ l de etanol frío al 70%, agitando a 12 000 rpm durante 3 min, y se secó a temperatura ambiente durante 10 min. Se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua desionizada estéril y se verificó su integridad por electroforesis en gel de agarosa al 1%. La muestra se llevó a un volumen final de 300  $\mu$ l y se purificó adicionando 1 vol. de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en un agitador de vórtice durante 30 seg y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. Se precipitó adicionando 2 vol de etanol absoluto y 1/10 del vol. de acetato de sodio 3M pH 5.3 e incubando a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 2 hrs. La pastilla se recuperó centrifugando a 13000 rpm durante 10 min y se lavó dos veces con etanol al 70%. Se secó a temperatura ambiente, se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua desionizada estéril y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

En el caso de la preparación a gran escala de DNA plasmídico se uso el protocolo descrito en el estuche MAXI PREP de la compañía QUIAGEN, basado en el descrito protocolo de lisis alcalina, la única diferencia radica en que se escalan las proporciones de los reactivos para la extracción a partir de 100 ml de cultivo.

#### Transfección transitoria de plásmidos en líneas celulares

Como inicio, un día antes de realizar el protocolo deben sembrarse cajas con la línea celular de interés a una confluencia entre 50-80% en medio fresco sin utilizar antibiótico, ya que este induce muerte celular durante la transfección.

La transfección se realizó en cajas de 35 mm de diámetro utilizando “lipofectamin reagent” de la compañía Invitrogen, el cual se describe a continuación. Se sembraron aproximadamente  $2 \times 10^5$  células en una caja de 35 mm de diámetro un día antes de la transfección, al siguiente día se retira el medio y se sustituye por el medio de transfección que se prepara de la manera siguiente: se diluye el plásmido a transfectar en DMEM fresco mezclando 12  $\mu$ l de plásmido (350 ng/ $\mu$ l, cantidad total  $\sim 4\mu\text{g}$ ) + 238  $\mu$ l de medio para un volumen final de 250  $\mu$ l; se diluye también la lipofectamina mezclando 10  $\mu$ l de “lipofectamin reagent” con 240  $\mu$ l de medio. Se incuban ambas mezclas por 5 min a temperatura ambiente, se juntan y se incuban durante otros 20 min a temperatura ambiente. Luego se vierten en la caja con células, completando el volumen de medio en la caja a un volumen final de 1 ml. Se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmosfera con  $\text{CO}_2$  durante 4 hrs y pasado ese tiempo se agrega 1 ml extra de medio pero ahora conteniendo el doble de suero. Se incuban por 72 hrs y se verifica la fluorescencia en un microscopio óptico para fluorescencia.



### Transcripción Reversa seguida de PCR (RT-PCR)

#### **Antecedente**

Esta es una técnica que se utiliza para amplificar copias de cDNA desde el RNA, se puede de manera alternativa seleccionar el mRNA con un oligo dT, que se une a la región de poli A de los mensajeros, por lo que permite su selección. Con el cDNA se pueden producir sondas, o visualizar los productos de procesamiento en un gel de agarosa. El protocolo se llevó a cabo de acuerdo a lo especificado en el estuche Titan OneTube RT-PCR, de la compañía ROCHE, el cual realiza la transcripción reversa y la amplificación por PRC en un solo tubo.

Después de haber extraído el RNA total se mezclan 100 ng de RNA total, con la mezcla de dNTPs, el amortiguador de amplificación, los iniciadores, inhibidor de RNAsas, oligo DTT,  $MgCl_2$  y la mezcla de reacción para la enzima. Esta mezcla se incuba a 50° C por 30 min. Seguido, se inactiva la transcriptasa reversa calentando la muestra a 95° C por 5 min, y se procede a la amplificación de la cadena de cDNA. Se llevan a cabo 35 ciclos de desnaturalización (45'' a 94°C), alineamiento (45'' a 55°C) y extensión (1'15'' a 68°C). Finalmente se verifican los fragmentos amplificados por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### Secuenciación

Se utilizó para la secuenciación el protocolo descrito para el estuche "BigDye Sequencing kit". Se describe a continuación brevemente: Se inicia purificando el plásmido a secuenciar, o en el caso de haberse obtenido por mini o maxi preparación con algún otro estuche se necesita cuantificar para asegurar utilizar la cantidad adecuada. Se monta una reacción de acuerdo a lo siguiente:

Tabla 7. Condiciones de reacción para secuenciación

	<b>Volumen</b>	<b>Conc.</b>
1. Premezcla de reacción	2 $\mu$ l	2.5X
2. Amortiguador de secuenciación BigDye	8 $\mu$ l	5X
3. Oligonucleótido iniciador (1.6 pmol)	2 $\mu$ l	3.2 pmol
4. H <sub>2</sub> O desionizada estéril	c.b.p. 20 $\mu$ l	-
5. DNA plasmídico (200ng/ $\mu$ l)	3 $\mu$ l	~ 600 ng

El producto obtenido se limpió utilizando las columnas de limpiado de Zymo Research, que remueven los terminadores que no se incorporaron así como la polimerasa, los iniciadores y otros reactivos que afectan la lectura del producto

durante la electroforesis de secuenciación. El producto obtenido se secó en una centrifuga de vacío durante 10 min y se resuspendió en 20  $\mu$ l de formamida desionizada para posteriormente cargarse en la placa y montarse en el secuenciador.

#### Características de los plásmidos utilizados.

Se utilizó como base el plásmido comercial pEGFP-C1 (No. Cat. 6084-1, GenBank Accesion: U55763) de la compañía CLONETECH. Se generaron a partir de él plásmidos con diferentes características, los cuales se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 8. Características de los plásmidos utilizados.

<b>Plásmido</b>	<b>Características</b>
1. pEGFP-C1	Original, sin modificaciones. Codifica para la GFP, tiene un MCS hacia el carboxilo y se encuentra bajo el promotor de CMV.
2. pBKLB	pEGFP-C1 sin sitio <i>Bam HI</i> en el MCS.
3. pSKLS	pEGFP-C1 sin sitio <i>Sal I</i> en el MCS.
4. pORF-B	Sitio <i>Bam HI</i> en el nt $\sim$ 100 del ORF de GFP, generado con adaptadores sintéticos sobre <i>pBKLB</i> cortado con <i>Bcg I</i> .
5. pGFIE6*I	Contiene al intrón 1 del transcrito E6*I de VHP16 insertado en el ORF de GFP con sitios <i>Bam HI</i> .
6. pGFSO	Sitio <i>Sal I</i> en el ORF de GFP, generado por mutagénesis dirigida cambiando la G54 – C54.
7. pGFIE6	Contiene al intrón 1 del transcrito E6*I de VHP16 insertado en el ORF de GFP con sitios <i>Sal I</i> .
8. pSV- $\beta$ galactosidase	Original sin modificaciones. Codifica la $\beta$ galactosidasa del gen LacZ de <i>E. coli</i> , bajo el control del promotor de SV40.
9. pSV $\beta$ KS	pSV- $\beta$ galactosidase sin sitio <i>Sal I</i> en el nt 4163.
10. pSV $\beta$ SO	pSV- $\beta$ galactosidase con sitio <i>Sal I</i> en el 3er codón del ORF del gen LacZ. Generado por mutagénesis dirigida insertando 3 nt.
11. pSV $\beta$ IE6	Contiene al intrón 1 del transcrito E6*I de VHP16 insertado en el ORF de LacZ con sitios <i>Sal I</i> .

### Características de las líneas celulares.

Con la finalidad de demostrar si el procesamiento del intrón que introdujimos depende de características particulares de la célula, realizamos los ensayos en 4 líneas celulares diferentes. La línea celular SiHa está caracterizada como una línea celular de carcinoma cervical, positiva para VPH16 var europea 350G, con 1-2 copias del genoma viral integradas. La línea celular CaSki, está caracterizada como una línea celular de carcinoma cervical positiva para VPH16, var europea 350G pero con 60-600 copias del genoma celular integradas. La línea celular C33A se considera como una línea celular aislada de carcinoma cervical negativa para la presencia de VPH, aunque su caracterización es aún motivo de controversia. La línea celular HEK 293 es una línea celular aislada originalmente de riñón embrionario humano que fue transformada con el adenovirus 5. La variante de la línea celular llamada 293T, utilizada en el presente estudio, expresa de manera estable el antígeno T (grande) del virus SV40, lo que permite la replicación episomal de plásmidos que contengan el origen de replicación del virus, como en nuestro caso. Esta línea permite obtener las eficiencias de transfección más elevadas.

### Diseño de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos iniciadores para las reacciones de PCR que se llevaron a cabo en todos los ensayos fueron diseñados utilizando el programa Lasergen de la compañía DNASTAR. Los oligonucleótidos se diseñaron siguiendo los protocolos establecidos para el buen funcionamiento los cuales se listan a continuación:

1. Que la  $T_m$  así como la  $\Delta H$  del iniciador directo y reverso tengan valores aproximados, debiendo ser su diferencia en  $T_m \leq 5^\circ\text{C}$  o en  $\Delta H \leq 100$  kcal/mol.
2. Que su tamaño se encuentre de preferencia entre las 19 a 28 bases, debido a que presentan generalmente la menor estructura secundaria lo que favorece la reacción.
3. Que la cantidad de dímeros y orquillas que se presentan por autoplegamiento o complementariedad de las secuencias, tengan los valores de entalpia de unión ( $\Delta H$ ), menores posibles.
4. Que la secuencia a la cual se unen dentro de la hebra molde tenga un sitio de hibridación único y que además no presente tampoco complementariedad con ninguna otra secuencia genómica humana, y de preferencia de ningún otro organismo.

La siguiente tabla lista los oligonucleótidos utilizados en el trabajo, así como las condiciones bajo las cuales se encontró que la reacción.

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Temp óptima
IntronE6I-Sall-F	5' GCG <b>GTCGAC</b> GAGGTATATGACTTTGC 3'	60 °C
IntronE6I-Sall-R	5' GCG <b>GTCGAC</b> CCACCTAATTAACAAATCAC 3'	
IntronE6I-BamHI-F	5' GCG <b>GGATCC</b> GAGGTATATGACTTTGC 3'	58 °C
IntronE6I-BamHI-R	5' GCG <b>GGATCC</b> CCACCTAATTAACAAATCAC 3'	
RTPCR-EGFP-F	5' GGTGAGCAAGGGCGAGGAGC 3'	53 °C
RTPCR-EGFP-R	5' CCAGCTTGTGCCCCAGGATG 3'	
EGFP-G150C-S	5' CATCCTG <b>GTCGAC</b> CCTGGACGGCGAC 3'	55 °C
EGFP-G150C-A	5' GTCGCCGTCCAG <b>GTCGAC</b> CCAGGATG 3'	
pSVB-ins12nt706-S	5' CGAGATCGATCCC <b>GTCGAC</b> GTTTTACAACGTCGTG 3'	55 °C
pSVB-ins12nt706-R	5' CACGACGTTGAAAA <b>GTCGAC</b> GGGATCGATCTCG 3'	

\*Se muestra en negro la secuencia de restricción incluida en cada oligonucleótido. Las letras negras más grandes muestran la secuencia de cambio en las reacciones de mutagénesis.

## RESULTADOS

El primer paso para la creación del reportero fluorescente, era buscar una versión de un plásmido que pudiera expresar una proteína con una actividad fluorescente a buenos niveles en células eucariontes, ya que la finalidad era probar que nuestra construcción era capaz de procesar al intrón en sistemas eucariontes. Para dicha finalidad decidimos caracterizar y modificar al plásmido comercial pEGFP-C1 de la compañía CLONETECH.

### Caracterización del plásmido pEGFP-C1.

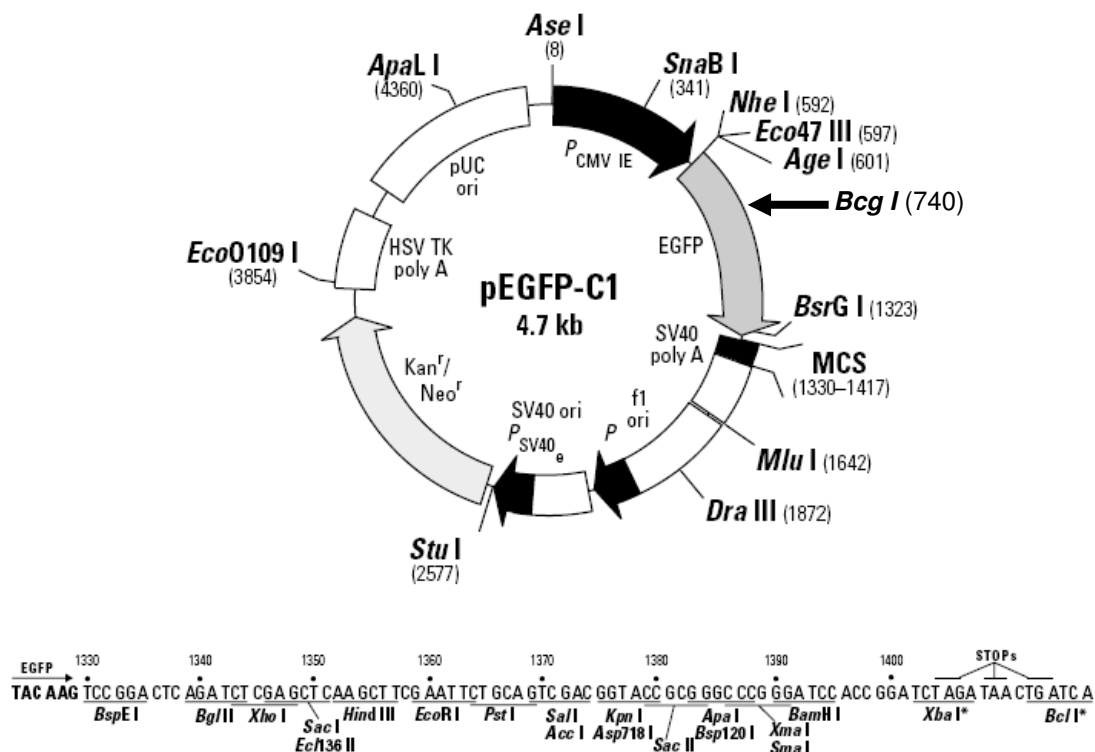
El pEGFP-C1 es un plásmido que codifica para la GFP de *Aequorea victoria*, tiene un promotor de CMV y la secuencia kozak para mejorar su expresión. Tienen además la secuencia de poliadenilación del SV40 y un MCS (sitio múltiple de clonación) hacia el extremo carboxilo terminal (Figura 12). El patrón de restricción observado por el plásmido pEGFP-C1 al ser cortado con las enzimas *Bam* HI, *Sal* I y *Hind* III muestra que las 3 enzimas generan un corte único (Figura13).

### Generación del plásmido pORF-B

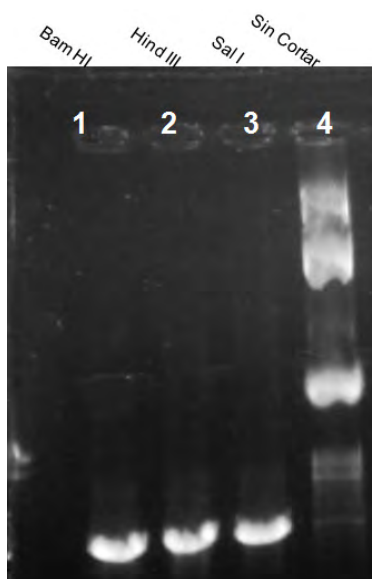
Con el fin de insertar un sitio de restricción en el marco abierto de lectura (ORF), de la proteína, se realizó un corte en el MCS del plásmido pEGFP-C1 con la enzima de restricción *Bam* HI. Luego de cortar se rellenaron los extremos cohesivos con Klenow y finalmente se recircularizó el plásmido. Como resultado se obtuvo un plásmido que ahora es resistente al corte por *Bam* HI (Figura 14A). Esto se observa debido a que la incubación con *Bam* HI (carril 2) resulta en el mismo patrón que el plásmido sin cortar (carril 1). El corte con *Hind* III + *Bcg* I libera un fragmento de ~650pb (carril 5) que es la distancia aproximada del sitio *Bcg* I dentro del ORF al MCS. La siguiente modificación consistió en cortar dentro del ORF con *Bcg* I, la cual libera un fragmento de 49 pb (no mostrado) y genera extremos cohesivos 3' en el plásmido. Con la finalidad de insertar el sitio *Bam* HI en esta zona se diseñaron 2 adaptadores sintéticos que contienen la secuencia de restricción Bam HI, así como los 49 pb del fragmento liberado y se unieron al vector (Figura 15).

Como resultado se obtuvo un plásmidos que ahora contiene un sitio de restricción Bam HI en el ORF de la GFP (Figura 14B). Esto se observa debido a que la doble restricción con *Hind* III + *Bam* HI (carril 4) genera un fragmento de ~650 pb que es del mismo tamaño que el observado por *Hind* III + *Bcg* I (Figura 14A, carril 5) en el

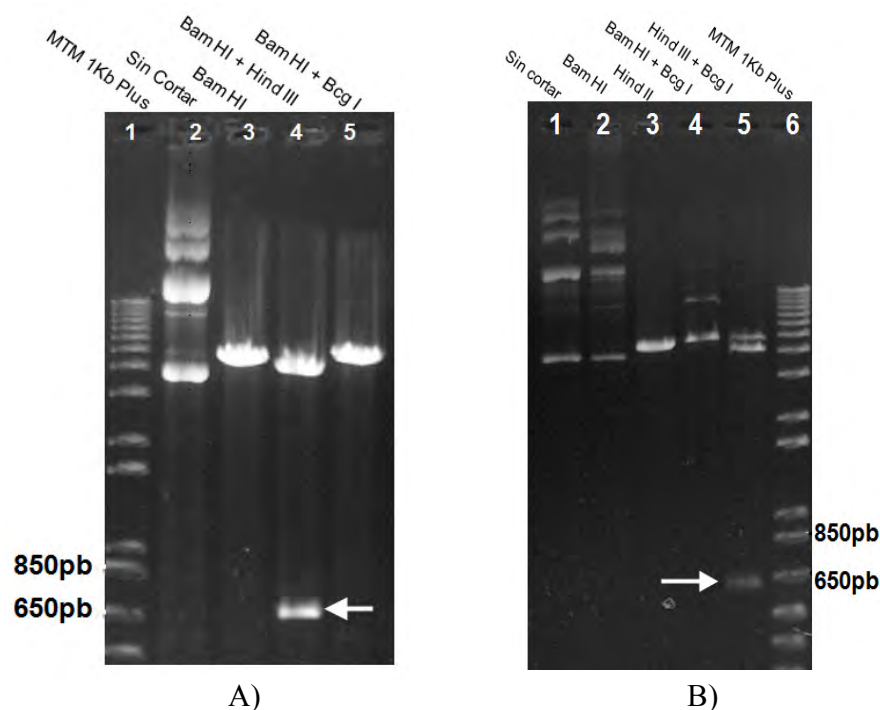
plásmido pBKLb. Así mismo la restricción con *Bam* HI vuelve a mostrar un corte único dentro del plásmido (carril 3).



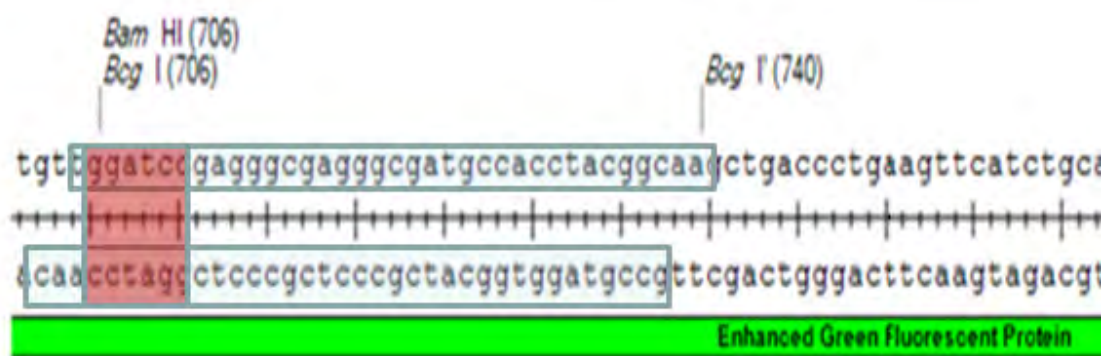
**Figura 1. Mapa del plásmido pEGFP-C1.** El plásmido tiene diferentes secuencias que mejoran su expresión en células eucariontes y permite la selección de las células que lo expresan. Contiene 20 sitios de restricción únicos en el MCS, de los cuales se usaron 3 sitios para la caracterización de los sitios durante el trabajo. La flecha negra muestra el sitio de restricción *Bcg* I que se localiza dentro del marco de lectura de la proteína.



**Figura 2. Caracterización del plásmido pEGFP-C1.** Patrón de restricción de corte único del plásmido pEGFP-C1, con 3 enzimas de restricción. Carriles 1. *Bam* HI, 2. *Hind* III, 3. *Sal* I, 4. plásmido sin cortar. Agarosa al 0.8% teñida con bromuro de etidio.



**Figura 3. Modificación y caracterización de los plásmidos pBKL B y pORF-B.** Derecha. **A) pBKL B.** Carriles 1. plásmido sin cortar 2. resistente al corte con Bam HI 3. Corte único con Hind III 4. Se recupera el corte al digerir con *Bcg I* 5. Al cortar con *Bcg I* y Hind III, se libera un fragmento de 650pb. **B) pORF-B.** Carriles 1. Marcador de tamaño molecular 2. plásmido sin cortar 3. Corte único con Bam HI 4. Al cortar con Bam HI y Hind III se libera el fragmento de 650pb, indicando que se ha introducido un sitio Bam HI en el marco de lectura. 5. Se observa corte único porque ambos sitios están muy cerca.



**Figura 4. Localización de los adaptadores sintéticos.** Se inserto el sitio *Bam HI* a ~92 pb del inicio del marco de lectura de la GFP y dentro de la secuencia liberada por el corte con la enzima de restricción *Bcg I*. Se muestra en una caja roja la secuencia de restricción *Bam HI* y en una azul la secuencia de los adaptadores sintéticos.

**Obtención del plásmido pGFIE6\*I.**

Con la finalidad de obtener un plásmido que tuviera insertado el intrón 1 del transcrito E6\*I de VPH16, se clonó la secuencia del intrón en el plásmido pORF-B obtenido previamente. Esto se realizó primero obteniendo el fragmento correspondiente al intrón desde el DNA genómico de SiHa. Luego se cortó al plásmido pORF-B con la enzima de restricción Bam HI y finalmente se insertó en este sitio compatible. Como resultado se obtuvo un plásmido que contiene ~ 201 pb extras (que corresponden al intrón) con respecto al tamaño esperado para el ORF de la GFP (Figura 16). Con el fin de comprobar si el fragmento del intrón que le fue insertado al plásmido se encontraba en la orientación adecuada, se secuenciaron los plásmidos obtenidos. Los resultados mostraron que el plásmido se encontraba en la orientación adecuada respecto a los dos sitios *Bam HI* que se generan en los extremos y que además las secuencias intrónicas involucradas en el procesamiento permanecieron intactas (Figura 17).

**Las primeras transfecciones no muestran fluorescencia.**

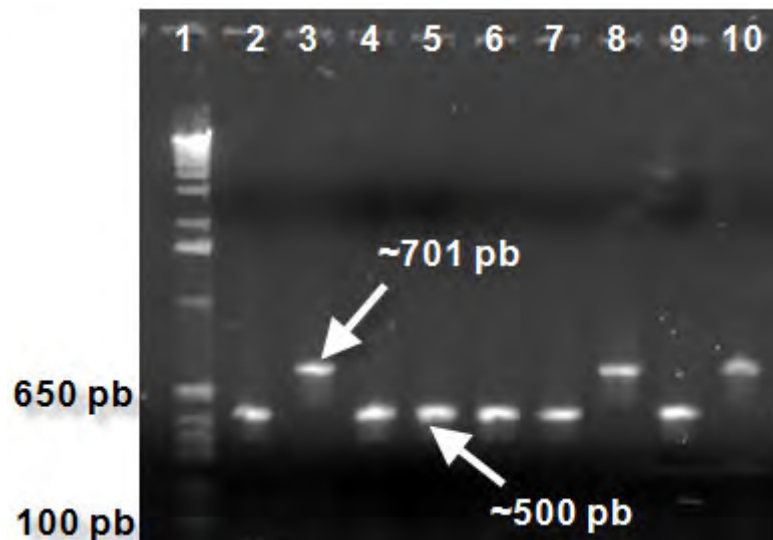
La transfección se realizó en 4 líneas celulares diferentes SiHa, CaSki C33A y 293T. Los resultados obtenidos fueron prácticamente los mismos en todas las líneas. Para el plásmido pBKLB todas mostraron fluorescencia lo que indica que la modificación del sitio de restricción, no modifica la actividad de la proteína (Figuras 18B y 19B). Para el plásmido pORF-B ya no se observó fluorescencia en ninguna de las líneas celulares, esto debido a que la introducción de un sitio de restricción *Bam HI* en el marco de lectura abierto de la proteína, añade 3 aminoácidos (Leu, Asp, Pro) y aparentemente destruyen la capacidad de fluorescer de la proteína (Figuras 18C y 19C). Para el plásmido pGFIE6\*I, que es el que contiene al intrón, tampoco se observó fluorescencia en ninguna de las líneas (Figuras 18D y 19D). Lo que se esperaba es que al procesarse el intrón se añadirían 7 aminoácidos a la secuencia de la proteína (Leu, Asp, Pro, Arg, Trp, Asp, Pro), lo cual igualmente destruye la capacidad de fluorescer de la proteína. Dados los resultados se necesitaba confirmar si el intrón se procesa a pesar de la falta de fluorescencia.

**Procesamiento del intrón en el plásmido pGFIE6\*I.**

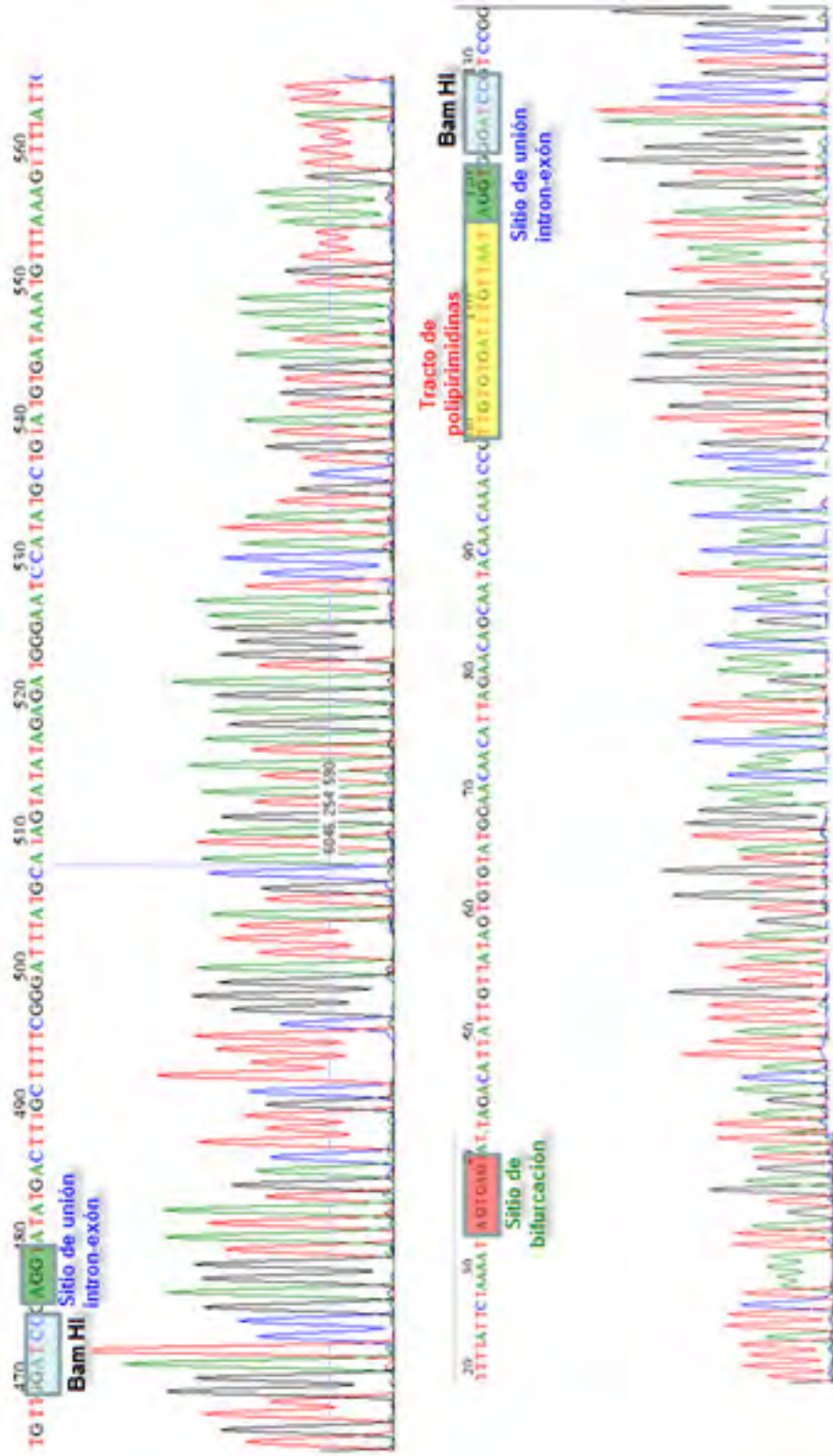
Con la finalidad de demostrar si el intrón era procesado y removido a pesar de la falta de fluorescencia, se realizó una RT-PCR del RNA extraído y dirigido contra el mRNA de GFP de las diferentes líneas celulares transfectadas. Los resultados mostraron que en las líneas celulares infectadas con VPH16: SiHa y CaSki (Figuras 20A y 20D), el intrón es procesado y removido, generando una banda de ~450 pb (Figuras 20A y 20D, carril 3). Esto se observa debido a que los fragmentos



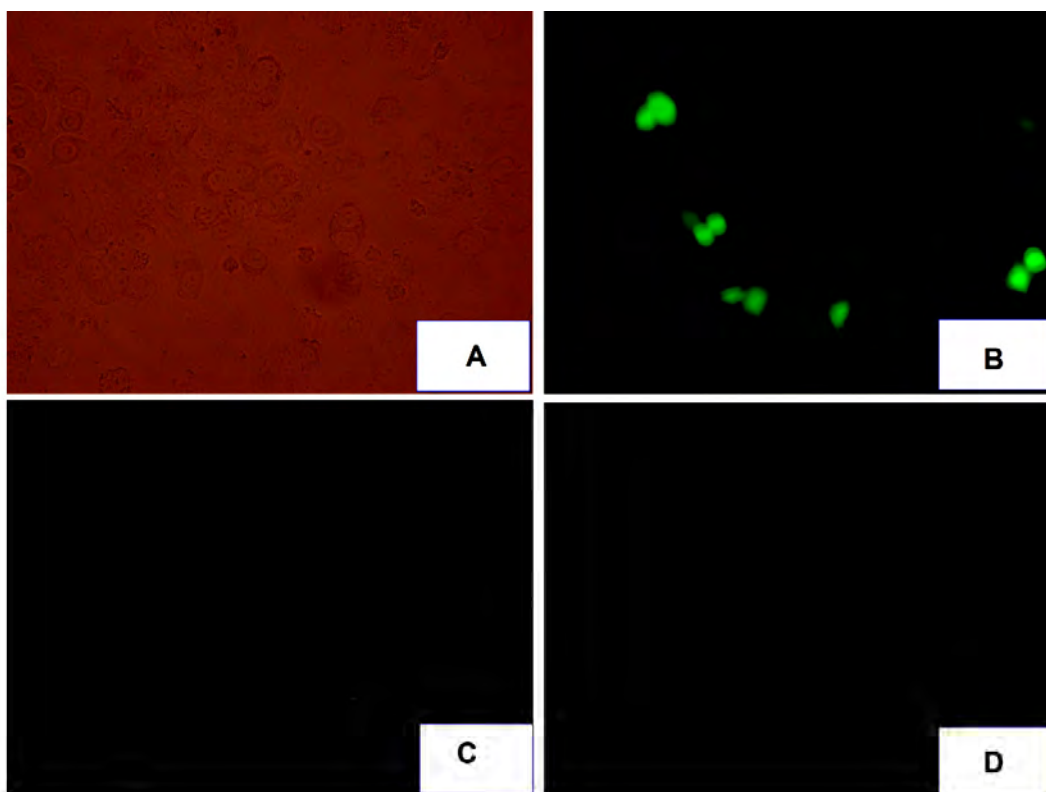
obtenidos de los plásmidos pBKLB y pORF-B, que no contienen al intrón muestran también un tamaño de ~450 pb (Figuras 20A y 20D, carriles 1 y 2). De igual forma se observó que para las líneas negativas para VPH: C33A y 293T, el intrón es procesado y removido generando un fragmento de ~450 pb (Figuras 20B y 20C, carril 3). Finalmente y con el fin de comprobar si los fragmentos obtenidos correspondían a los cDNAs del intrón procesado, se realizó la secuenciación de los fragmentos correspondientes y se realizó el análisis del marco de lectura de cada uno de ellos.



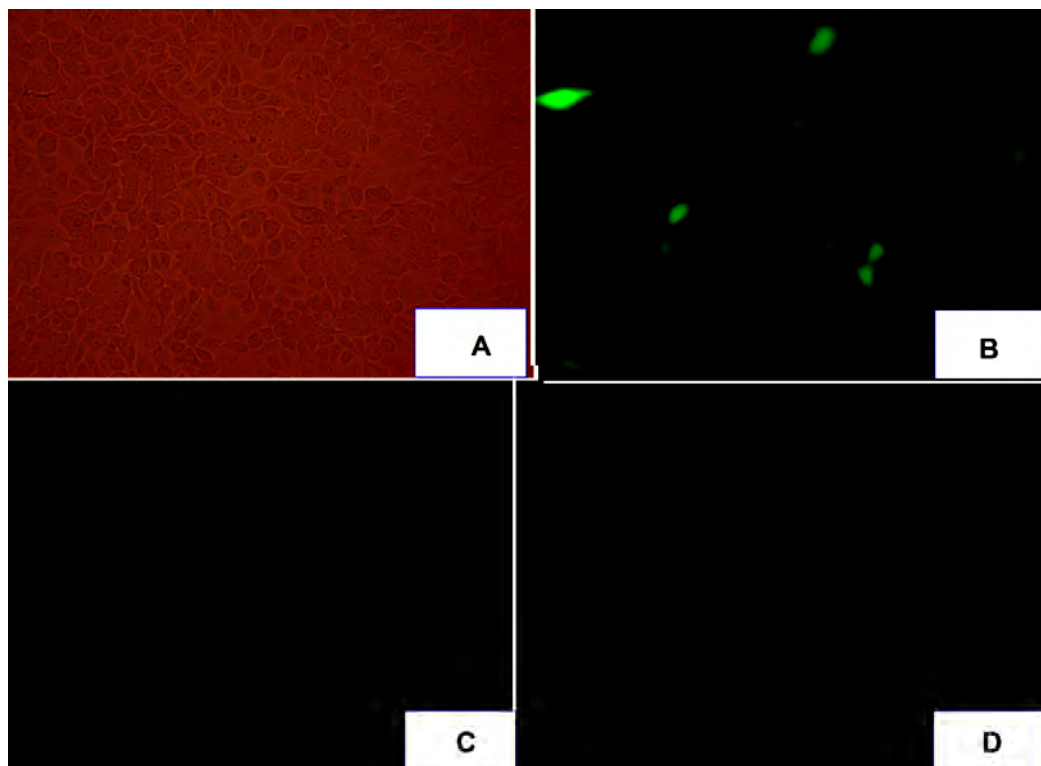
**Figura 5. Obtención del plásmido pGFIE6\*1.** Los fragmentos se obtuvieron por PCR de colonia. En los carriles 3, 8 y 9 se muestran los plásmidos que incorporaron el intrón por lo que aumentan ~201 pb con respecto a los plásmidos que solo contienen la secuencia original de GFP (carriles 2, 4, 5, 6, 7 y 9).



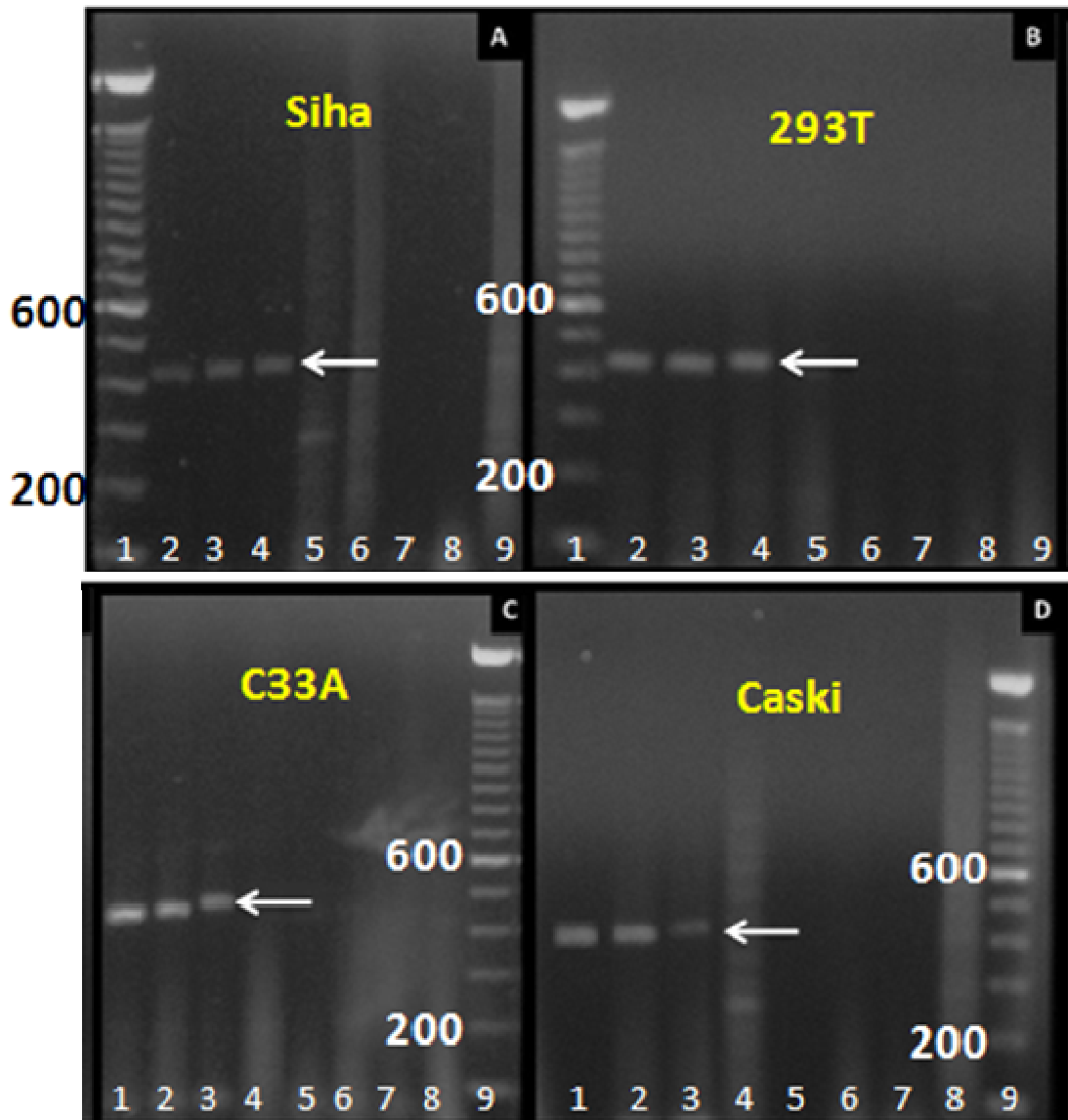
**Figura 6.** Secuencia del intrón del plásmido pGFIE6\*1. En las partes sombreadas se muestran las señales importantes que debe tener el intrón para poder ser procesado: las fronteras intrón-exón, el sitio de bifurcación y el tracto de polipirimidinas. Se muestran además los sitios Bam HI utilizados para la clonación.



**Figura 7. Actividad de GFP en C33A.** Se muestran en los cuadros: A) campo claro B) pBKLB C) pORF-B D) pGFIE6\*I. No se observa fluorescencia en los plásmidos que tienen el ORF de GFP modificado.



**Figura 8 . Actividad de GFP en SiHa.** Se muestran en los cuadros: A) campo claro B) pBKLB C) pORF-B D) pGFIE6\*I. No se observa fluorescencia en los plásmidos que tienen el ORF de GFP modificado.

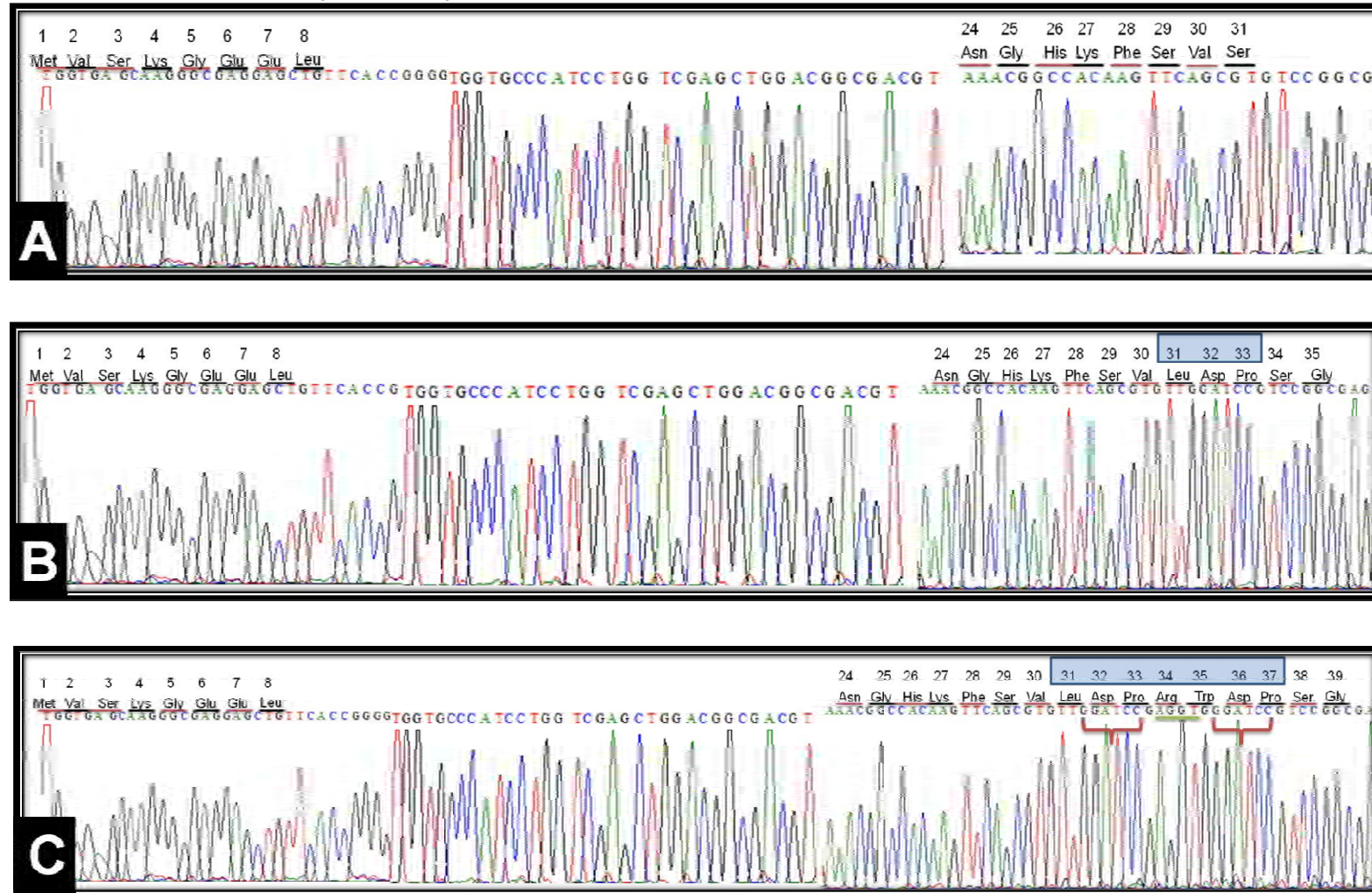


**Figura 9. El intrón es procesado en todas líneas celulares.** Se muestran dos líneas celulares positivas para VPH (paneles A y D) y dos negativas para VPH (paneles B y C). **Paneles A y B.** Carriles 1:MTM. 2:pBKLB. 3:pORF-B. 4:pGFIE6\*I. 5:Sin plásmido. 6-9:Controles negativos (PCR sin RT) . **Paneles C y D.** Carriles 1:pBKLB. 2:pORF-B. 3:pGFIE6\*I. 4:Sin plásmido. 5-8:Controles negativos (PCR sin RT). 9:MTM. En todos los casos se observa un fragmento de ~450pb (flecha blanca) que corresponde al fragmento amplificado proveniente de diferentes mRNAs de GFP.

Los resultados obtenidos mostraron que efectivamente el intrón fue procesado y removido en las células transfectadas con el plásmido pGFIE6\*I. Como se observó en el cromatograma de secuencia (Figura 21C), este fragmento tiene 7 aminoácidos extras “en marco” (de la Leu 31 a la Pro 37), con respecto a la secuencia original de la GFP (Figura 21A). Se pudo observar además que las fronteras de unión exón-exón, que originalmente fueron incluidas en el intrón, fueron adjuntadas al plásmidos procesado; y ahora forman parte del cDNA de la GFP (Figura 21C, líneas verdes) así como también el sitio de restricción que fue usado para introducir al intrón en el plásmido (corchetes rojos).

Los resultados obtenidos mostraron además que la secuencia del mRNA de GFP de la transfección con el plásmido pORF-B (que no mostró fluorescencia) contiene 3 aminoácidos extras (Leu, Asp, Pro) que probablemente son los responsables de la desestabilización de la estructura de la proteína y por lo tanto de la falta de fluorescencia(Figura 21B).

## Secuencia de los cDNAs amplificados por RT-PCR.



**Figura 10. Procesamiento del intrón.** Panel A: secuencia del cDNA de GFP transfectado con el plásmido pSKLS. Panel B: secuencia del DNA de GFP transfección con el plásmido pORF-B. Se puede ver que la modificación añade 3 aminoácidos (recuadro azul) a la proteína. Panel C: secuencia del cDNA de GFP transfección con el plásmido pGFIE6\*1. Se puede observar que el transcrito fue procesado por splicing, ya que no contiene la secuencia original del intrón, excepto las fronteras de unión (subbravadas en verde). El procesamiento añade 7 aminoácidos (recuadro azul) a la proteína.

**Segunda modificación al plásmido pEGFP-C1**

Una vez que probamos el principio de funcionamiento del modelo del reportero, decidimos encontrar una versión del reportero que permitiera conservar la fluorescencia después del procesamiento del intrón.

Para ello en esta ocasión modificamos al plásmido pEGFP-C1 pero ahora solo introducimos un sitio de restricción *Sal I* en una secuencia cuasi *Sal I*, en lugar de insertar un adaptador sintético. Esta modificación se hizo generando una mutación puntual en el nucleótido 54 del marco de la proteína GFP (G → C). La modificación llevó al cambio en el aminoácido 18 (Glu) para convertirlo en ácido aspártico (Asp), pero dejando un sitio *Sal I* ahora dentro del marco (Figura 22).

**Generación del plásmido pGFSO**

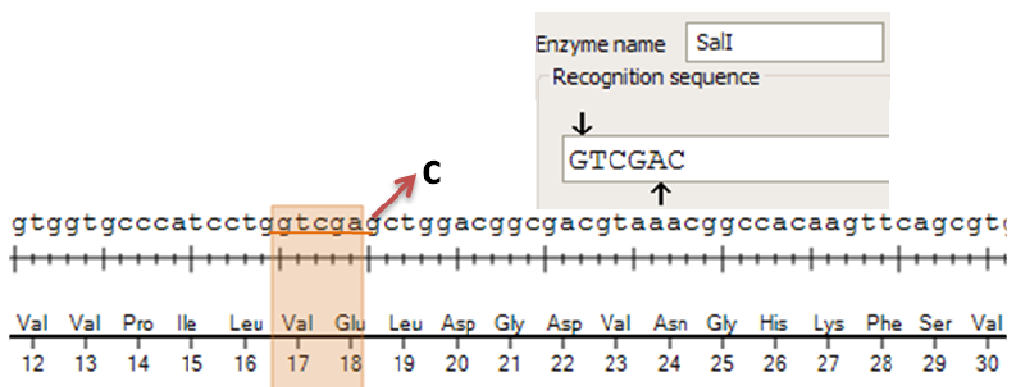
Con el fin de eliminar primero el sitio de restricción *Sal I* del MCS del plásmidos original pEGFP-C1, y colorarlo luego como sitio de restricción único en el marco de la GFP, se realizó un corte con la enzima *Sal I*, se rellenaron los extremos cohesivos y se recircularizó. Como resultado se obtuvo un plásmido resistente al corte por la enzima *Sal I* por lo que muestra un patrón idéntico al del plásmido sin digerir (Figura 23).

Luego, con el fin de colocar el sitio de restricción *Sal I* dentro del marco de la GFP se mutagenizó el nucleótido 54 del marco de la GFP que formaba parte de una secuencia de restricción *cuasi Sal I* (GTCGAG). La mutagénesis generó una secuencia de restricción *Sal I* (GTCGAC), que se encuentra a ~670 pb del MCS del plásmido, por lo que el corte doble con *Sal I + Xho I* muestra un fragmento de dicho tamaño (Figura 24). Este sitio donde es donde se introducirá el intrón.

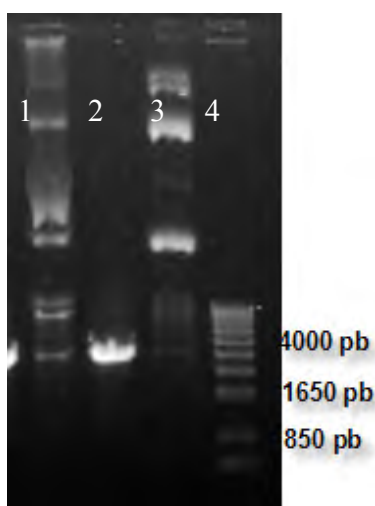
**Generación del plásmido pGFIE6**

Con el fin de generar un plásmidos que contenga al intrón 1 del transcrito E6\*I de VPH16 en el marco de lectura de la GFP, se cortó el vector generado pGFSO con la enzima de restricción *Sal I* y se unió a un fragmento amplificado del intrón de VPH16 con sitios de restricción *Sal I*. Como resultado obtuvimos un plásmido que se observa de un tamaño mayor al resto (~701 pb) al ser amplificada una región de ~500 pb dentro de la GFP (Figura 25). Estos ~201 pb extra corresponden al tamaño del intrón introducido.

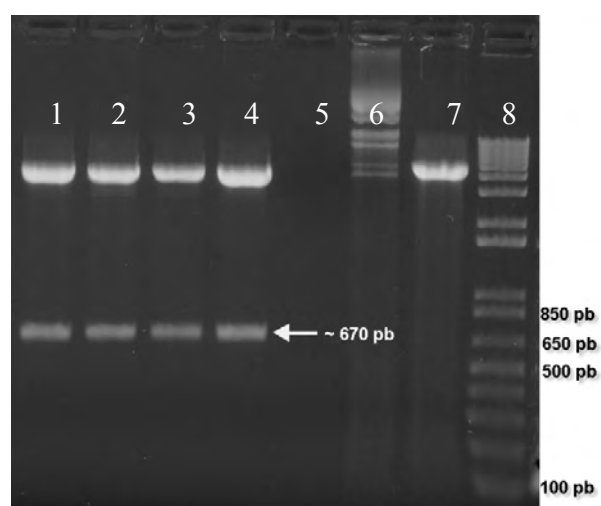
---



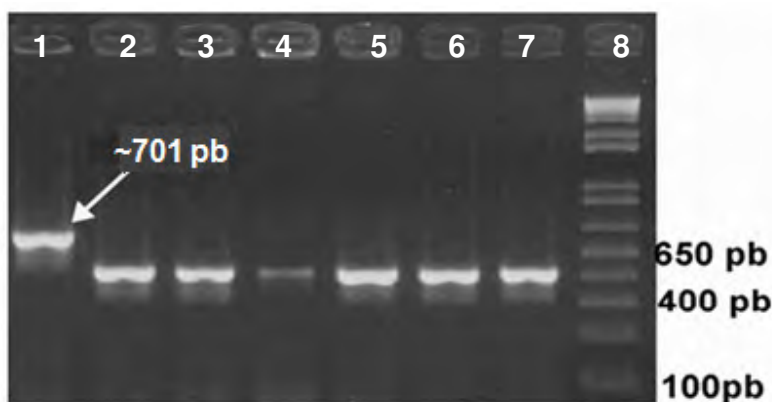
**Figura 11.** Sitio donde se realizó la segunda modificación al plásmido pGFP-C1. Se muestra el sitio donde se generó la mutación puntual para convertirlo en un sitio de restricción de la enzima *Sal I*.



**Figura 12.** Generación del plásmido pSKLS. Carril 1: plásmido sin digerir. 2: digerido con *Hind III* 3: digerido con *Sal I*, se puede ver que el plásmido es resistente al corte con *Sal I*. 4: MTM



**Figura 13.** Generación del plásmido pEGFSO. Carriles 1-4: plásmido de 4 clones digerido con *Sal I* y *Xho I*, se puede ver que ahora los plásmidos han adquirido un sitio de restricción *Sal I* en el ORF por lo que liberan un fragmento de ~ 670 pb. 6: plásmido sin digerir. 7: plásmido digerido solo con *Sal I*. 8: MTM



**Figura 14.** Generación del plásmido pEGFIE6. Carriles 1-7: plásmido amplificado por PRC de 7 clones diferentes, se puede ver que solo la número 1 obtuvo el inserto del intrón E6\*1 por lo que aumenta ~ 201 pb con respecto al resto dando como resultado un amplicon de ~701 pb. Este plásmido fue el que se utilizó para la transfección.



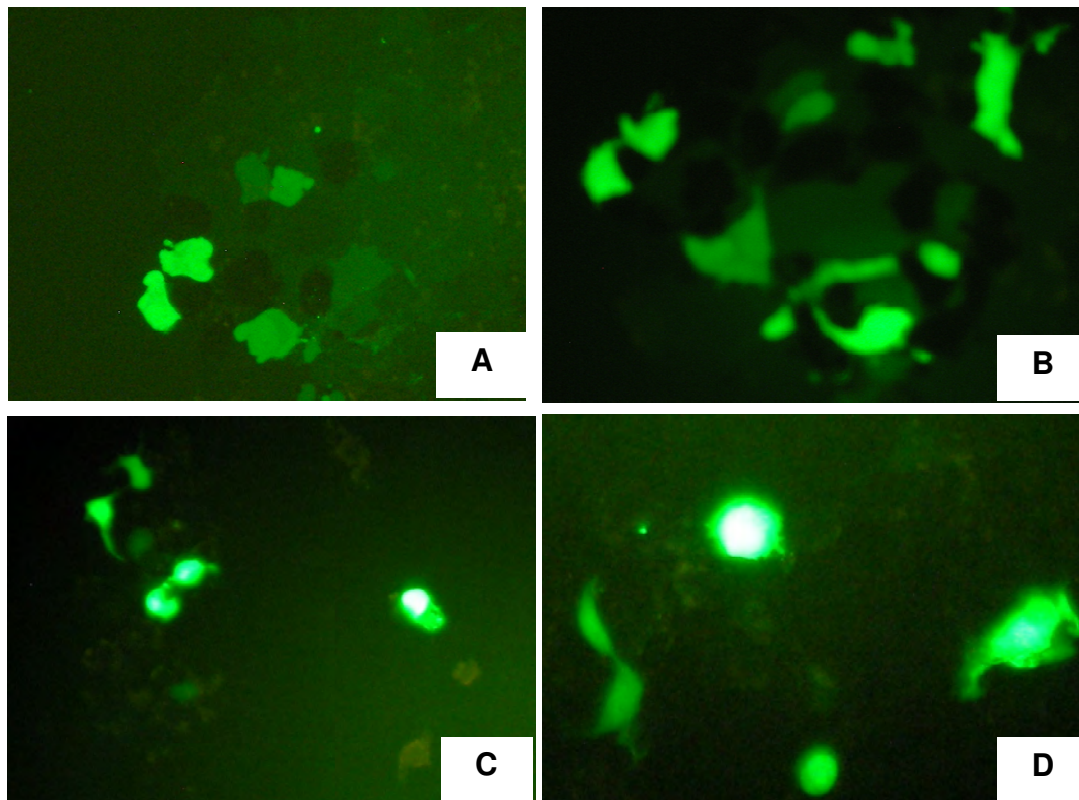
**Obtención de células fluorescentes que procesan al intrón.**

Con el fin de mostrar la capacidad de procesamiento de los intrones en esta nueva versión modificada del reportero, se realizó una transfección transitoria con estas construcciones en células HEK 293T. Los resultados mostraron que esta versión modificada a la cual se le introdujo nuevamente el intrón 1 del transcrito E6\*I del VPH 16, fue capaz de mantener la fluorescencia (Figura 26D). Por lo que podemos concluir que el intrón fue procesado, el marco la GFP reconstruido, y los aminoácidos extra introducidos no modificaron notablemente la estructura de la proteína a un nivel que le impidiera fluorescer.

De igual forma la modificación hecha por la mutagénesis, que solo cambió un nucleótido, mantuvo la fluorescencia (Fig. 26C). Debido esto quizá a que el cambio de un solo nucleótido generó una mutación de Glu – Asp, que por ser ambos aminoácidos de cadenas laterales ácidas no modifica notablemente la estructura de la proteína y permite conservar la fluorescencia.

Finalmente pudimos mostrar además del principio de funcionamiento del reportero, que tenemos una versión de esta la GFP capaz de mantener su fluorescencia después de que el intrón ha sido procesado. El sistema está listo y solo falta obtener las demás secuencias de los intrones para probar su capacidad de definir su procesamiento como lo hemos mostrado para el caso de E6\*I.

---



**Figura 15. El intrón se remueve y la GFP conserva su fluorescencia.** Panel A:pEGFP-C1, la versión original sin modificaciones. B:pSKLS, la modificación del sitio múltiple de clonación permite conservar la fluorescencia. C:pEGFSO, en esta versión que ya incluye el sitio de restricción la fluorescencia se mantiene. D:pGFIE6, en el plásmido que contiene al intrón la fluorescencia se mantuvo, lo que indica que el intrón fue removido por procesamiento, la GFP fue reconstruida y finalmente pudo mantener su capacidad de fluorescer.

**Modificación al gen LacZ que codifica a la proteína  $\beta$ -galactosidasa.**

En la  $\beta$ -galactosidasa a comparación de la GFP, la cinética de expresión así como la actividad presentada por la proteína suelen ser más lineales [34]. Esto permite mantener un monitoreo de la actividad respecto a la expresión de la proteína más confiable en un periodo de tiempo más largo. Por otro lado en GFP existen datos que han demostrado que la proteína puede permanecer, después de haber sido sintetizada, durante mucho tiempo con actividad dentro de la célula [35]. Esto puede resultar en un error al comparar la síntesis contra la actividad del reportero ya que pudiéramos tener lecturas de fluorescencia que no correspondan por completo a la síntesis de nueva proteína y ser actividades acumuladas por la falta de degradación. Esta actividad se observará de manera más sensible en los ensayos de diferenciación *in vitro* [36], ya que el tiempo de incubación es mucho más largo y lo que se pretende observar es el procesamiento diferencial de los intrónes con respecto a la capa del epitelio donde se encuentren.

Con el fin de estudiar el procesamiento de diversos intrónes de VPH16, en un modelo que nos permita observar la diferencia del procesamiento en un sistema de diferenciación celular *in vitro*, decidimos probar la misma estrategia de modificación utilizada con los reporteros fluorescentes pero ahora con el gen LacZ de *E. coli* que codifica a la  $\beta$ -galactosidasa. Esta enzima es conocida por su capacidad de degradar a los  $\beta$ -galactopiranosidos que tienen estructuras semejantes a la lactosa, y se emplea como reportero cromogénico midiendo su actividad por medio del sustrato X-gal (5bromo-4cloro-3indolil-galactopiranosido), que forma un precipitado azul tras la hidrólisis de su enlace  $\beta$  [34, 37].

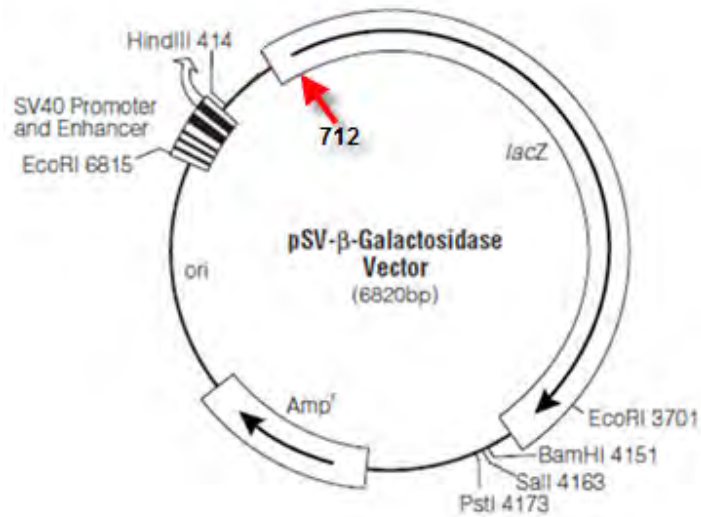
**Generación del plásmido pSV $\beta$ SO**

Con el fin de eliminar el sitio de restricción *Sal I* que tiene un sitio de corte único dentro del plásmido pSV- $\beta$ -galactosidase (Figura 27), se realizó un corte con *Sal I*, luego se rellenaron los extremos cohesivos con Klenow y se recircularizó. Como resultado se obtuvo un plásmido resistente al corte por la enzima *Sal I* (Figura 28).

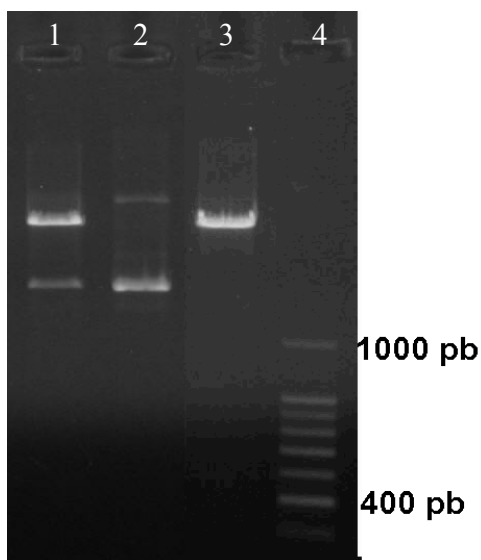
Con el fin de insertar el sitio *Sal I*, recientemente eliminado, dentro del ORF de la  $\beta$ -galactosidasa, se realizó una inserción de 3 nucleótidos (GAC) por mutagénesis dirigida en el 2° codón de la proteína. Como resultado se obtuvo un plásmido que contiene ahora un sitio de restricción *Sal I* dentro del ORF de la proteína, por lo que la doble restricción *Sal I + Hind III*, da como resultado un fragmento de ~300 pb

---

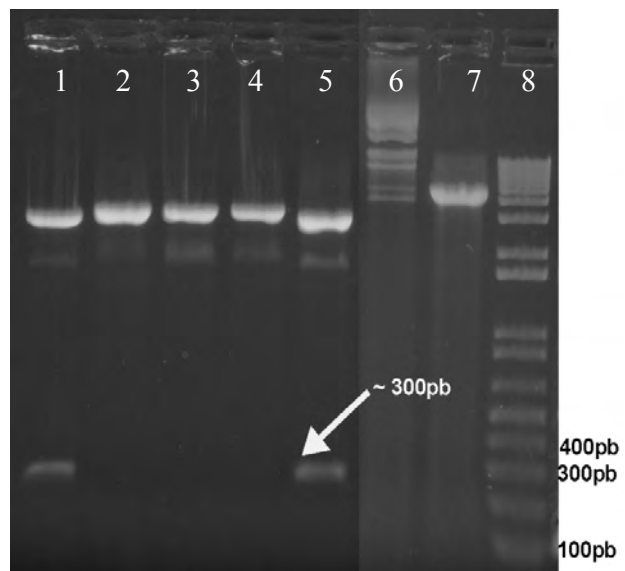
(Figura 29) que es la distancia entre el sitio *Hind III* (414) y el sitio de inserción del sitio *Sal I* (712).



**Figura 16. Mapa del plásmido pSV-β-galactosidase.** Se muestran los elementos regulatorios del plásmido y algunos sitios de restricción. La flecha en rojo muestra el sitio donde fue insertado el sitio de restricción *Sal I* por mutagénesis.



**Figura 17. Generación del plásmido pSVβKS.** Carril 1: plásmido sin digerir. 2: digerido con *Sal I*, se puede ver que el plásmido es resistente al corte con *Sal I*. 3: digerido con *Hind III*, 4: MTM



**Figura 18. Generación del plásmido pSVβSO.** Carriles 1-5: plásmido de 5 clonas digerido con *Sal I* y *Hind III*, se puede ver que ahora los plásmidos han adquirido un sitio de restricción *Sal I* en el ORF por lo que liberan un fragmento de ~ 300 pb. 6: plásmido sin digerir. 7: plásmido digerido solo con *Sal I*. 8: MTM

**Generación del plásmido pSVβIE6**

Con el fin de insertar el intrón 1 del transcrito E6\*I de VPH16 dentro del marco de la β-galactosidasa recién modificada, se realizó una amplificación del fragmento correspondiente al intrón y se clonó en el plásmido pSVβSO previamente cortado con la enzima de restricción *Sal I*. Como resultado se obtuvo un plásmido que tiene ahora al intrón insertado dentro del marco de la proteína. Esto se observa ya que las diferentes clonas, al ser seleccionadas, adquirieron un fragmento de ~200 pb, correspondientes al intrón (Figura 30).

**Las construcciones no fueron capaces de mantener la actividad.**

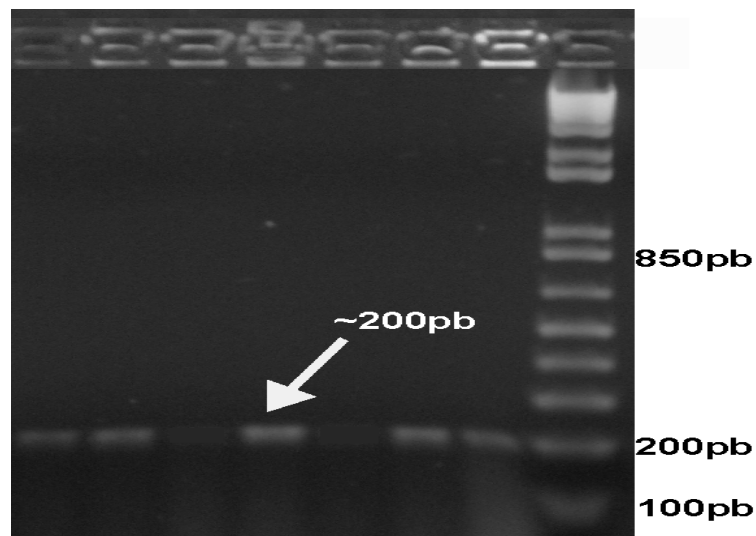
Con el fin de verificar la funcionalidad de estos nuevos reporteros, las diferentes versiones de los plásmidos fueron transfectadas en la línea celular 293T y su actividad fue observada utilizando el sustrato cromogénico X-gal. En los resultados obtenidos, se observa que mientras la primera delección del sitio *Sal I* (fuera del marco) conserva la actividad (Figura 31B), y es la misma que en la proteína original sin modificaciones (Figura 31A); desafortunadamente los plásmidos derivados de la mutagénesis (Figura 31D) y el que contiene al intrón (Figura 31D) no presentan actividad y no se colorearon.

A pesar de la falta de actividad de la proteína creemos que una segunda modificación de este reportero nos permitirá obtener un reportero que pueda funcionar en el sistema de diferenciación *in vitro*. Necesitaremos para ello, realizar la inserción del sitio hacia el 5' del marco de la proteína, de tal forma que podamos conservar la capacidad de la proteína para tetramerizarse. Es esta falta de tetramerización, la razón más probable del porque no pudimos obtener actividad del reportero en el caso del plásmido pSVβSO. Por lo mismo, no se observó actividad en el plásmido pSVβIE6.

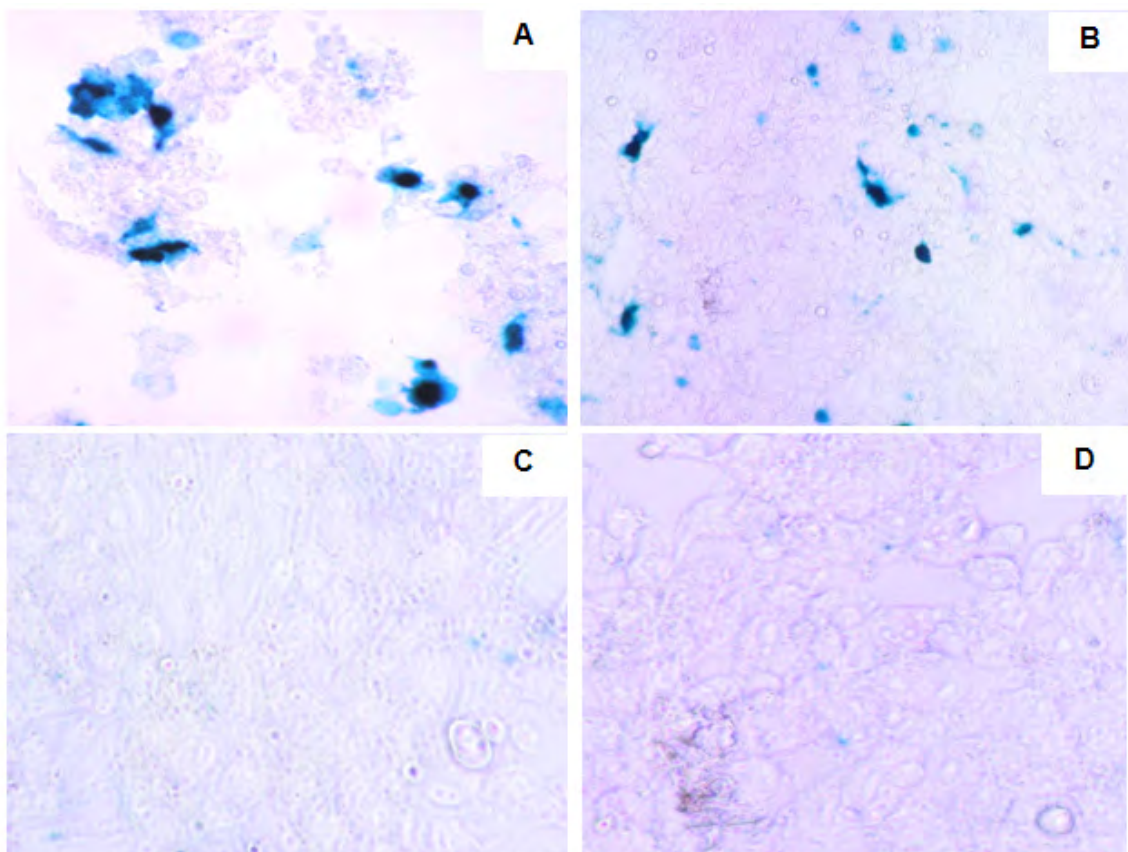
Se pudo obtener una versión de la proteína fluorescente que se usará para estudiar el procesamiento de diferentes intrones de VPH16, aunque su capacidad podría no limitarse al VPH, y puede utilizarse para estudiar señales intrónicas de procesamiento en otros sistemas celulares.

Se describió la estrategia para realizar la modificación al gen LacZ, con la intención de utilizarlo como reportero en un sistema de diferenciación *in vitro*.

---



**Figura 19. Generación del plásmido pSV $\beta$ IE6.** Carriles 1-7: plásmido amplificado por PCR de 7 clonas diferentes, se puede ver que 5 de las 7 clonas obtuvieron el inserto del intrón E6\*1 por lo que amplifican un fragmento de ~ 200 pb. Este plásmido fue el que se utilizó para la transfección.



**Figura 20. No se pudo obtener una buena modificación a la  $\beta$ -galactosidasa.** Panel A: pSV- $\beta$ -galactosidasa, B: pSV $\beta$ KS, en esta versión a la cual se le ha destruido el sitio *Sal I* original, conserva su actividad y las células se colorean. C: pSV $\beta$ SO, este plásmido mutagénico que reincorpora el sitio *Sal I* dentro del marco de lectura ya no presenta actividad D: Plásmido pSV $\beta$ IE6, de la misma forma el plásmido que contiene al intrón no muestra actividad.

## DISCUSIÓN

La proteína verde fluorescente (GFP) ha sido desde su descubrimiento uno de los reporteros de excelencia empleados para medir la actividad de ciertas proteínas celulares. La GFP tiene una estructura terciaria en apariencia muy estable, las hojas  $\beta$  colocadas alrededor del barril, generan un ambiente altamente hidrofóbico que permite al cromóforo (enterrado en el centro del barril) que ayuda a sostener la fluorescencia evitando la entrada de moléculas de agua[38]. En el primer intento por generar el reportero perdimos un detalle de vista en la generación del modelo, los dos residuos de prolina que se introducían tras la modificación del marco de lectura para colocar el sitio de restricción *Bam HI* serían muy probablemente los responsables de la falta de fluorescencia. Los residuos de prolina se han asociado a la desestabilización de diferentes estructuras terciarias de proteínas, particularmente en las hojas  $\beta$ . Esto se debe principalmente a que la prolina es un iminoácido, y dentro de su estructura química, utilizando el grupo imino, es difícil generar ángulos de torsión entre enlaces peptídicos, que permitan una plasticidad y puedan rotar libremente en diferentes estructuras[17].

La secuencia de los cDNAs obtenidos de la RT-PCR, sin embargo, demostró que a pesar de la falta de fluorescencia en la estructura que incorpora a la prolina, esta sí muestra procesamiento por splicing del mRNA. El hallazgo es interesante basado en que la secuencia del intrón E6\*I solo contiene las secuencias de procesamiento intrónicas (sitios de procesamiento 5'y 3', punto de bifurcación y tracto de polipirimidinas) que son necesarias para el procesamiento. Además el procesamiento se observó en las 4 líneas celulares, lo que indica que la capacidad de estas secuencias para ser reconocidas por el spliceosoma es independiente de la presencia del VPH. Esto indica que el intrón E6\*I tiene una secuencia lo suficientemente fuerte como para ser capaz de regular su reconocimiento y por lo tanto su procesamiento por la maquinaria de splicing. Sin embargo, existen estudios que han apoyado ampliamente la presencia de secuencias potenciadoras y silenciadoras de splicing dentro del genoma de VPH[27, 28, 39-43]. Estas secuencias se han definido en la región tardía del genoma viral, que es donde ocurre la mayor regulación por splicing alternativo[24, 40]. El único elemento de regulación importante para el intrón E6\*I descrito es la localización de la capucha

---

5'-metil al mRNA, que se ha visto es importante en la decisión de procesar o no al transcrito endógeno de VPH16 que lo contiene[44]. Otra implicación importante de conocer que el procesamiento del intrón E6\*I no depende del uso de potenciadores o silenciadores, es que este procesamiento es muy importante para la producción de la oncoproteína E7, ya que se ha demostrado que dicha proteína es traducida de manera más eficiente desde el transcrito procesado al cual se le ha removido el intrón, a diferencia de E6 que es producida desde el transcrito completo[45]. Por ello, el virus sería capaz de producir ambas oncoproteínas en cualquier célula que pueda eficientemente traducir el mensajero completo, sin necesidad de confiar en alguna secuencia extra de regulación del procesamiento.

La segunda versión del reportero que se creó pudo de manera eficiente conservar la fluorescencia, debido a que la mutación puntual solo modificó el residuo de glutamato 18 por un residuo de aspartato. Esta mutación se ha observado que en sistemas biológicos permite conservar la función del producto codificado, y se considera una mutación "missense conservative" ya que a pesar de cambiar el aminoácido codificado, la función se mantiene. Esto se debe a que ambos residuos son aminoácidos de cadenas laterales acídicas y tienen estructuras químicas parecidas. En el caso del reportero que se generó después del procesamiento del intrón, también conservó la fluorescencia debido a que los 6 residuos que se incorporaron son residuos que no alteran demasiado la estructura de la proteína y permiten la conservación de la fluorescencia.

A pesar del éxito en la generación de un reportero fluorescente para el estudio de los intrones de VPH 16, estamos interesados también en estudiar el procesamiento de estos intrones ligado a la diferenciación *in vitro*[36]. Por ello, realizamos la modificación al reportero  $\beta$ -galactosidasa, derivado del gen LacZ de *E.coli*, que es una proteína capaz de hidrolizar los enlaces  $\beta$  de algunos de los galactopiranosidos con estructuras semejantes a la de la lactosa[37]. La elección de este reportero se basa en la evidencia de que la  $\beta$ -galactosidasa por su relación entre síntesis y actividad más lineal puede ser un mejor reportero en el sistema de diferenciación *in vitro* [34, 35, 46]. En el sistema de diferenciación *in vitro*, las células se crecen en un soporte que les permite diferenciarse durante varios días, por lo que es vital que la proteína se mantenga con actividad durante muy buena parte del tiempo y que la actividad del reportero que se mida tenga una relación lineal con respecto a la síntesis de la proteína, ya que se pretende ver el procesamiento de cada intrón en diferentes capas del epitelio estratificado. Desafortunadamente no hemos

---



obtenido aun resultados positivos al utilizar este reportero en el sistema, porque en la primera modificación que hicimos no fue capaz de retener la actividad después de una inserción de 3 nucleótidos, que permitió la incorporación de un sitio Sal I en el marco de lectura de la proteína. Esto se debió muy probablemente a la incapacidad de la proteína para oligomerizarse, se ha reportado que los primeros 50 aminoácidos de la proteína (conocidos como péptido  $\alpha$ ) están relacionados con su capacidad de tetramerización, y es solo en este estado tetramérico que la proteína tiene capacidad de formar el centro catalítico que es responsable de la hidrólisis de los enlaces  $\beta$  de los galactopiranosidos. En la segunda aproximación trataremos de insertar el sitio de restricción río arriba del marco de lectura para poder conservar intacta la mayor cantidad del péptido  $\alpha$  que sea posible para conservar la actividad.

Finalmente se marcan algunas estrategias en la sección final de "Perspectivas", que hemos seguido ya para poder ensayar la capacidad de otras secuencias intrónicas "sintéticas" de procesarse por de la misma forma que el intrón E6\*1. Todo ello con la intención de observar el posible procesamiento de estas secuencias intrónicas ligado a la diferenciación del epitelio cervical.

---

# PERSPECTIVAS

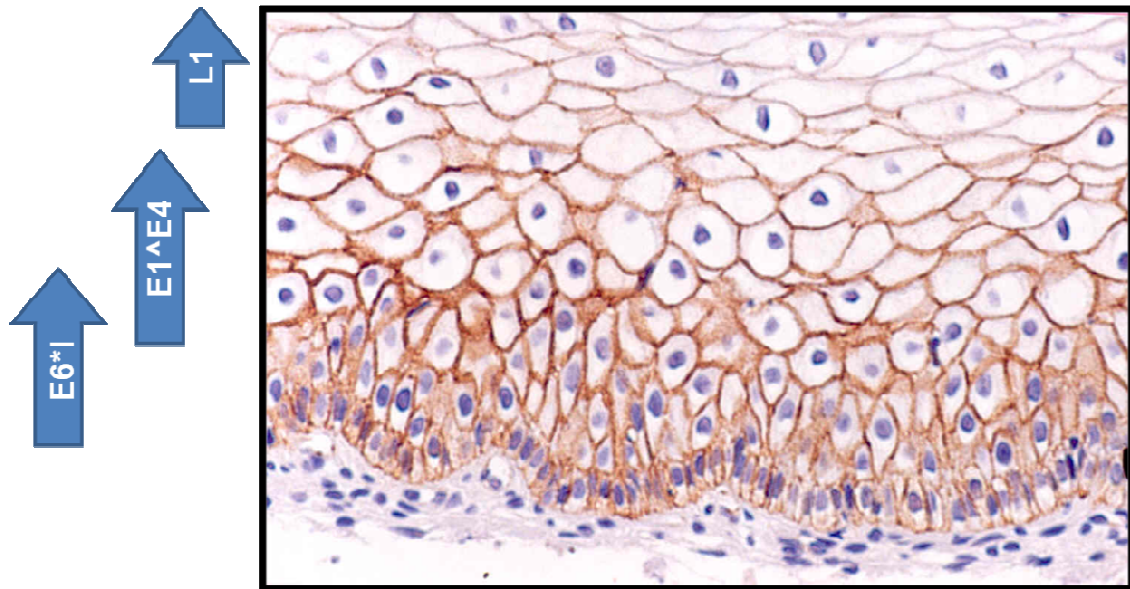
El reportero fluorescente será una excelente alternativa para estudiar otras regiones intrónicas del VPH16, y poder de esta manera caracterizar su capacidad de definir su procesamiento como ocurrió en el caso del intrón E6\*I. Además del intrón de E6\*I, que se estudio en el presente trabajo, existen algunos otros que son de gran importancia dentro de la diversidad de transcritos que presenta el virus. Particularmente el intrón del transcrito E1^E4, que es un transcrito muy importante; y el intrón L1, que pertenece al transcrito más largo producido por el virus y que da origen al marco de la proteína L2, resultan ser de gran interés y se cuenta ya con algunas construcciones que poseen segmentos de estos intrónes. Una primera estrategia que seguiremos será crear versiones más cortas (a las que llamaremos sintéticas) de los intrónes, esto debido a que los intrónes originales son demasiado largos. Esto nos permitirá probar la hipótesis de que podemos observar procesamiento de estos intrónes cuando estos conservan sólo las secuencias involucradas en el procesamiento (sitios 5' y 3', punto de bifurcación, tracto de polipirimidinas) y no el resto de la secuencia. En una segunda estrategia introduciremos los intrónes E1^E4 y L1 completos, y veremos cómo se comportan con respecto al procesamiento. Con estas construcciones ya contamos y estaremos obteniendo conclusiones respecto a estos intrones en el corto plazo.

Uno de los primeros pasos que intentaremos abordar para definir el alcance del reportero, será realizar la introducción de intrónes cuyo procesamiento sea específico de algún tipo celular. Esto con el objetivo de demostrar que podemos observar la fluorescencia de las células solo en aquellas que tengan todos los factores celulares para procesar al intrón. Una alternativa interesante sería buscar intrónes que tuvieran sitios potenciadores o silenciadores de splicing dentro de sus secuencias (conocidos como ISSs o ISEs) y probar que las secuencias son importantes para el reconocimiento del intrón mediante deleciones o mutaciones en esos sitios específicos.

La creación del reportero  $\beta$ -galactosidasa tiene como finalidad principal probar la importancia de algunas secuencias intrónicas del VPH, dentro de la diferenciación del epitelio cervical. Un excelente modelo para ello es el cultivo organotrópico en balsa, (conocido como RAFT cell culture) descrito por Flores et al., 1999[36].

La Figura 32 esquematiza el resultado que esperamos obtener del cultivo RAFT, con la idea de que el procesamiento de estos transcritos y por lo tanto la expresión de la actividad del reportero debería correlacionar con las capas del epitelio donde se ha descrito se producen las diferentes proteínas virales. Así solo en la capa basal y parabasal veríamos la expresión del reportero derivado

del procesamiento de E6\*I (que da lugar a E7). De igual forma ocurriría para los intrones E1^E4 y L1, ya que las proteínas resultantes de su procesamiento solo se producen en las capas suprabasales o en el estrato diferenciado[19].



**Figura 1. Esquematización del modelo in vitro.** Las flechas muestran los diferentes intrones que se estudiarán, y su localización es relativa al estrato del epitelio donde esperamos observar el procesamiento y por lo tanto la actividad del reportero.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Watson, J.D., *Molecular biology of the gene*. 5th ed. 2003, San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings. xxvix, 732 p.
2. Ast, G., *How did alternative splicing evolve?* Nat Rev Genet, 2004. **5**(10): p. 773-82.
3. Patel, A.A. and J.A. Steitz, *Splicing double: insights from the second spliceosome*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(12): p. 960-70.
4. Cubitt, A.B., et al., *Understanding, improving and using green fluorescent proteins*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(11): p. 448-55.
5. Grabowski, P.J., S.R. Seiler, and P.A. Sharp, *A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors*. Cell, 1985. **42**(1): p. 345-53.
6. Choi, Y.D., et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: role in RNA splicing*. Science, 1986. **231**(4745): p. 1534-9.
7. Lamond, A.I., et al., *Spliceosome assembly involves the binding and release of U4 small nuclear ribonucleoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(2): p. 411-5.
8. Sharp, P.A., *Splicing of messenger RNA precursors*. Science, 1987. **235**(4790): p. 766-71.
9. Lamond, A.I., M.M. Konarska, and P.A. Sharp, *A mutational analysis of spliceosome assembly: evidence for splice site collaboration during spliceosome formation*. Genes Dev, 1987. **1**(6): p. 532-43.
10. Toor, N., K.S. Keating, and A.M. Pyle, *Structural insights into RNA splicing*. Curr Opin Struct Biol, 2009. **19**(3): p. 260-6.
11. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
12. Berget, S.M., *Exon recognition in vertebrate splicing*. J Biol Chem, 1995. **270**(6): p. 2411-4.
13. Reed, R., *Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing*. Curr Opin Genet Dev, 1996. **6**(2): p. 215-20.
14. Ziesche, S.M., A.D. Omer, and P.P. Dennis, *RNA-guided nucleotide modification of ribosomal and non-ribosomal RNAs in Archaea*. Mol Microbiol, 2004. **54**(4): p. 980-93.
15. Ricciardi, R.P., et al., *Expression of early adenovirus genes requires a viral encoded acidic polypeptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(10): p. 6121-5.
16. Lopez, A.J., *Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation*. Annu Rev Genet, 1998. **32**: p. 279-305.
17. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 5th ed. 2008, New York: Garland Science.
18. Munoz, N., et al., *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer*. Vaccine, 2006. **24 Suppl 3**: p. S3/1-10.
19. Doorbar, J., *The papillomavirus life cycle*. J Clin Virol, 2005. **32 Suppl 1**: p. S7-15.

20. Bouvard, V., et al., *Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes*. EMBO J, 1994. **13**(22): p. 5451-9.
21. Fang, L., et al., *The human papillomavirus type 11 E1/E4 protein is not essential for viral genome amplification*. Virology, 2006. **351**(2): p. 271-9.
22. Evander, M., et al., *Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses*. J Virol, 1997. **71**(3): p. 2449-56.
23. Giroglou, T., et al., *Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate*. J Virol, 2001. **75**(3): p. 1565-70.
24. Zheng, Z.M. and C.C. Baker, *Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 2286-302.
25. Grassmann, K., et al., *Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA*. J Virol, 1996. **70**(4): p. 2339-49.
26. Oberg, D., et al., *A downstream polyadenylation element in human papillomavirus type 16 L2 encodes multiple GGG motifs and interacts with hnRNP H*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 9254-69.
27. Zhao, X., M. Rush, and S. Schwartz, *Identification of an hnRNP A1-dependent splicing silencer in the human papillomavirus type 16 L1 coding region that prevents premature expression of the late L1 gene*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 10888-905.
28. Rush, M., X. Zhao, and S. Schwartz, *A splicing enhancer in the E4 coding region of human papillomavirus type 16 is required for early mRNA splicing and polyadenylation as well as inhibition of premature late gene expression*. J Virol, 2005. **79**(18): p. 12002-15.
29. Belaguli, N.S., M.M. Pater, and A. Pater, *Nucleotide 880 splice donor site required for efficient transformation and RNA accumulation by human papillomavirus type 16 E7 gene*. J Virol, 1992. **66**(5): p. 2724-30.
30. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J Cell Comp Physiol, 1962. **59**: p. 223-39.
31. Cody, C.W., et al., *Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein*. Biochemistry, 1993. **32**(5): p. 1212-8.
32. Morin, X., et al., *A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15050-5.
33. Sambrook, J. and D.W. Russell, *The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual*. 2006, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. v, 800 p.
34. Jacobsen, K.D. and B.M. Willumsen, *Kinetics of expression of inducible beta-galactosidase in murine fibroblasts: high initial rate compared to steady-state expression*. J Mol Biol, 1995. **252**(3): p. 289-95.

35. Sacchetti, A., et al., *Green fluorescent protein variants fold differentially in prokaryotic and eukaryotic cells*. J Cell Biochem Suppl, 2001. **Suppl 36**: p. 117-28.
36. Flores, E.R., et al., *Establishment of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) life cycle in an immortalized human foreskin keratinocyte cell line*. Virology, 1999. **262**(2): p. 344-54.
37. MacGregor, G.R., et al., *Histochemical staining of clonal mammalian cell lines expressing E. coli beta galactosidase indicates heterogeneous expression of the bacterial gene*. Somat Cell Mol Genet, 1987. **13**(3): p. 253-65.
38. Chalfie, M., *Green fluorescent protein*. Photochem Photobiol, 1995. **62**(4): p. 651-6.
39. Cumming, S.A., et al., *Human papillomavirus type 16 late gene expression is regulated by cellular RNA processing factors in response to epithelial differentiation*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 3): p. 522-4.
40. Mole, S., et al., *Regulation of splicing-associated SR proteins by HPV-16*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 6): p. 1145-7.
41. Somberg, M., et al., *Polypyrimidine tract binding protein induces human papillomavirus type 16 late gene expression by interfering with splicing inhibitory elements at the major late 5' splice site, SD3632*. J Virol, 2008. **82**(7): p. 3665-78.
42. Zhao, X., et al., *Identification of a 17-nucleotide splicing enhancer in HPV-16 L1 that counteracts the effect of multiple hnRNP A1-binding splicing silencers*. Virology, 2007. **369**(2): p. 351-63.
43. Zhao, X., et al., *A 57-nucleotide upstream early polyadenylation element in human papillomavirus type 16 interacts with hFip1, CstF-64, hnRNP C1/C2, and polypyrimidine tract binding protein*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4270-88.
44. Zheng, Z.M., et al., *Splicing of a cap-proximal human Papillomavirus 16 E6E7 intron promotes E7 expression, but can be restrained by distance of the intron from its RNA 5' cap*. J Mol Biol, 2004. **337**(5): p. 1091-108.
45. Tang, S., et al., *The E7 oncoprotein is translated from spliced E6\*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation*. J Virol, 2006. **80**(9): p. 4249-63.
46. Timmons, L., et al., *Green fluorescent protein/beta-galactosidase double reporters for visualizing Drosophila gene expression patterns*. Dev Genet, 1997. **20**(4): p. 338-47.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por ser lo mejor y ayudar a formar en mí lo mejor cada día. Hoy un paso más en mi formación, un logro más, y como siempre la satisfacción eterna de contar con ustedes en todos los mejores momentos. Como siempre ¡gracias!

A mis hermanos, marco, marce y lala. Ustedes siguen siendo un gran impulso en mis logros profesionales, espero continúen preparándose y procurando emular cada día a sus padres y a su hermano.

A mi musa, Tania López. Amor, tu sabes que eres mi inspiración, y que todos los logros y satisfacciones de mi vida irán siempre acompañados de tu presencia. Hoy, estoy un paso más cerca de construir esa felicidad eterna que algún día te prometí. Siempre sigue a mi lado y llegaremos.

Al Dr. Alejandro García Carrancá. Por la inigualable amistad, y la confianza inmensa que ha depositado en mí para confiarme sus más interesantes proyectos personales. Por los excelentes consejos y tutoría que me han permitido formar al naciente investigador que hoy proyecto en mí.

Al Dr. Alejandro Zentella. Por el constante apoyo y consejo durante todo lo que hasta ahora ha sido mi inicio en la investigación. Por ser mi segundo mejor ejemplo del investigador en el que algún día espero convertirme.

A la Dra. Marce Lizano. Por su paciencia, apoyo y consejo durante mi proyecto ayudándome a encontrar la forma y el sentido en mi trabajo.

A los Drs. Marco Cerbón, Luis Felipe Jiménez y Leticia Rocha. Por su invaluable apoyo y su excelente consejo para consolidar mi documento escrito.

A mis compañeros del lab, por ser todas excelentes personas y apoyo durante el desarrollo de mi trabajo, durante mis mejores y peores momentos, siempre demostrando solidaridad. Un agradecimiento mucho más grande a los que me soportaron a pesar de mis fallas y defectos.

A todos los que han formado en mí lo que hoy soy, y puedo ofertar a mi sociedad. Sigamos avanzando juntos.