



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

“Análisis del efecto de las mutaciones en el DBD de la proteína E2 del Virus del Papiloma humano tipo 16 variante Asiático-Americana (HPV16AA), sobre su interacción con la proteína TAFI”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE BIÓLOGO

P R E S E N T A :

CERVANTES PADILLA TANIA EKATHERINA

Director de tesis: Dr. José Efraín Garrido Guerrero.

México 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio No. 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. José Efraín Garrido Guerrero y con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), mediante los fondos del proyecto CB-2004/47244

A mí madre, Itzia I. Padilla Martínez, gracias cuidar de mí y siempre estar al pendiente de mí, TE QUIERO MUCHO MAMÁ, sin tí yo no sería la persona que soy.

Niña morena y ágil, el sol que hace las frutas,
el que cuaja los trigos, el que tuerce las algas,
hizo tu cuerpo alegre, tus luminosos ojos
y tu boca que tiene la sonrisa del agua.

Un sol negro y ansioso se te arrolla en las hebras
de la negra melena, cuando estiras los brazos.

Tú juegas con el sol como un estero
y él te deja en los ojos dos oscuros remansos.

Niña morena y ágil, nada hacia ti me acerca.

Todo de ti me aleja, como del mediodía.

Eres la delirante juventud de la abeja,
la embriaguez de la ola, la fuerza de la espiga.

Mi corazón sombrío te busca, sin embargo,
y amo tu cuerpo alegre, tu voz suelta y delgada.

Mariposa morena dulce definitiva
como el trival y el sol, la amapola y el agua.

Pablo Neruda, *Los veinte poemas*

ODA A LA VIDA

La noche entera
con un hacha
me ha golpeado el dolor,
pero el sueño
pasó lavando como un agua
oscura
piedras ensangrentadas.
Hoy de nuevo estoy vivo.
De nuevo
Te levanto,
vida,
sobre mis hombros.

Oh vida, copa clara,
de pronto
te llenas
de agua sucia,
de vino muerto,
de agonía, de pérdidas,
de sobrecogedoras
telarañas,
y muchos creen
que ese color de infierno
guardarás para siempre.

No es cierto.

Pasa una noche lenta,
pasa un solo minuto
y todo cambia.
Se llena
de transparencia
la copa de la vida.
El trabajo espacioso
nos espera.

De un solo golpe nacen las
palomas.
Se establece la luz sobre la
tierra.

Vida, los pobres
poetas
te creyeron amarga,
no salieron contigo
de la cama
con el viento del mundo.

Recibieron los golpes
sin buscarte,
se barrenaron
un agujero negro
y fueron sumergiéndose
en el luto
de un pozo solitario.

No es verdad, vida,
eres
bella
como la que yo amo
y entre los senos tienes
olor a menta.

Vida,
eres
una máquina plena,
felicidad, sonido
de tormenta, ternura
de aceite delicado.

Vida,

eres como una viña:
atesoras la luz y la
repartes
transformada en racimo.

El que de ti reniega
que espere
un minuto, una noche,
un año corto o largo,
que salga
de su soledad mentirosa,
que indague y luche, junte
sus manos a otras manos,
que no adopte ni halague
a la desdicha,
que la rechace dándole
forma de muro,
como a la piedra los
picapedreros,
que corte la desdicha
y se haga con ella
pantalones.

La vida nos espera
a todos
los que amamos
el salvaje
olor a mar y menta
que tiene entre los senos.

Pablo Neruda

AGRADECIMIENTOS

A mi madre y a mi padre MUCHAS GRACIAS por traerme a este mundo y en general a mi Familia gracias por todo su apoyo.

Quiero agradecer al Dr. Efraín Garrido Guerrero, por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, en donde tuve la oportunidad de conocer gente magnífica. Eric, Vania, Ángeles, Pedro, Karen, Jairo y Guillermo, fue un gusto poder trabajar con ustedes.

M. en C. Eric Ramírez Salazar, gracias por tu infinita paciencia y sabiduría, no lo hubiera podido hacer sin ti, siempre serás “Teacher Eric” para mí. MUCHAS GRACIAS ☺.

También quiero agradecer a mis amigos, los cuales me ayudaron, me apoyaron, me regañaron y curaron todas mis heridas durante todo el tiempo que llevamos de conocernos, les agradezco de todo corazón que formen parte de mi vida, así que:

Viridiana: Por ser honesta conmigo y depositar en mi toda tu confianza.

Eber: Por la confianza y el infinito cariño.

Paulina: Mi querida tuna, gracias por TODO.

Noemí: Por tu paciencia y cariño.

Vania: Por los consejos, por hacer de mí una mejor persona, gracias amiga.

Christian: Por dejarme ser tu niña.

Jorge: Por formar parte de mi vida y estar siempre presente. TE QUIERO GORDO.

ÍNDICE

ÍNDICE	7
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	12
Cáncer cérvico-uterino (CaCU)	12
Historia del Virus del Papiloma Humano	13
Características del Virus del Papiloma Humano	15
Ciclo replicativo del HPV.....	18
Clasificación de los Virus del Papiloma Humano	21
Variante Asiático-Americana de HPV16	25
Proteína E2	26
TAF1	31
ANTECEDENTES	35
HIPÓTESIS	39
OBJETIVOS	40
Objetivo General	40
Objetivos Particulares	40
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	42
METODOLOGÍA	43
Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina	43
Transformación bacteriana	44
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	44
Inducción de la expresión de proteínas	45
Captura de proteína de fusión	46
Inmunodetección de la proteína de fusión en fase sólida (WESTERN-BLOT)	46
Ensayos de transcripción-traducción acopladas	47
Ensayos de interacción <i>in vitro</i> (GST PULL-DOWN)	47
RESULTADOS	50
1.- Generación de la construcción pGEX-E2HPV16AAM3, para la expresión de proteína E2 de HPV16 de la variante AAcM3.	50
2. Expresión y captura de la proteína E2 del HPV16 de la variante AAcM3	54
3. Producción de hTAF1-N marcada radioactivamente <i>in vitro</i>	60

4. Análisis de la Interacción entre hTAF1-N y las proteínas E2HPV16AA y E2HPV16AAM3	61
DISCUSIÓN	65
CONCLUSIÓN	70
BIBLIOGRAFÍA	72

ABREVIATURAS

- ♣ CaCU: Cáncer cérvico-uterino.
- ♣ HPV: Virus de Papiloma Humano.
- ♣ ORFs: Marcos abiertos de lectura.
- ♣ LCR: Región Larga de Control.
- ♣ E: HPV-16 variante Europea.
- ♣ AA: HPV-16 variante Asiático-Americana.
- ♣ E2E: Proteína E2 del HPV-16 v. Europea.
- ♣ E2AA: Proteína E2 del HPV-16 v. Asiático-Americana. .
- ♣ E2AAM3: Proteína E2AA con las mutaciones puntuales N296A, K299A y R304A.
- ♣ TAD: Dominio de transactivación de la proteína E2.
- ♣ HD: Dominio bisagra de la proteína E2.
- ♣ DBD: Dominio C-terminal o dominio de unión al DNA de la proteína E2.
- ♣ E2BSs: Sitios de unión de E2 al DNA.
- ♣ BPV-1: Virus de Papiloma Bovino tipo 1.
- ♣ TBP: Proteína de unión a la caja TATA.
- ♣ CBP: Proteína de unión a CREB.
- ♣ p/CAF: Factor asociado a p300/CBP.
- ♣ PIC: Complejo de pre-iniciación de la transcripción.
- ♣ TFIID: Factor de transcripción IID.
- ♣ TAFs: Factores de la transcripción asociados a la proteína TBP.

♠ TAF1: Subunidad más grande del complejo TFIID.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Cáncer cérvico-uterino (CaCU)

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) es el segundo cáncer más común entre mujeres alrededor del mundo, principalmente en los países subdesarrollados y la principal causa de muerte en mujeres (García-Carrancá y Gariglio, 1993). México tiene uno de los más altos índices de cáncer cérvico-uterino (50 casos por 100,000 mujeres) y 16,000 nuevos casos detectados cada año (Berumen *et al.*, 2001).

El CaCU se presenta principalmente entre mujeres con vida sexual activa, además de co-factores como el uso de anticonceptivos orales, tabaco e infección con *Clamidia* y otros parásitos (García-Carrancá y Gariglio, 1993). Sin embargo se considera una enfermedad de transmisión sexual, aunque no exclusiva, cuyo agente etiológico es el Virus del Papiloma Humano (HPV) (Figura 1). Los tipos de HPV más oncogénicos son el HPV16 que se encuentra en 50-70% de los casos y el HPV18 que se encuentra en 2-20% de los casos (Stanley *et al.*, 2001).

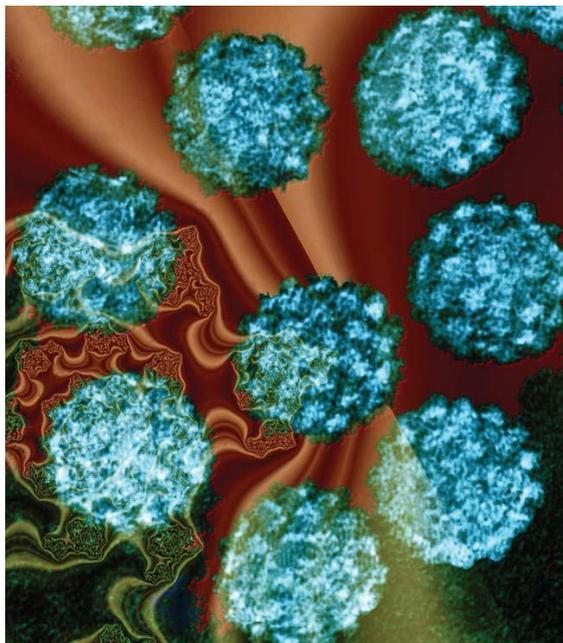


Figura 1. Micrografía electrónica de la estructura de la cápside de partículas de HPV-16. Tomado de Burns y Maitland, 2005.

Este tipo de cáncer surge a partir de las células epiteliales del cérvix y el útero. Existen dos tipos de cáncer cervical, la forma más común es el carcinoma cervical de las células escamosas (son las células del bajo cérvix) y los adenocarcinomas, que constituyen aproximadamente el 10-15% de todos los cánceres cervicales y comienza en las células glandulares cervicales (Moberg, 2004). El CaCU es el primer cáncer reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que le atribuye el 95% a la infección del HPV (Bosch *et al.*, 2002).

Para el periodo de 1990 a 2000 se reportaron oficialmente un total de 48,761 defunciones por cáncer cérvico-uterino en México, iniciando en 1990 con 4,280 muertes en el año y terminando con 4,620 en el 2000, lo que representa en promedio 12 mujeres fallecidas cada 24 horas, con un crecimiento promedio anual de los casos absolutos de mortalidad por cáncer cérvico-uterino de 0.76% (Palacio-Mejía *et al.*, 2003).

La vía de transmisión de HPV es de persona a persona por contacto directo con áreas de la piel contaminadas. Los HPV genitales se transmiten básicamente por vía sexual, aunque se han sugerido otro tipo de vías, como el instrumental y ropa contaminada. Además se ha reportado la transmisión vía placentaria en hijos nacidos por parto natural de pacientes portadoras del virus produciendo papilomas laríngeos (Cortes-Gutiérrez y Leal-Garza, 2001).

Historia del Virus del Papiloma Humano

En 1959 Stone y cols. realizaron el primer aislamiento del virus del papiloma, a partir de un corte histológico de tumor de conejo que fue mantenido en glicerina por un año, comprobando que el virus de papiloma se puede ubicar en estratos celulares donde exista poca presencia de queratina, también establecieron que el virus empieza su proliferación en el nucléolo de las células infectadas.

El nombre de la familia Papovavirus fue otorgado por Melnick en 1962 por ser un grupo que presentaba un DNA pequeño con características oncogénicas muy similares. En 1964 Herber y Morgan, cultivaron cortes de tejido obtenido de condiloma de mujer, que revelaron un aumento en la densidad celular, generado por la formación de capas múltiples de tejido, que hicieron pensar la existencia de fases en proliferación en la lesión preexistente. (Morgan y Balduzzi, 1964).

Zur Hausen H. (1976) fue el primero en relacionar y estudiar al Papilomavirus Humano (HPV) como agente causal de cáncer del cuello uterino. En 1977 se aislaron a partir de papilomas de la mano de un hombre, dos tipos de DNA, tenían el mismo peso molecular sin embargo los dos virus tenían polipéptidos electroforéticamente diferentes y no mostraron ninguna reacción antigénica por inmunodifusión o por técnicas de inmunofluorescencia similar (Orth y Favre, 1977).

En 1980 Heilman y cols. utilizando *E. coli* transformadas con un plásmido certificado (PBR322), pudieron determinar diferencias en el DNA de los subtipos del papiloma humano, HPV-1a, HPV-1b, HPV-2a, y el HPV-4, determinando desigualdades del 30% aproximadamente. Posteriormente se mostró que el polipéptido E7 del HPV es una oncoproteína nuclear biológicamente activa, y que posee dos dominios funcionales; el primero que induce la síntesis del DNA celular y el segundo activa a la proteína E1A de adenovirus (encargado de la iniciación de la replicación del DNA) e induce al promotor del gen E2 del mismo virus (encargado de la regulación transcripcional y replicación del DNA). Siendo cada dominio autónomo y capaz de funcionar en péptidos separados (Rawls *et al.*, 1990).

En Noviembre de 1991 la Organización Mundial de la Salud (OMS), basada en estudios epidemiológicos y datos de laboratorio, determinó oficialmente al papilomavirus como agente asociado al desarrollo de cáncer cervical. De igual forma se han instaurado programas de prevención en las mujeres de todo el mundo, haciéndolas conocedoras de la importancia de que se realicen citologías vaginales periódicamente (Bosch *et al.*, 1992).

Características del Virus del Papiloma Humano

Los HPV pertenecen a la familia Papillomaviridae cuyos miembros pueden infectar desde aves hasta mamíferos. Son virus pequeños de 50-56 nm de diámetro, con una cápside icosaédrica formada por 72 capsómeros sin envoltura. La cápside consta de dos proteínas, la proteína L1 de 55 kDa y L2 de 75 kDa. Su genoma es de DNA de doble cadena, de aproximadamente 8000 pares de bases de longitud [7904 pares de bases para HPV16 (GeneBank accession number NC_001526)] (Seedorf *et al.*, 1985; Moberg, 2004; Burns y Maitland, 2005; Muñoz *et al.*, 2006).

Su genoma se puede dividir en tres zonas, la región larga de control (LCR), la región temprana (E), y la región tardía (L) (Wolf y Ramírez, 2001). La región LCR corresponde al 15% del genoma viral y contiene los promotores que inician la replicación y controlan la transcripción. Esta región se encuentra dividida en dos dominios principales: el primero es regulado por la presencia de la proteína viral E2 y donde se localiza el origen de replicación del ADN viral, el promotor temprano; y el dominio CE (celular enhancer), un fuerte potenciador de la transcripción que depende exclusivamente de factores transcripcionales celulares (Munger, 2004).

En este dominio se encuentra el promotor temprano a partir del cual se transcriben los oncogenes E6 y E7, y posee sitios de interacción para la proteína viral E2, además de sitios de unión para el factor celular Sp1 (proteína estimulante de la transcripción). En este dominio se ha descrito el origen de replicación del DNA viral, dependiente de la presencia de las proteínas virales E1 y E2. La especificidad tisular de los papilomavirus reside en el CE, donde la participación conjunta de factores celulares promueve la actividad del promotor temprano exclusivamente en células de origen epitelial (Figura 2) (Schweigner *et al.*, 2006; Spalholtz *et al.*, 1985).

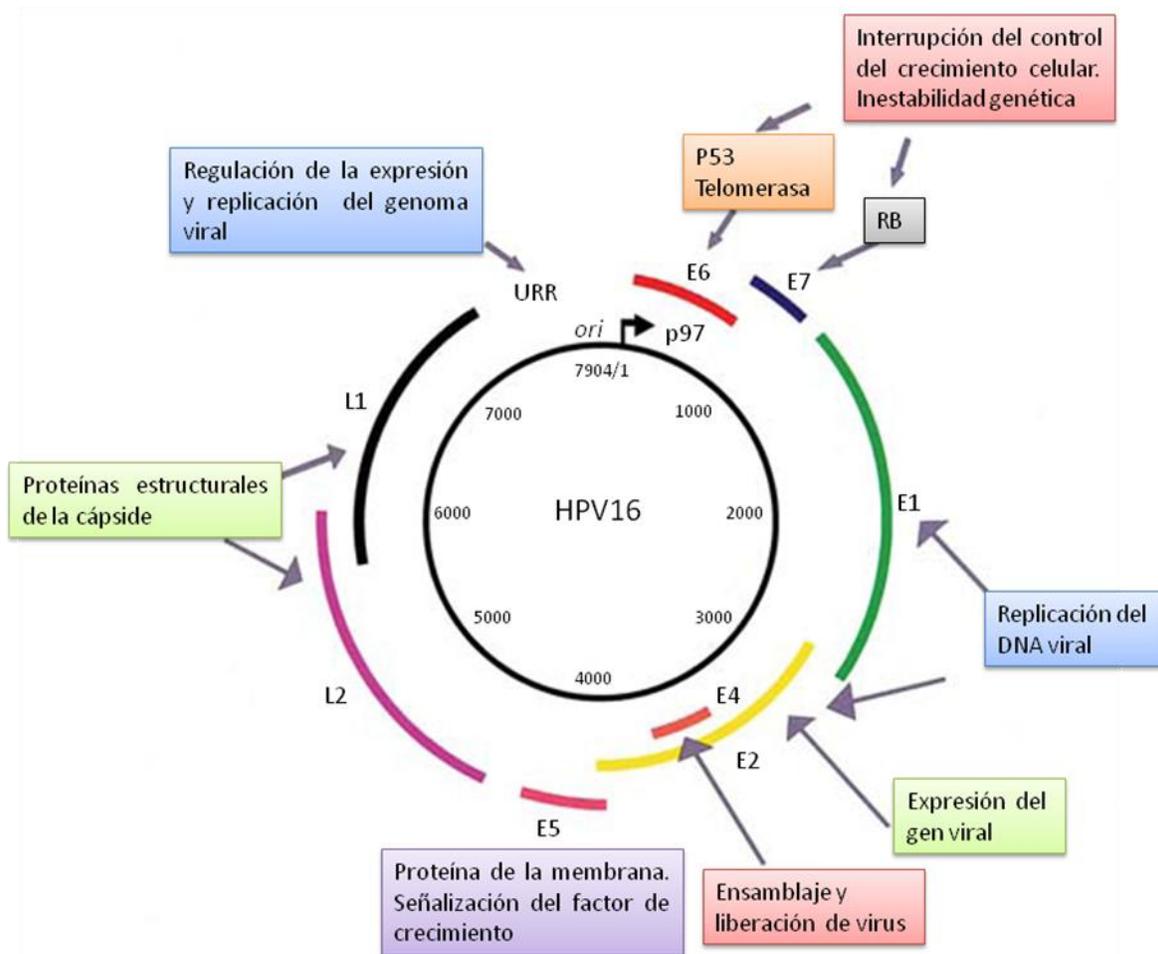


Figura 2. Genoma de HPV16 y función de las proteínas. Modificado de Burns y Maitland, 2005.

La región temprana (E) representa el 45% del genoma y contiene 7 marcos de lectura abierta que codifican para proteínas no estructurales, cada una con funciones diferentes (Tabla 1), que en conjunto tienen la función de controlar la replicación del DNA e inducir la transformación maligna de la célula huésped: E1 controla la replicación episomal del DNA, a través de la codificación de un modulador y de un factor de replicación. Mientras que esta zona del genoma se encuentre completa y funcional se produce una replicación normal, evitando la integración del DNA al genoma de la célula (Calixto, 2005).

Tabla 1. Funciones principales de las proteínas del HPV

ORF	Tamaño (aa)	Función
E1	649	Replicación del genoma viral.
E2	365	Regulación de la replicación en colaboración con E1, también regula la transcripción y segregación del genoma viral.
E4	92	Rompimiento de la matriz de citoqueratina en el citoesqueleto para liberar los viriones generados
E5	83	Posible interacción con vías de señalización de factores de crecimiento. Modifica la permeabilidad de la membrana plasmática.
E6	151	Transformación e inmortalización, se une a p53.
E7	98	Transformación y regulación de la transcripción, se une a pRb bloqueando su función.
L1	531	Proteína principal de la cápside.
L2	473	Proteína secundaria de la cápside.
LCR		Contiene secuencias reguladoras y origen de replicación del genoma viral.

Se sabe que el gen E2 codifica para un factor represor de transcripción que inhibe la transcripción del promotor p97, el cual dirige la síntesis de E6 y E7. El gen E4 produce proteínas que intervienen en la maduración de las partículas virales. Este gen se pierde cuando se integra el DNA viral al genoma de la célula. El gen E5 produce una pequeña proteína de 44 aminoácidos que se une a la membrana citoplasmática (Wells *et al.*, 2000). La pérdida o mutación de esta región, evita la replicación episomal del DNA y favorece la integración del DNA al cromosoma. Las regiones E6 y E7 producen dos oncoproteínas transformantes más importantes.

La región tardía (L), corresponde al 40% del genoma y contiene dos genes que codifican para proteínas estructurales de la cápside: L1, produce una proteína de 54,000 d que se produce a mayor cantidad y L2 que produce una menor cantidad de proteína, y es específica para cada tipo viral (Calixto, 2005).

La carcinogénesis de los HPV genitales es compleja y depende en gran parte de factores de la célula huésped. El virus en la fase temprana del ciclo produce las oncoproteínas E6 y E7, las cuales interactúan con los reguladores celulares p53 y Rb respectivamente inactivándolos. Debido a que estos dos genes participan de manera importante en el control del ciclo celular, estos eventos favorecen el crecimiento descontrolado de las células y la transición maligna en el cáncer cervico-uterino. Más tarde se producen las proteínas E1 y E2, esenciales para la replicación del genoma viral.

También se sabe que los oncogenes E6 y E7 pueden ser regulados negativamente, dependiendo de la presencia de la proteína E2. E2 se une a LCR que regula la expresión de las proteínas E6 y E7 y ocasiona su represión. Generalmente, después de una infección por papilomavirus, su DNA se integra al genoma celular y ocasiona la destrucción del gen E2, y como resultado da lugar a que se produzcan las proteínas E6 y E7, las proteínas tardías L1 y L2 y al ensamble viral.

Ciclo replicativo del HPV

Es muy importante el entendimiento del ciclo de replicación del virus del papiloma humano, para poder comprender la patogénesis e inmunobiología del mismo. Nuestro conocimiento acerca de este proceso es limitado debido a la inhabilidad de infectar con el virus completo a células en medio de cultivo y completar satisfactoriamente el ciclo infeccioso *in vitro* (Stanley *et al.*, 2001).

La infección por HPV ocurre solamente en células basales del epitelio que pueden dividirse en estas, el virus no se replica y permanece en estado latente. Para que los papiloma virus puedan penetrar e iniciar un proceso infeccioso se requiere una continuidad de tejidos, de manera que el virus pueda ponerse en contacto con las células basales de los epitelios (Moberg, 2004; Cortes-Gutiérrez y Leal-Garza, 2001).

El ciclo del HPV inicia cuando los viriones atraviesan el epitelio cervical hasta la capa basal, mediante ligeras abrasiones o micro lesiones, en la capa basal se da la adhesión y penetración de los viriones a las células (Muñoz *et al.*, 2006). El epitelio cervical es característico por su constante pérdida y renovación de células, por lo tanto el HPV tiene que llegar a las células basales para evitar ser eliminados con la muda de las células escamosas. Las células basales están situadas sobre la membrana basal y son las células madre del epitelio (Giroglou *et al.*, 2001).

A medida que las células epiteliales se diferencian, el DNA viral se replica, se transcribe y forma viriones completos. Durante la diferenciación celular, las células se vuelven cada vez más permisivas para la replicación viral (García-Carrancá y Gariglio, 1993).

Una vez adentro de las células basales, los HPV transfieren su genoma dentro del núcleo quedan establecidos como elementos extra cromosómicos. El número de genomas de HPV es incrementado a aproximadamente 50-100 copias, los cuales subsecuentemente se replican en promedio una vez por célula (Stanley *et al.*, 2001), usando la maquinaria de replicación de DNA de la célula hospedera. Dicho proceso permite el mantenimiento del genoma viral de manera episomal en el estrato basal; en esta etapa son indispensables las proteínas virales E1 y E2 (Gilbert y Cohen, 1987; Flores y Lambert, 1997; Muñoz *et al.*, 2006).

Mientras permanecen en la capa basal del epitelio, el HPV mantiene su producción de proteínas al mínimo. Se expresan principalmente E6 y E7 en las células basales, para modificar el entorno celular con el fin de facilitar la replicación viral cuando la célula infectada se diferencia en queratinocitos (Moberg, 2004). Después la proteína E5 es la encargada de elevar los niveles del factor mitogénico EGF, el cual incrementa la proliferación de células basales y retrasa su diferenciación. Esto sirve con el propósito de aumentar el número de células infectadas. Después de la infección, las células infectadas con HPV migran a la superficie del epitelio y en ellas se ensamblan

los viriones para que estos infecten a más células. Este proceso se puede observar en la figura 3 (Straight *et al.*, 1995; Moberg, 2004).

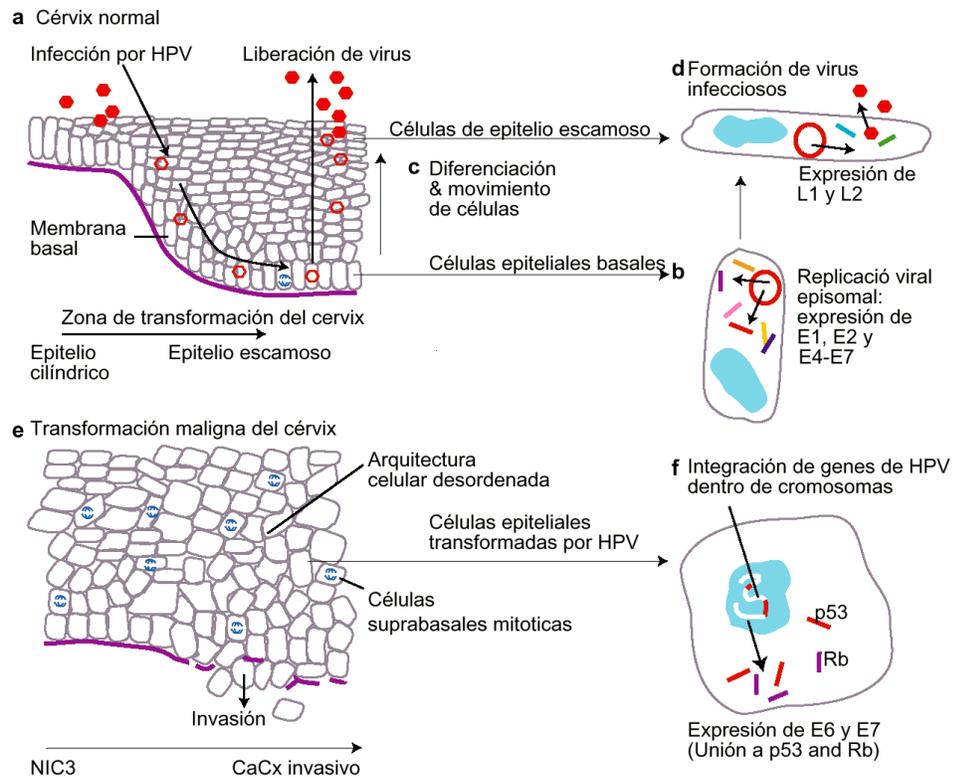


Figura 3. Infección por HPV y replicación en células epiteliales cervicales. El ciclo replicativo del virus está íntimamente ligado al proceso de diferenciación del epitelio cervical para la producción de virus infecciosos, así como un proceso de transformación maligna.

Estos eventos son iniciados por la expresión de E1 y E2. E2 reprime la expresión de E6 y E7, lo que provoca que la célula hospedera haga un alto en la proliferación, que se diferencie en queratinocitos y se mueva a la capa supra basal del epitelio. Como la expresión de E6 y E7 es reducida, E1 se une a la LCR y recluta la maquinaria de replicación del DNA de la célula hospedera, la cual comienza a replicar el genoma de HPV como un ciclo (Flores y Lambert, 1997). Cuando los queratinocitos infectados alcanzan la capa superior del epitelio, el HPV empieza a expresar E4, L1 y L2, los cuales son utilizados para el ensamblaje viral. Las partículas virales son producidas en abundancia y esparcidas por contacto para repetir el ciclo en la siguiente célula hospedera (Doorbar *et al.*, 1980; Palesky *et al.*, 1991; Moberg, 2004).

Durante todo este proceso la DNA polimerasa y los factores de replicación virales son producidos únicamente en células mitóticas activas; para resolver este problema el virus codifica unas proteínas que activan la síntesis del DNA celular en células sin ciclo activo, inhibiendo la apoptosis y retrasando la diferenciación de los queratinocitos infectados, creando un estado permisivo para la replicación del DNA viral, lo cual ocasiona una desregulación, junto con los genes E6 y E7, en el crecimiento desmesurado de células infectadas y por lo tanto comienza el desarrollo de cáncer (Stanley *et al.*, 2001).

Clasificación de los Virus del Papiloma Humano

Actualmente se han identificado más de 100 genotipos del HPV, asociados con infección en sitios específicos del epitelio y al menos 50 de estos son infecciosos para la mujer en el tracto anogenital (Doorbar, 2006). Muchos de estos tipos de HPV son ubicuos y están distribuidos globalmente (de Villers *et al.*, 2004). Los trece tipos mucotróficos del HPV (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, y 66) recientemente han sido clasificados como clase I carcinogénicos para los seres humanos (Cortes-Gutiérrez y Leal-Garza, 2001).

Los HPV están divididos en tipos y variantes, dependiendo de la homología de su secuencia. El ORF de L1 es el más conservado en el genoma de HPV, por lo que ha sido usado para la identificación de nuevos tipos de papilomavirus desde hace más de 15 años (de Villers *et al.*, 2004; Stanley *et al.*, 2001).

Si dos HPV difieren en más del 10% en el gen L1, son considerados como tipos diferentes de papilomavirus. Si la homología es de 2-10%, son subtipos y si es menos del 2% es una variante. Esta definición fue acordada por los científicos que trabajaban con taxonomía y diagnóstico de papilomavirus (de Villers *et al.*, 2004). Los HPV datan desde antes de la aparición del *Homo sapiens* y la migración fuera de África, esto se

sabe debido a la tasa baja de mutación combinada con la heterogeneidad sustancial de los HPV's (Moberg, 2004).

A pesar de su amplia distribución, muestran un alto grado de tropismo celular, es decir únicamente infectan epitelios secos (piel) y mucosas (orales y genitales) induciendo la formación de lesiones benignas (verrugas o papilomas), que crecen en el cérvix, vagina, vulva y ano en la mujer, mientras que en el hombre crecen en el pene, escroto y ano (Cutts *et al.*, 2007); en los que en asociación con ciertos co-factores pueden producir carcinomas (Tornesello *et al.*, 2007; Cortés y Leal, 2001; de Villers *et al.*, 2004).

Los dos géneros principales son el Alfa y Beta papilomavirus. Los Beta papilomavirus están generalmente asociados con infecciones cutáneas inaparentes en humanos, pero en personas inmunocomprometidos y pacientes que sufren alguna enfermedad heredada relacionada a la epidermis, estos virus se pueden esparcir libremente y en asociación convertirse en un desarrollo de melanoma benigno de cáncer de piel (Harwood y Proby, 2002; Pfister, 2003; de Villers *et al.*, 2004). Los Alfa papilomavirus son el grupo más grande de HPV, dentro de este grupo están los tipos de HPV genitales y de mucosas. Más de 30 tipos diferentes de HPV son conocidos por infectar el epitelio cervical, por lo tanto están asociados con lesiones que pueden desarrollar cáncer (Figura 4) (de Villers *et al.*, 2004; Doorbar, 2006).

Estos Alfa papilomavirus asociados al cáncer son clasificados como tipos de alto riesgo en la población y son responsables del 50% de los canceres cervicales. Los tipos de HPV que quedan son clasificados como intermedios o de bajo riesgo, dependiendo de la frecuencia con la que inducen cáncer. Los HPV de bajo riesgo como el HPV11, están asociados con cáncer cervical muy rara vez, pero son muy importantes medicamente, ya que son los causantes de la verrugas genitales. Las verrugas genitales son una enfermedad transmitida sexualmente en muchos países y afecta al 1-2% de los jóvenes adultos (Persson *et al.*, 2004; Doorbar, 2006).

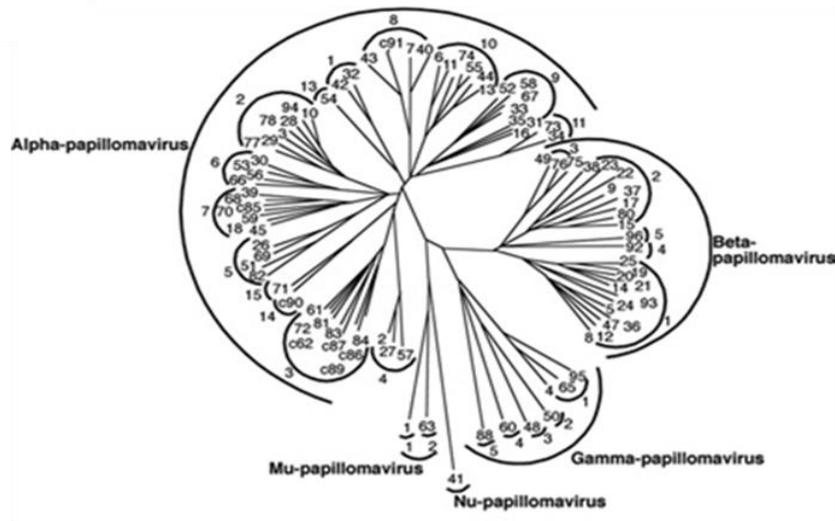


Figura 4. Grupos evolutivos de los HPV. Los HPV que infectan el cérvix pertenecen al grupo alfa, el cual contiene más de 60 tipos de virus. Los HPV de los grupos beta, gamma, mu y nu están asociados a infecciones cutáneas. Modificado de Doorbar, 2006.

De todos los tipos descritos de HPV, los tipos 16, 18, 33 y 35 se han encontrado en 90% de los carcinomas invasores, de estos casos, el 50-90% corresponden a los tipos 16 y 18 (el tipo 16 es tres veces más frecuente que el tipo 18) (García-Carrancá y Gariglio, 1993). Generalmente, HPV18 ha sido asociado a los adenocarcinomas y HPV16 a los carcinomas de células escamosas (Figura 5) (Berumen *et al.*, 2001).

Asociación de alfa papilomavirus con cáncer cervical

Genus + Species	Type Species	SCC Cervix	Adeno Cervix	Category
Alpha 1	HPV32			low risk
	HPV42			low risk
Alpha 2	HPV3			cutaneous
	HPV10			cutaneous
	HPV28			cutaneous
	HPV29			cutaneous
	HPV77			cutaneous
	HPV78			cutaneous
	HPV94			cutaneous
Alpha 3	HPV61			low risk
	C62			
	HPV72			low risk
	HPV81	0.04%		low risk
	HPV83	0.04%		low risk
	HPV84			low risk
	C86			
	C87			
	C89			
Alpha 4	HPV2			cutaneous
	HPV27			cutaneous
	HPV57			cutaneous
Alpha 5	HPV26	0.22%		high risk
	HPV51	0.75%	0.54%	high risk
	HPV69			
	HPV82	0.26%		high risk
Alpha 6	HPV30			
	HPV53	0.04%		high risk
	HPV56	1.09%		high risk
	HPV66	0.19%		high risk
Alpha 7	HPV18	11.27%	37.30%	high risk
	HPV45	5.21%	5.95%	high risk
	HPV59	1.05%	2.16%	high risk
	HPV39	0.82%	0.54%	high risk
	HPV68	0.37%		high risk
	HPV70			
	C85			
Alpha 8	HPV7			cutaneous (mucosal)
	HPV40			cutaneous (mucosal)
	HPV43			cutaneous (mucosal)
	C91			
Alpha 9	HPV16	54.38%	41.62%	high risk
	HPV31	3.82%	1.08%	high risk
	HPV33	2.06%	0.54%	high risk
	HPV35	1.27%	1.08%	high risk
	HPV52	2.25%		high risk
	HPV58	1.72%	0.54%	high risk
	HPV67			
Alpha 10	HPV6	0.07%		low risk
	HPV11	0.07%		low risk
	HPV13			low risk
	HPV44			low risk
	HPV55	0.04%		low risk
	HPV74			
Alpha 11	HPV34			high risk
	HPV73	0.49%		high risk
Alpha 12				
Alpha 13	HPV54			low risk
Alpha 14	C90			low risk
Alpha 15	HPV71			low risk

Figura 5. Los alfa papilomavirus están divididos en tres categorías (alto riesgo, bajo riesgo y cutáneos), dependiendo de su prevalencia en la población y la frecuencia con la que causan cáncer. Los HPV de alto riesgo son los que aparecen en rojo, los papiloma virus de bajo riesgo son los que se encuentran en verde y los cutáneos son los que están en negro. Modificado de Doorbar, 2006.

Existen diferentes variantes de HPV16 las cuales se encuentran distribuidas alrededor del mundo y se han designado de acuerdo a su distribución geográfica: Asiático-Americano (AA) se encuentra principalmente en España, Centro y Sudamérica; Africanos (Af), (Af1), (Af2) principalmente en África; Asiáticos (As), (AAa), (AAc) principalmente en el sur de Asia; Europeo (E) se encuentra en todas las regiones

excepto África y Norte Americano (NA) en E.E.U.U y Canadá (Figura 6) (Berumen *et al.*, 2001 y Yamada *et al.*, 1997).

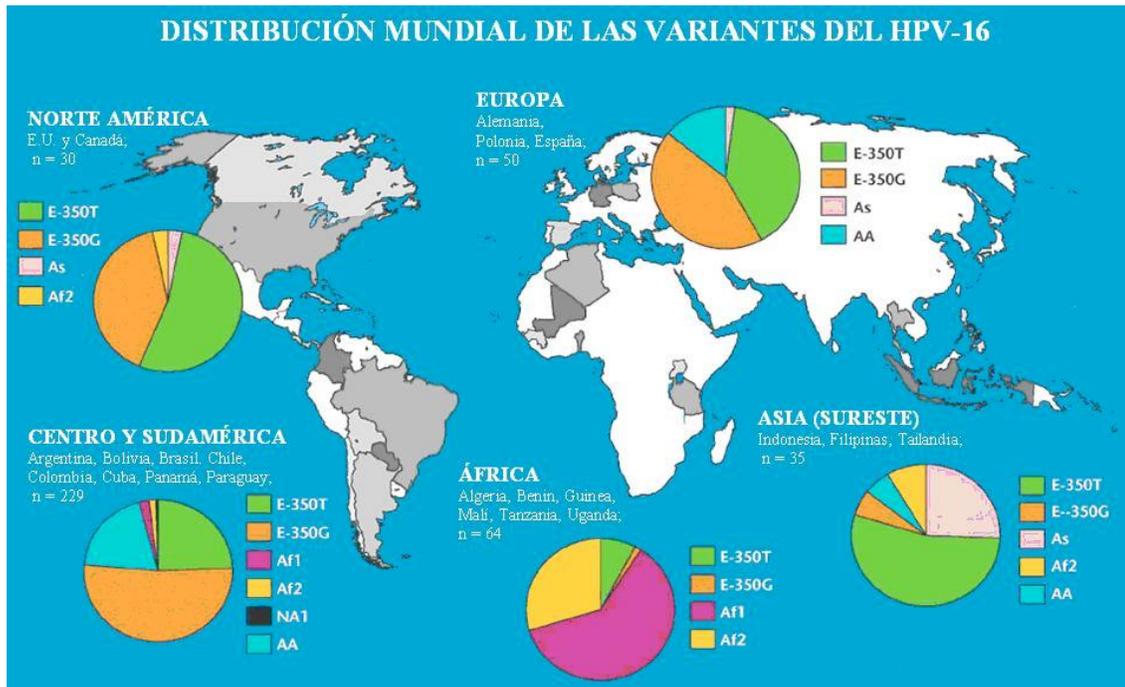


Figura 6. Distribución mundial de las variantes del HPV-16. Modificado de Yamada *et al.*, 1997

Variante Asiático-Americana de HPV16

Berumen y cols. han demostrado que las variantes de HPV16AA son frecuentemente detectadas en pacientes mexicanas con cáncer cérvico-uterino, y que en estas variantes el gen E2 contiene importantes cambios en sus nucleótidos, así mismo las células infectadas por él, tienen un gran número de copias virales que mantienen a los genes E1 y E2 intactos.

Se ha visto que las variantes de HPV16AA son más oncogénicas, además de haber una mayor incidencia en México que en el resto del mundo, que las variantes de HPV16E, por lo tanto se puede decir que casi un cuarto de todos los cánceres cervicales en México son atribuidos a las variantes AA. La variante AA-c es la que se encuentra con más frecuencia en México, esto probablemente se deba a las diferencias étnicas y genéticas de la población mexicana (Casas *et al.*, 1999). La alta

oncogenicidad observada en las variantes AA probablemente se deba al incremento en la actividad neoplásica de los oncogenes E6 y E7, una mayor eficiencia en la replicación viral, una mejor estimulación de los genes tempranos en la expresión genética y/o una mejor degradación de p53 (Stöppler *et al.*, 1996; Berumen *et al.*, 2001 y Ordoñez *et al.*, 2004).

El gen E2 en estas variantes contiene 24 cambios en la secuencia de nucleótidos que se reflejan en 18 cambios en la secuencia de aminoácidos en la proteína como se muestra en la figura 7. Estos cambios son de gran interés para definir las alteraciones que pueden interferir con las propiedades funcionales o antigénicas de las proteínas virales específicas (Ramírez-Salazar, 2005). Por lo tanto, las diferencias estructurales encontradas en las proteínas E2 de las variante AA y E podrían tener un efecto sobre la actividad como reguladoras de la transcripción o sobre su interacción con diferentes proteínas celulares.

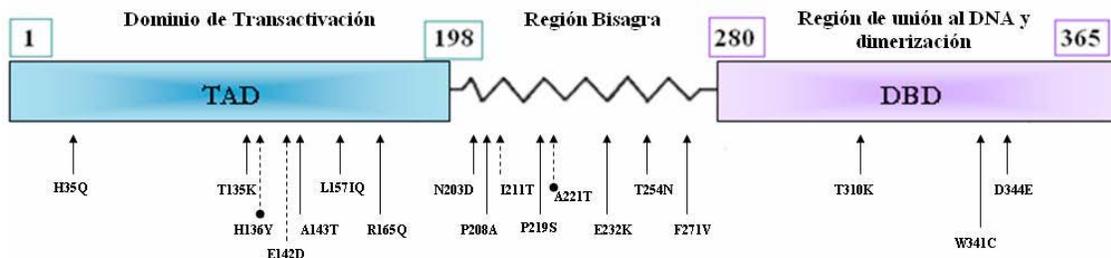


Figura 7. Cambio de aminoácidos en la proteína E2 de la variante Asiático-Americana de HPV-16. Localización de 18 cambios de aminoácidos entre las proteínas E2 del HPV-16 variantes AA y E. Los cambios entre E y AA están señalados por las flechas negras continuas. Los cambios entre E y AA-c se encuentran señalados por una flecha discontinua con un punto al final. Finalmente el cambio entre E y AA-a se encuentra señalado por una flecha discontinua. Tomado de Campos-León, 2008.

Proteína E2

El ORF E2 cuya longitud es de 1,098pb, codifica para una proteína de aproximadamente 45kDa formada por 365 aminoácidos (Tan *et al.*, 1994). La proteína E2 tiene funciones regulatorias en la transcripción viral y replicación del DNA viral. La estructura de la proteína E2 está conformada por tres partes, las cuales tienen

características y funciones diferentes. Un dominio de transactivación (TAD) o N-terminal de aproximadamente 200 aminoácidos, seguido por una región flexible conocida como bisagra (HD) y un dominio de unión al DNA (DBD) o C-terminal de aproximadamente 100 aminoácidos (Figura 8) (Anston *et al.*, 2000; Blachon y Demeret, 2003).

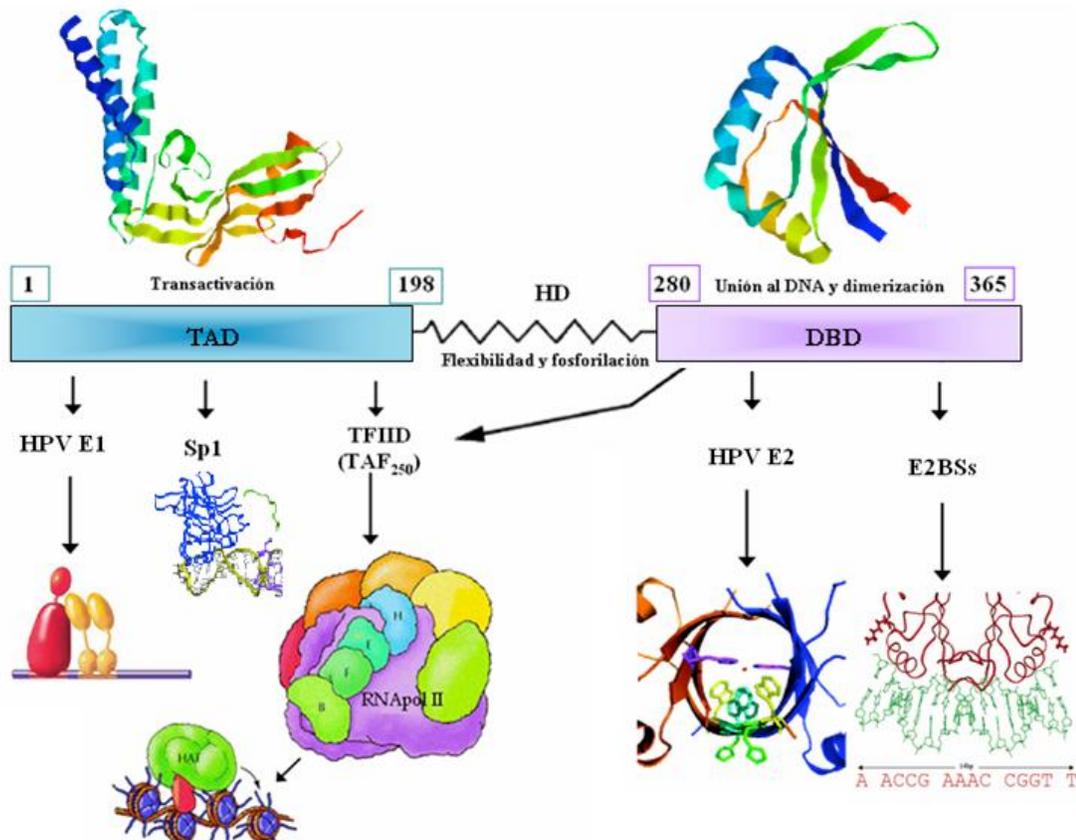


Figura 8. Estructura de la proteína E2 del HPV-16 y algunas de las interacciones que establece a través de sus diferentes dominios. Tomado de Campos-León, 2008

El TAD contiene dos subdominios estructurales, un dominio anti-paralelo compuesto por los primeros 92 aminoácidos que constituyen las tres α -hélices anti paralelas unidas por “loops” y un dominio de láminas- β -unidas formado a partir de los aminoácidos 110 al 201; en este dominio se encuentra la señal de ubiquitinación responsable de la degradación de E2. Estos dominios están separados por dos vueltas sencillas consecutivas de estructura helicoidal, que forman un fulcro, el cual se aprieta fuertemente contra los dominios (Anston *et al.*, 2000; Blachon y Demeret, 2003). El TAD es el responsable de la interacción con los factores de transcripción, virales y celulares,

tales como Sp1, TFIIB y AMF-1 (Anston *et al.*, 2000), así como la ubiquitinación y degradación por el proteosoma y la inducción a apoptosis (Blachon *et al.*, 2005).

La bisagra (HD) es una región que provee flexibilidad entre los dominios de unión y transactivación al DNA, está poco conservada entre los HPV's y no se conoce su función específica (McBride *et al.*, 1989), sin embargo se sabe que tiene algunos sitios de fosforilación, los cuales podrían ser un mecanismo de regulación de la actividad de la proteína E2 (McBride *et al.*, 1991).

El dominio C-terminal de la proteína E2 se une fuertemente como un homodímero a los sitios del DNA (sitios de unión de E2 al DNA o E2-BSSs) que son los responsables en el reconocimiento de secuencias particulares, tales como la secuencia palindrómica de 12pb (5'-ACCG-NNNN-CGGT-3') que se encuentra repetida varias veces en la región no codificante del genoma viral. (García-Carranca y Gariglio, 1993; Anston *et al.*, 2000; McBride *et al.*, 1991). El DBD de E2 es necesario para la dimerización de la proteína, sirve para formar una estructura llamada barril- β dimérico con flanco de reconocimiento de hélices (Harris y Botchan, 1999; Hedge, 2002), que consiste en una hélice principal de reconocimiento al DNA, una pequeña hélice y dos "loops" que conectan a las láminas- β (Nadra *et al.*, 2004; Hedge, 2002).

Las estructuras obtenidas por cristalografía de rayos X reportadas de los sitios de unión al DNA de E2 de los distintos HPV's comparten una alta homología estructural con modificaciones menores, como la orientación de un monómero con respecto a otro los cuales están relacionados con la unión al DNA (Nadra *et al.*, 2004). Se sabe que en el DBD del HPV16 existe una mayor cantidad de aminoácidos cargados positivamente en la hélice de reconocimiento del DNA, gracias a esto podría ser que la proteína E2 de HPV16 tuviera una mayor capacidad para doblar al DNA durante la unión a él, lo cual provocaría una mayor eficiencia en sus funciones biológicas (Campos-León, 2008).

La proteína codificada por el gen E2 tiene funciones cruciales para los procesos moleculares que forman parte del ciclo replicativo del HPV. Es un factor que regula

tanto la replicación viral del DNA, la segregación del genoma y la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7, además juega varios papeles durante la infección productiva (García-Carranca y Gariglio, 1993; Hedge, 2002).

Las proteínas E1 y E2 del HPV interactúan y forman complejos en el origen de replicación viral y en conjunto reúnen a la maquinaria de replicación celular (incluyendo la proteína de replicación A (RPA) y la DNA polimerasa α primasa) al genoma viral (Taylor y Morgan, 2003). La proteína E2 interactúa con la proteína E1 a través del TAD de E2 y une a los sitios adyacentes alrededor del sitio de unión de E1 (Harris y Botchan, 1999; Hedge, 2002).

El papel de la proteína E2 en el anclaje de los episomas virales a los cromosomas mitóticos es crítico para una buena segregación, que asegure la inclusión de los genomas virales a la membrana celular después de la mitosis, para después ser distribuidos en las células hijas; en algunos tipos de papilomavirus, se involucra la proteína celular Brd4, la cual se une a los cromosomas mitóticos y se asocia con la proteína E2 (Blachon *et al.*, 2005; Doorbar, 2006; Schweiger *et al.*, 2006).

La proteína E2 también puede actuar como factor de transcripción y regular el promotor temprano que controla la expresión de los oncogenes virales (E6 y E7), uniéndose a los mismos sitios usados para la replicación del DNA. También se ha visto que estas uniones interfieren con la unión de los factores celulares transcripcionales, tales como SP1 y TFIID, que son esenciales para la transcripción de E6 y E7 (Harris y Borchan, 1999; Blachon y Demeret, 2003); sin embargo altos niveles de proteína de E6 y E7 están asociados con una progresión maligna y su producción necesita estar controlada por un ciclo viral productivo, por lo tanto es necesario un balance entre activación y represión de los promotores tempranos de E6 y E7 (Hedge, 2002).

A niveles bajos, E2 actúa como un activador transcripcional, mientras que a altos niveles, E2 reprime la expresión de los oncogenes a través del desplazamiento del activador transcripcional SP1 de su sitio adyacente al promotor temprano. No es claro

como E2 mediante regulación transcripcional es importante en las células basales del epitelio, donde la estructura del nucleosoma y el estado de metilación del DNA viral, no parecen ser compatibles con la eficiencia de activación del promotor temprano (Doorbar, 2006).

Existen cuatro sitios de unión de E2 al DNA (E2-BS) y se encuentran en una región específica en la LCR del genoma viral (García-Carranca y Gariglio, 1993; McBride *et al.*, 1991). En HPV16 se cree que el E2-BS4 es el primer sitio que es ocupado cuando E2 está presente en bajas cantidades y esa unión, junto con E2-BS3 conducen a la activación del promotor P₉₇ y se comportan como elementos potenciadores. Mientras E2 aumenta en abundancia, la ocupación de E2-BS2 y E2-BS1 compiten en la contribución a la represión del promotor llevando al desplazamiento de los factores de transcripción basales, tales como Sp1 y TBP (proteína de unión a la caja TATA), que son necesarios para la activación del promotor (Figura 9) (Hedge, 2002; Doorbar, 2006).

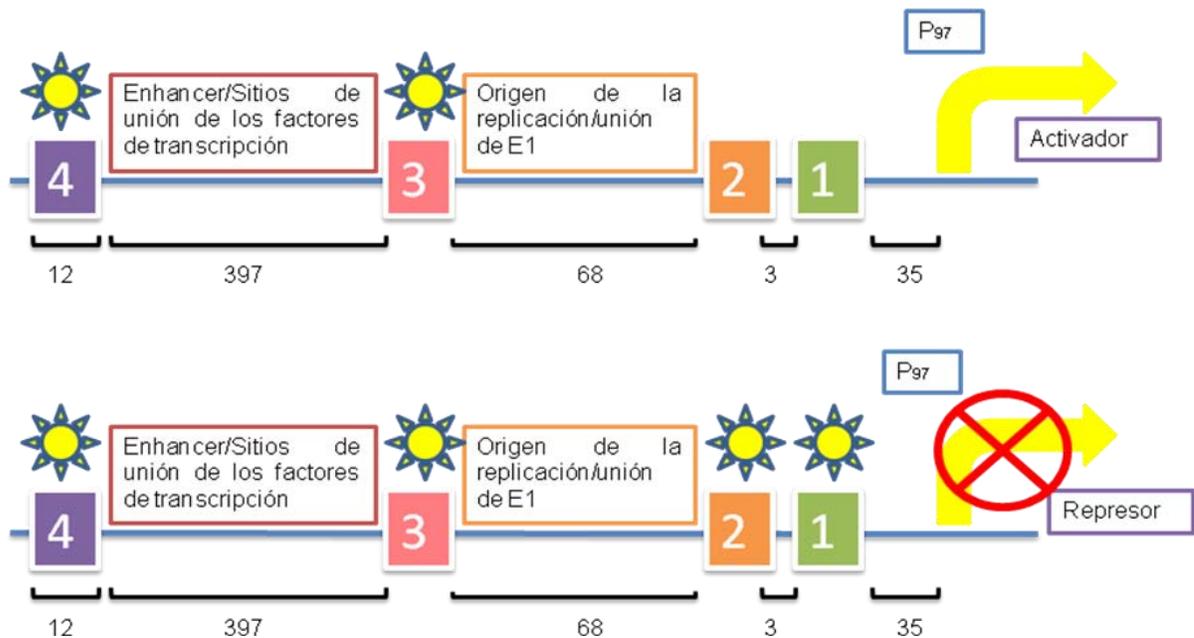


Figura 9. Localización de los cuatro sitios de unión de E2 (E2-BSs) en la LCR del HPV16. Cuando la proteína E2 (☀) se encuentra en bajas cantidades se une con mayor afinidad a los E2BSs más distantes del promotor P₉₇; por lo tanto, dichos E2BSs se comportan como elementos potenciadores/*enhancers*. Las interacciones entre dos dímeros unidos a dos diferentes E2BSs (interacción interdimérica) o entre los dos TADs de un dímero unido a un E2BS (interacción intradimérica), son importantes en la activación de la transcripción y su unión tiene un efecto sinérgico. Modificado de Antson *et al.*, 2000.

Parece ser que el aumento de la expresión de E2 es importante para estimular la amplificación del genoma viral, lo cual llevará eventualmente a bajar la regulación de la expresión de E6 y E7 y a la eventual pérdida del ambiente replicativo necesario para la síntesis del DNA viral (Doorbar, 2006). La interacción de la proteína E2 de los diferentes tipos de HPV's podrían mostrar una interacción variable con proteínas co-reguladoras, ya sea generales o específicas las cuales podrían modular su función en la regulación de la transcripción de los promotores virales, así como tener efectos inducidos en la fisiología de la célula.

TAF1

La transcripción del RNA de los genes clase II en eucariontes requiere del ensamblaje de un aparato multiprotéico enorme llamado complejo de pre-iniciación de la transcripción (PIC) compuesto por la RNA polimerasa II junto con los factores generales de la transcripción TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF y TFIIH (Mizzen *et al.* 1996; Verrijzer *et al.*, 1995; Dikstein *et al.*, 1996; Jacobson *et al.*, 2000; Wassarman *et al.*, 2000). Uno de los componentes importantes requeridos del complejo de pre-iniciación de la transcripción es el factor de transcripción IID (TFIID), el cual tiene distintas actividades, además de ser el único componente del PIC que reconoce y se une a secuencias específicas del DNA en el núcleo promotor y constituye el andamiaje principal para que se lleve a cabo el inicio de la transcripción, ya sea mediante el reclutamiento de diversas proteínas al promotor, interactuando entre ellas o modificando estructuralmente los factores generales de transcripción (GTFs) (Mizzen *et al.*, 1996; Wassarman y Sauer, 2001).

TFIID es un complejo de múltiples subunidades que contiene a la proteína de unión a la caja TATA (TBP) y al menos ocho factores asociados a la proteína TBP (TAFs) cuyas masas moleculares varían desde 10 a 250 kDa (Dikstein *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997; Jacobson *et al.*, 2000; Carrillo *et al.*, 2004; Wassarman *et al.*, 2000). La principal función de los TAFs consiste en la activación de algunos genes *in vivo*,

algunos son capaces de servir como coactivadores, otros son responsables de reconocer elementos específicos del promotor y se unen al DNA o tienen una actividad enzimática (Dikstein *et al.*, 1996).

TAF1 es la subunidad más grande del complejo TFIID, originalmente fue caracterizado como el gen de ciclo celular 1 (CCG1) (Wang *et al.*, 1997; Wassarman y Sauer, 2001), posee una variedad de actividades que es posible que contribuyan en los pasos iniciales de la transcripción de la RNA polimerasa II (Dunphy *et al.*, 2000; Carrillo *et al.*, 2004). TAF1 tiene la capacidad de unión al núcleo del promotor en los elementos iniciadores, así como la actividad de histona acetil-transferasa que permite la acetilación de las histonas H2A, H3 y H4 a través de un módulo de dos bromodominios, lo que modifica la estructura de la cromatina favoreciendo la unión de componentes del PIC y la transcripción (Figura 10) (Campos-León, 2008; Jacobson *et al.*, 2000; Carrillo *et al.*, 2004).

TAF1 posee actividad conjugacional de ubiquitinación y dos dominios serina/treonina cinasa, un dominio carboxilo cinasa (CTK) y un dominio amino cinasa (NTK) (Siegert y Robbins, 1998; Wassarman y Sauer, 2001; Centeno, 2003; Carrillo *et al.*, 2004), y la función de ambos dominios se ha demostrado *in vivo* (Centeno, 2003). Se ha corroborado que estas funciones son importantes en la regulación de la expresión de una gran variedad de genes (Wassarman y Sauer, 2001). Se ha demostrado que la interacción de proteínas virales con TAF1, puede inhibir la función acetiltransferasa y reprimir la expresión de genes regulados por esta proteína.

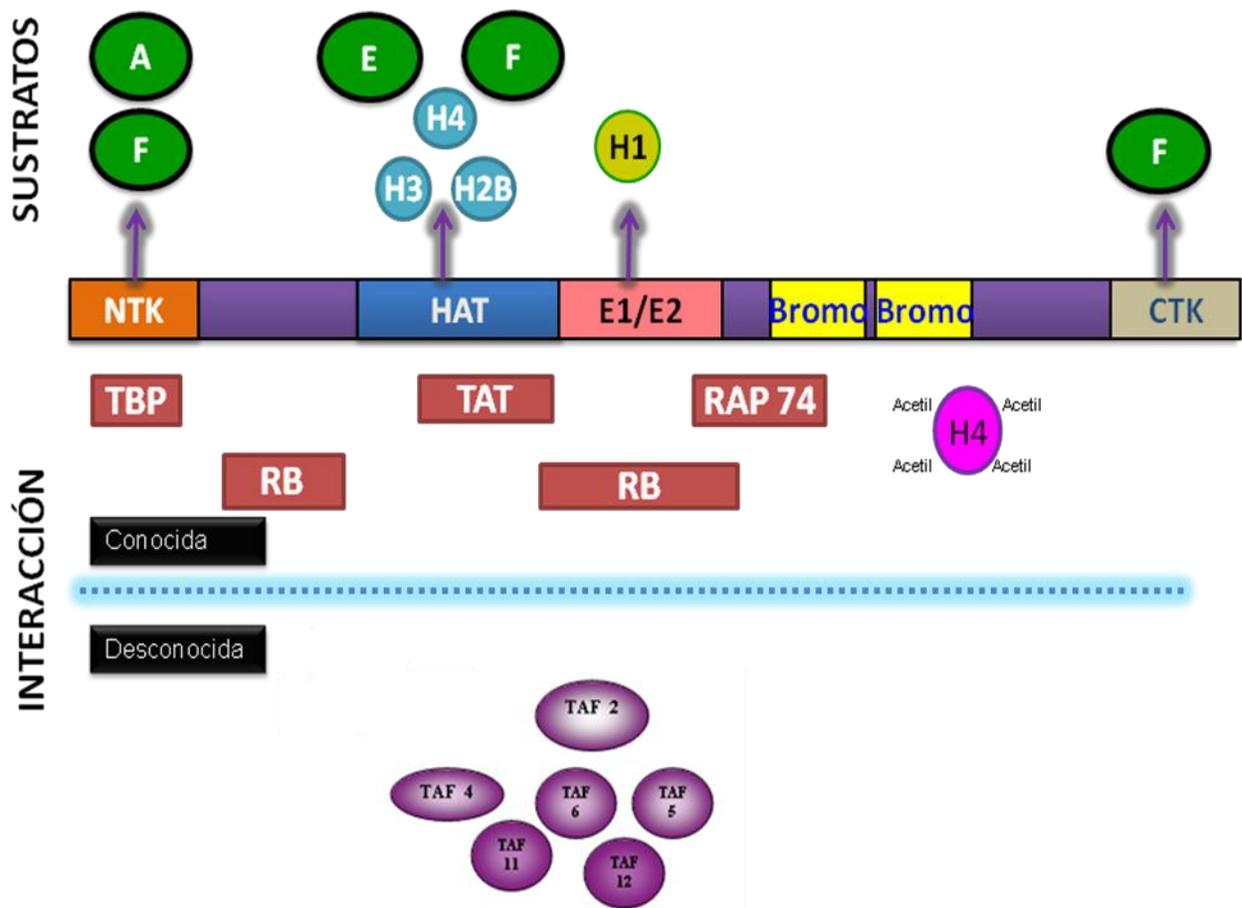


Figura 10. Representación esquemática de la proteína TAF1, sustratos e interacciones. Los dominios cinasa N- y C-terminales (NTK, CTK), dominio histona acetil transferasa (HAT), dominio de activación-ubiquitinación y conjugación (E1/E2) bromodominios (Bromo) se encuentran ubicados en la proteína lineal TAF1. Los sustratos para las actividades enzimáticas y las proteínas con las que interactúa: TFIIA (A), TFIIE (E), TFIIF (F) y su dominio de interacción conocido y desconocido. Modificado de Wassarman & Sauer, 2001.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que E2 interactúa con algunos miembros del factor general de transcripción TFIID, por ejemplo E2 de BPV1 y HPV18 interactúan con TAF 1 y TAF 6 *in vitro* (Figura 11) (Carrillo *et al.*, 2004). También se caracterizó la interacción de diferentes fragmentos de TAF1 con las diferentes construcciones de las regiones del gen E2 de HPV16 variante Europea (E2E), las cuales se utilizaron para generar proteínas de fusión a GST.

Con estos ensayos se demostró que esta interacción ocurre a través del dominio TAD y DBD de E2 (Figura 12), sin embargo existe una mayor fuerza de interacción a través del dominio del DBD *in vitro* (Centeno, 2003).

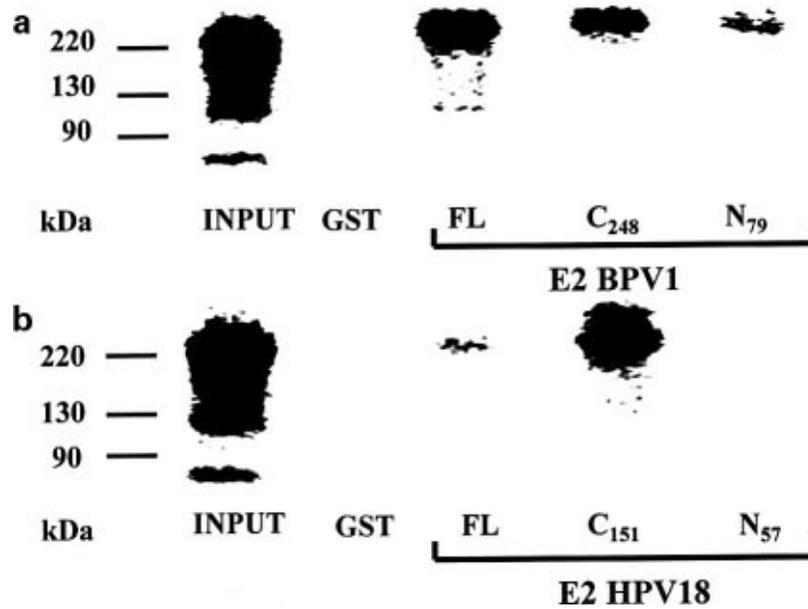


Figura 11. Interacción *in vitro* de TAF1 con diferentes dominios de BPV1 E2 (a) y HPV18 E2 (b). Tomado de Carrillo *et al.*, 2004.

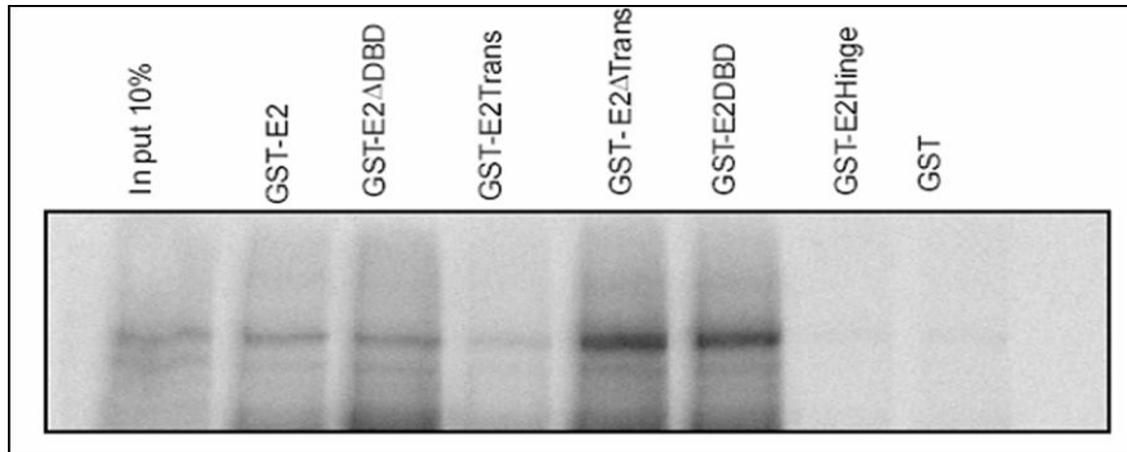


Figura 12. Interacción *in vitro* de la proteína TAF1 con las diferentes regiones de la proteína E2E fusionada con GST. Tomado de Centeno *et al.*, 2008.

En ensayos de transfecciones transitorias se corroboró que la proteína E2 del HPV16E actúa como un activador transcripcional además de interactuar con TAF1-E2E *in vitro*, lo que da como resultado un efecto cooperativo sobre la activación de la transcripción *in vivo* (Centeno *et al.*, 2007). También se ha demostrado que la proteína E2 de HPV16 variante Asiatico-Americana (E2AAc) tiene una interacción más fuerte con TAF1 *in vitro* que con E2E y por lo tanto tiene un efecto cooperativo en la activación de la transcripción mayor (Figura 13) (Ramírez-Salazar, 2005).

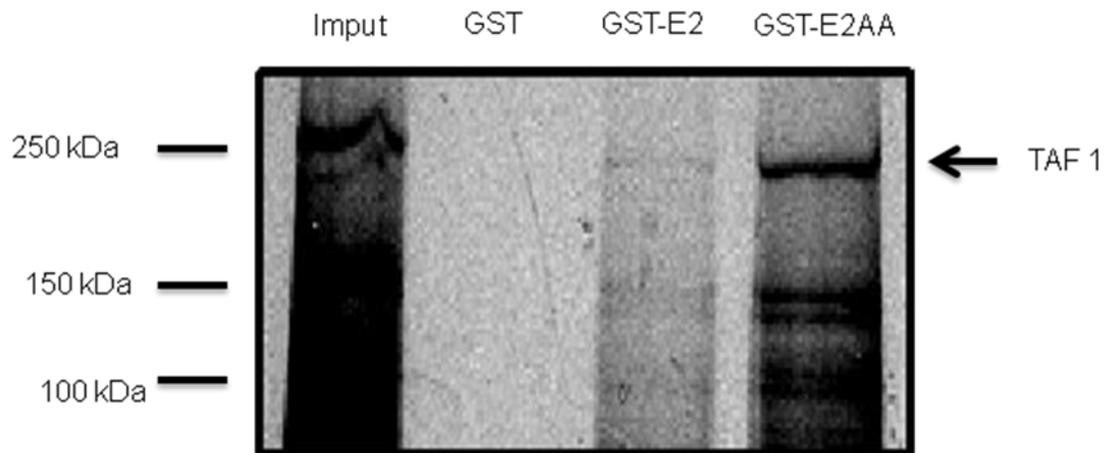


Figura 13. Interacción *in vitro* de la proteína TAF1 con las proteínas E2E y E2AA. Tomado de Ramírez-Salazar, 2005.

Con la finalidad de obtener una proteína E2 recombinante del HPV-16 cuya capacidad de unión al DNA se encontrara abatida, nuestro grupo de trabajo realizó ensayos de mutagénesis sitio-dirigidas para introducir los cambios en los codones que codifican para los aminoácidos N²⁹⁶, K²⁹⁹ y R³⁰⁴, estos aminoácidos se encuentran en el DBD de E2 (Webster *et al.*, 2000), a la cual se le dio el nombre de mutante triple del gen E2AA (E2AAM3) (Campos-León, 2008).

Campos-León demostró *in vivo* que la unión de la proteína E2AA al DNA contribuyó de manera importante a la activación de la transcripción, y la proteína E2AAM3 activó la transcripción, aunque su capacidad de unión al DNA se encontrara abatida. También se demostró una menor eficiencia de la proteína E2AAM3, en comparación con la proteína E2AA, como activadora de la transcripción y esto se reflejó en su interacción con la proteína TAF1 *in vivo*. Dicha interacción tuvo como consecuencia un efecto cooperativo, aunque de diferente magnitud, en la activación de la transcripción. Con esto se demostró que, además de su función como un factor de transcripción la proteína E2 actúa como un co-activador de la transcripción mediante su interacción con proteínas como TAF1.

Con base en estos antecedentes hemos planteado que la interacción *in vitro* de las proteínas TAF1 y E2AAM3 podría verse modificada por los cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína E2, lo que puede llevar a una modificación en el patrón de interacción y función entre ambas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Si los cambios que existen en la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al DNA de la proteína E2 del HPV-16 variante Asiático-Americana mutada (E2AAM3) son importantes para su interacción con TAF1, entonces la afinidad entre ambas proteínas se verá modificada.

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar la interacción de la proteína celular hTAF1-N con la proteína E2 Mutante 3 del Virus del Papiloma Humano tipo 16 variante Asiático-Americana.

Objetivos Particulares

Clonar el gen E2 Mutante 3 de la variante Asiático-Americana de HPV16 en el plásmido de expresión pGEX-2T.

Expresar las proteínas de fusión GST-E2AAcM3 en un sistema bacteriano adecuado.

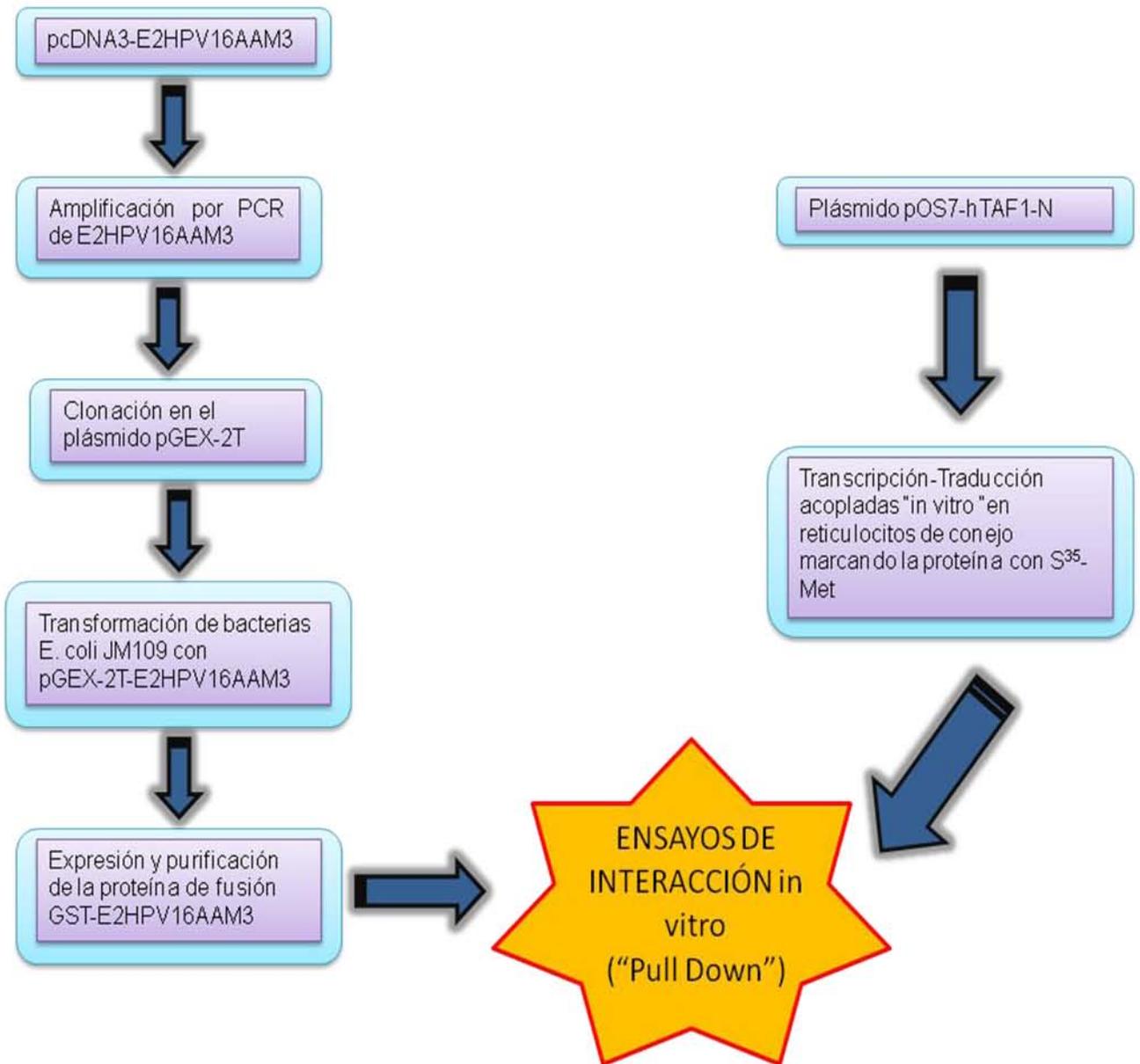
Obtener la proteína hTAF1-N marcada radioactivamente.

Realizar los ensayos de interacción *in vitro* entre la proteína GST-E2HPV16AAcM3 con la proteína celular hTAF1-N y/o regiones específicas de ella.

METODOLOGIA

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos anteriormente planteados se diseñó la siguiente estrategia experimental.



METODOLOGÍA

Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina

Para obtener el gen E2 Mutante 3 de la variante Asiático-Americana de HPV16 se partió del plasmido pcDNA3-E2HPV16AAM3 previamente construido en nuestro grupo de trabajo (Campos-León, 2008). Por lo tanto, en diversas etapas del proyecto se requirió la extracción de DNA plasmídico correspondiente a pcDNA3-E2HPV16AAM3 y pGEX2T-E2HPV16AA. Para estos casos, se realizó una extracción de DNA a partir de, un cultivo de bacterias (50 ml) transformadas con el plásmido de interés crecido durante toda la noche a 37°C, fue centrifugado a 5,524 x g durante 10 minutos a 4°C. La pastilla bacteriana fue resuspendida en 5 ml de buffer de resuspensión (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, RNasa A 100 µg/ml) y se adicionaron 5 ml de buffer de lisis (NaOH 200 mM, SDS al 1% (p/v)), se mezcló cuidadosamente y se incubó de 3-5 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo se adicionaron cuidadosamente 5 ml de buffer de neutralización (KCH₃COO- 3 M, pH 5.0), se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 20 minutos. Se centrifugó a 20,000 x g a 4°C durante 30 minutos y se recuperó el sobrenadante completamente limpio al cual se adicionó un volumen de buffer PEG (Polietilenglicol 6000-8000 al 20% (p/v), NaCl 1 M, EDTA 1 mM, Tris 10mM pH 8.0) para precipitar el DNA. Se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, se centrifugó a velocidad máxima por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar por 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente resuspenderla en 300 µl de H₂O desionizada estéril.

El DNA plasmídico fue purificado adicionando 1 volumen (300 µl) de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 11,600 x g durante 5 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se adicionó 1 volumen de la mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó nuevamente a velocidad máxima por 5 minutos. Se recuperó la fase

acuosa y se adicionaron 0.5 volúmenes de una solución de acetato de amonio 7.5 M con pH 7.0 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se incubó 2 h a -70°C , se centrifugó por 30 minutos a 4°C a $11,600 \times g$ y se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó con etanol al 70%, sin centrifugar, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente con el tubo destapado, y finalmente se resuspendió en 100 μl de H_2O desionizada estéril.

Transformación bacteriana

Se descongelaron bacterias *E. coli* DH5 α competentes almacenadas a -70°C , a una alícuota de bacterias competentes se adicionaron 200-300 ng de DNA plasmídico previamente purificado. Posteriormente, se incubaron a 4°C durante 30 minutos y transcurrido este tiempo se dio un choque térmico en un baño de agua a 42°C durante 90 segundos. Las bacterias se mantuvieron en hielo durante 2 minutos y posteriormente se les adicionaron 300 μl de medio SOC y se incubaron a 37°C por 60-90 minutos, con agitación constante. Transcurrido este tiempo, se tomaron 100 μl de cada cultivo transformado (para placas diluidas) o bien, se centrifugó el cultivo por 5 minutos a $5,000 \times g$ y se resuspendió la pastilla en aproximadamente 100 μl del medio de cultivo (para placas concentradas). Este volumen se colocó en una caja de LB-ampicilina [100mg/mL] y se espatuló para distribuir las bacterias en toda la placa. Las placas se incubaron de 16-18 horas a 37°C .

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para corroborar la presencia el gen E2 del HPV16 en el plásmido de expresión pGEX-2T, se amplificó mediante PCR. Se prepararon reacciones de 25 μL con los siguientes componentes: dNTPs [100 μM], MgSO_4 [1.5mM], Buffer [1X], oligonucleótidos específicos (5pM de cada uno), 1U de enzima (DNA polimerasa GoTaq™ de Promega), DNA molde (1ng/ μL de reacción) y H_2O hasta

un volumen final de 25µL. Los oligonucleótidos usados para E2 fueron los siguientes (Ramírez-Salazar, 2005):

Sentido (Fwd):5'-TTCGGGATCCATGGAGACTCTTTGCCAACG-3'
Antisentido (Rev):5'-TCCGAATTCTCATATAGACATAAATCCAGTAG-3'

Las condiciones para la reacción fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización durante 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales comprendía un período de 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 62°C y 60 segundos a 72°C; y finalmente 1 ciclo de extensión durante 3 minutos a 72°C.

Inducción de la expresión de proteínas

Las bacterias transformadas que presentaron resistencia al antibiótico fueron aisladas y crecidas en colonia en una caja de Petri con medio LB semisólido con antibiótico durante toda la noche a 37°C. Se seleccionaron algunas colonias y se hicieron pies de cultivo de 20 mL en medio LB con antibiótico. Estos cultivos se incubaron durante toda la noche en agitación a 37°C, se hizo una dilución 1:20 en medio LB con antibiótico y se siguió la incubación durante 2 horas a 30°C con agitación de 150 rpm. Se tomó un volumen de 100 µl para medir la densidad óptica, una vez alcanzada la densidad óptica deseada (0.5-0.6) se adicionó IPTG (0.3 mM) para inducir la transcripción controlada por un promotor *lac* o sus derivados y así obtener la expresión de las proteínas codificadas por el gen de interés en el plásmido; se incubaron a 30°C durante 2.5 horas con agitación. Los cultivos fueron centrifugados a 5,524 x g durante 10 minutos a 4°C, la pastilla se resuspendió en buffer NET-N (NaCl 100 mM, Tris-HCl 20mM pH 8, EDTA 1 mM, NP40 al 0.5% (v/v), PMSF 1 mM, inhibidores de proteasas 1X

(Complete; Boehringer Mannheim)) y las células fueron lisadas por sonicación. Se sonicaron 3 veces durante 30 segundos, con intervalos de 30 segundos de descanso. Antes de sonicar se guardó una alícuota de 100 μ l para verificar que se hayan lisado bien las células. El lisado sonicado, se centrifugó a 20,000 x g durante 10 minutos a 4°C, se separó el sobrenadante y se le adicionó glicerol hasta alcanzar una concentración de 10% (v/v). Se hicieron alícuotas de 1 ml y se almacenaron a -70°C.

Captura de proteína de fusión

A un mililitro de lisado bacteriano se le adicionaron 300 μ l de Glutación-Sefarosa previamente equilibrada con buffer NET-N y bloqueada con leche descremada al 0.5%. Esta suspensión se incubó a 4°C durante 4 h con agitación y posteriormente se centrifugó a 988 x g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se realizaron 5 lavados con buffer NET-N, centrifugando la suspensión después de cada lavado a 988 x g y separando los sobrenadantes. La alícuota se almacena a 4°C.

Inmunodetección de la proteína de fusión en fase sólida (WESTERN-BLOT)

A 20 μ l de la pastilla de Glutación-Sefarosa con la proteína de fusión capturada, se le agregaron 20 μ l de buffer de muestra 2X para SDS-PAGE (SDS al 2% p/v, glicerol al 20%, Tris-HCl pH 8.2 20mM, EDTA 2mM, Azul de bromofenol 0.1 mg/ml), se calentó a ebullición durante 5 minutos y finalmente se cargó en un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. La migración electroforética se realizó a 25 mA durante 1h y posteriormente, las proteínas resueltas en el gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 90 minutos a 95V. Una vez transferidas las proteínas en la membrana, ésta se incubó con el anticuerpo primario específico a diferentes diluciones 1:500, 1:1000 y 1:1500 en PBS 1X pH 7.3 (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄-7H₂O, KH₂PO₄

1.4 mM), en este caso anticuerpos policlonales anti-GST (Santa-Cruz), anti-E2 en gallina obtenido en el laboratorio y anti-E2 comercial (Santa Cruz). La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4°C. Después de tres lavados con PBS 1X-Tween al 0.2%, la membrana fue incubada durante 2 hr a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario en una dilución 1:7500 (anti Ig de conejo (para anti-GST y anti-E2 comercial) o anti-Ig de gallina (Zymex)). Transcurrido este tiempo se lavó en 3 ocasiones con buffer PBS 1X-Tween al 0.2% (v/v) y posteriormente se realizó la detección de la señal en películas fotográficas usando un sistema de quimioluminiscencia (ECL, Amersham).

Ensayos de transcripción-traducción acopladas

Para obtener la proteína hTAF1-N previamente construido (Centeno F., 2003). Para obtener 50 µl de la proteína hTAF-1N marcada radioactivamente, se utilizaron 25 µl de lisado de reticulocitos, 2 µl de Buffer TNT, 1 µl de Aminoácidos sin metionina, 1 µl de RNAsin, 1 µl TNT polimerasa, 5 µl [S³⁵]-metionina, 2 µl DNA (pOS7TAF1 2 µg) y H₂O hasta llegar al volumen final. Se incubó a 30°C por 1:30 hrs, en un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% se corrió el 10% del total de la muestra de la proteína hTAF-1N marcada radioactivamente. La migración electroforética se realizó a 25 mA durante 1h y posteriormente, se fijó el gel con solución destiñidora durante 30 minutos en agitación constante, para después secarlo y exponerlo en una pantalla Typhon, el tiempo necesario para visualizar el resultado. Este plásmido se utilizó para sintetizar las proteínas correspondientes marcadas con [S³⁵]-metionina por medio de ensayos de Transcripción-Traducción acopladas *in vitro* en lisado de reticulocitos, usando el sistema *T_{NT} T7 Coupled Reticulocyte Lysate System* siguiendo a las instrucciones del fabricante (Promega).

Ensayos de interacción *in vitro* (GST PULL-DOWN)

Las proteínas GST-E2HPV16AA y GST-E2HPV16AAM3 capturadas en la resina de Glutación-Sefarosa se incubaron con los lisados de reticulocitos conteniendo a la proteína hTAF1-N marcada radioactivamente con [S³⁵]-metionina, durante 2 horas en buffer de interacción (KCl 50 mM, Hepes 40 mM pH 7.5, Tween 20 al 0.1% (v/v), NaCl 150mM, leche semidescremada al 0.5% (p/v)). Posteriormente a la incubación se realizaron 5 lavados con buffer de lavado con alta fuerza iónica (KCl 50 mM, Hepes 40 mM pH 7.5, Tween 20 al 0.1 % (v/v), NaCl 0.3 M). Después de cada lavado se centrifugó, formando pastillas. Las pastillas de Glutación-Sefarosa, en las cuales tenemos a las proteínas E2HPV16AA y E2HPV16AAM3 unidas a ésta y en caso de que interactúe la hTAF1, se cargaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10% para el caso de la interacción con hTAF1-N. Después de su corrimiento electroforético, los geles se fijaron en solución de Metanol:Ácido Acético:Agua en una proporción de 50:10:40 durante 1h con agitación; posteriormente fueron secados y se expusieron a una pantalla para ser analizados en el sistema *Thyphoon* (Amersham).

RESULTADOS

RESULTADOS

1.- Generación de la construcción pGEX-E2HPV16AAM3, para la expresión de proteína E2 de HPV16 de la variante AAcM3.

Utilizando como templado la construcción pcDNA3-E2HPV16AAM3, creada en nuestro grupo de investigación (Campos-León, 2008) y los oligonucleótidos específicos que hibridan en los extremos del gen E2HPV16AAM3, y que presentan sitios de corte para las enzimas de restricción *Bam* HI (oligonucleótido sentido) y *Eco* RI (oligonucleótido antisentido), se restringió el fragmento correspondiente a este gen (1098 pb), el cual se muestra en la figura 14.

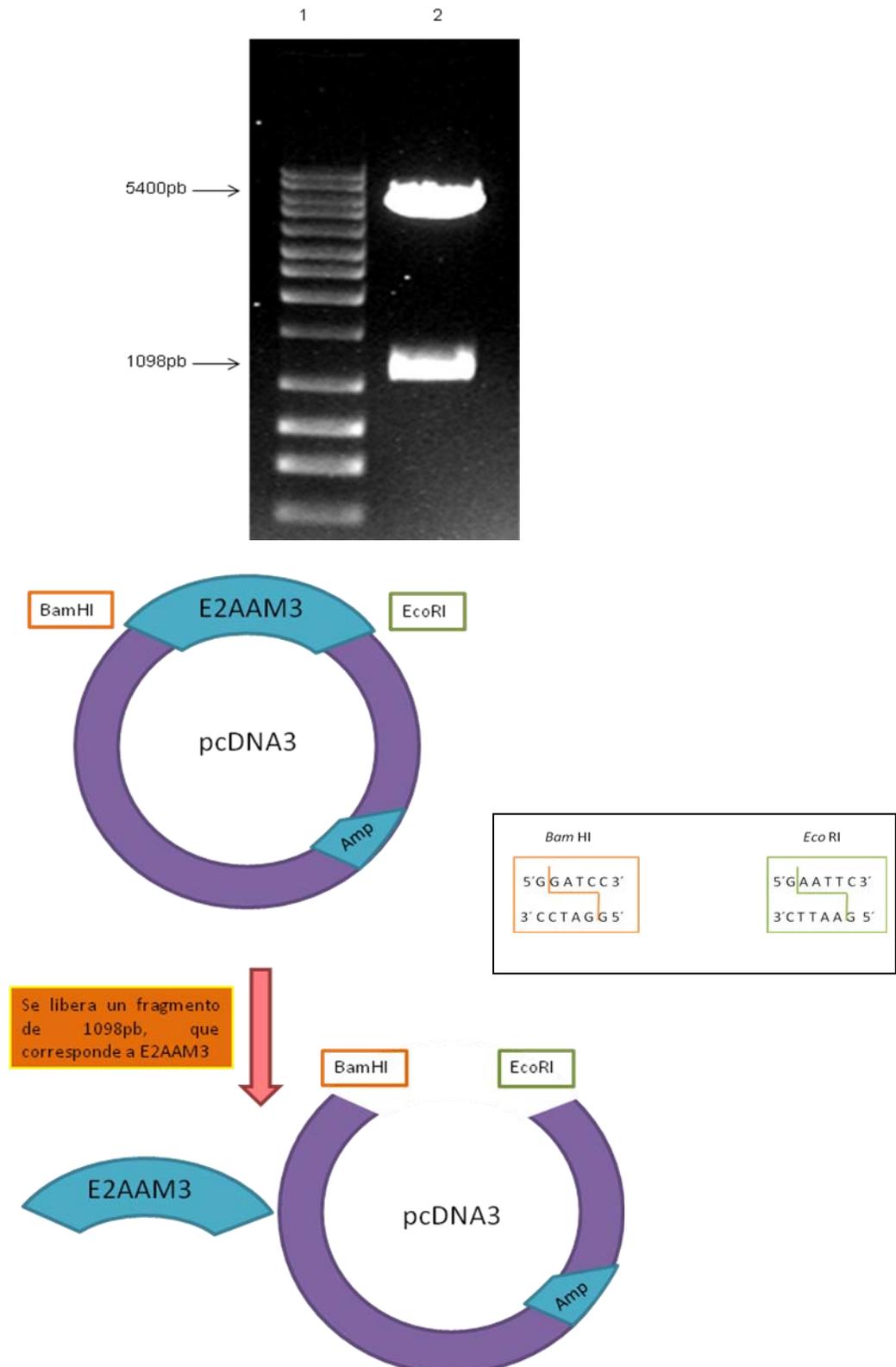


Figura 14. Liberación del fragmento correspondiente a E2 por medio de la doble restricción con las enzimas *Eco* RI y *Bam* HI. El carril marcado con el número 1 representa el marcador de 1 Kb, 2 la doble restricción con *Eco* RI y *Bam* HI de pcDNA3-E2HPV16AAM3.

Para poder llevar a cabo la construcción del plásmido de expresión pGEX2T-E2HPV16AAM3 se utilizó el plásmido pGEX2T (figura 15) que fue digerido por separado con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Bam* HI (figura 16), posteriormente fue desfosforilado con SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*; Roche).

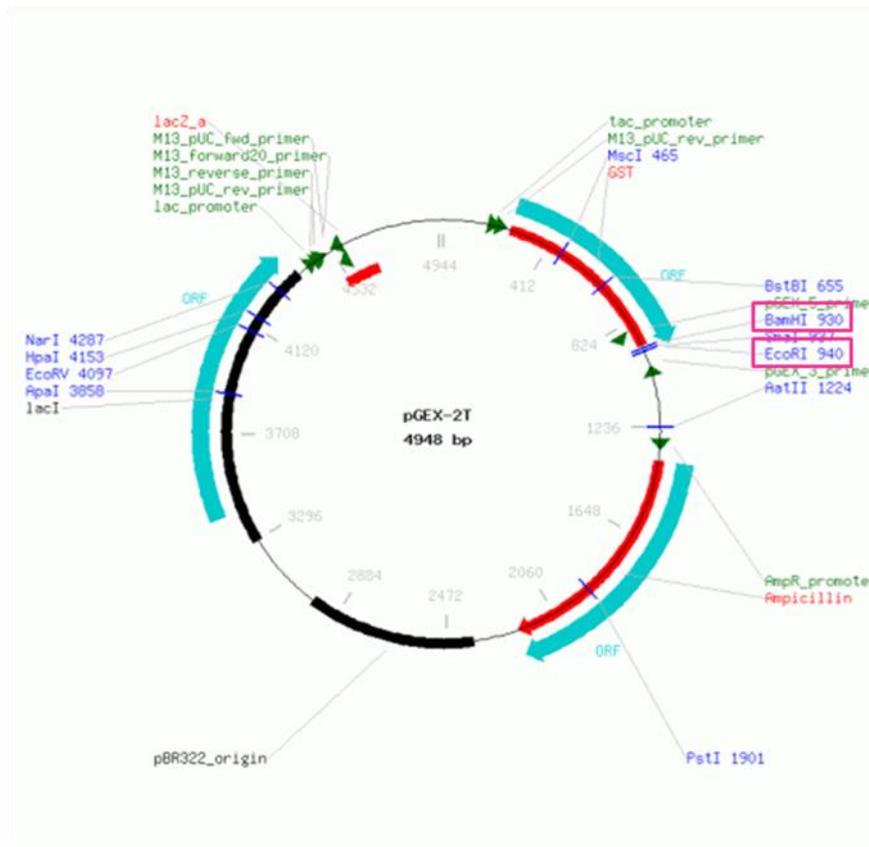


Figura 15. Plásmido pGEX2T. Esquema del DNA del plásmido pGEX2T, en donde se muestran los sitios de corte para las enzimas *Bam* HI y *Eco* RI. Modificado del GenBank: A01438.1

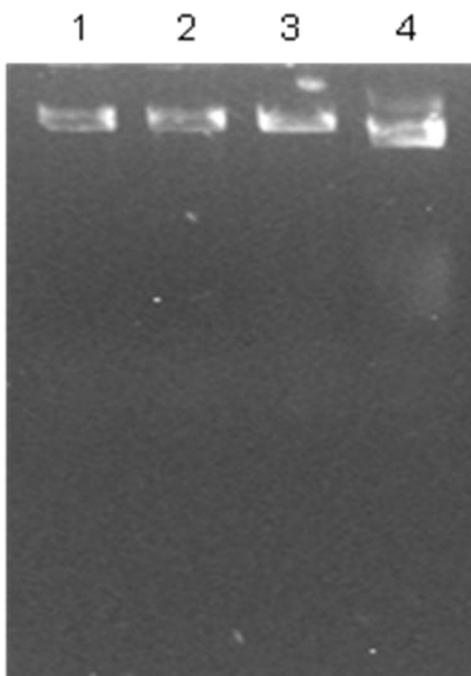


Figura 16. Restricción del plásmido pGEX2T por medio de la doble restricción con las enzimas *Eco* RI y *Bam* HI. El carril 1 representa la restricción con *Eco* RI de pGEX2T, 2 con *Bam* HI del plásmido correspondiente, 3 doble restricción con *Eco* RI y *Bam* HI del plásmido correspondiente y 4 el plásmido correspondiente sin digerir.

Una vez obtenido el pGEX2T digerido y desfosforilado y utilizando el fragmento E2HPV16AAM3 previamente purificado, se llevó a cabo la ligación utilizando ligasa T4. Se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α , para aislar y purificar con fenol/cloroformo:alcohol isoamílico, el plásmido pGEX2T-E2HPV16AAM3 (figura17A). Se evaluó la presencia del marco de lectura para E2HPV16AAM3 en este plásmido por medio de su amplificación por PCR (figura 17B) de distintas colonias obtenidas, así como por digestión con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Bam* HI.

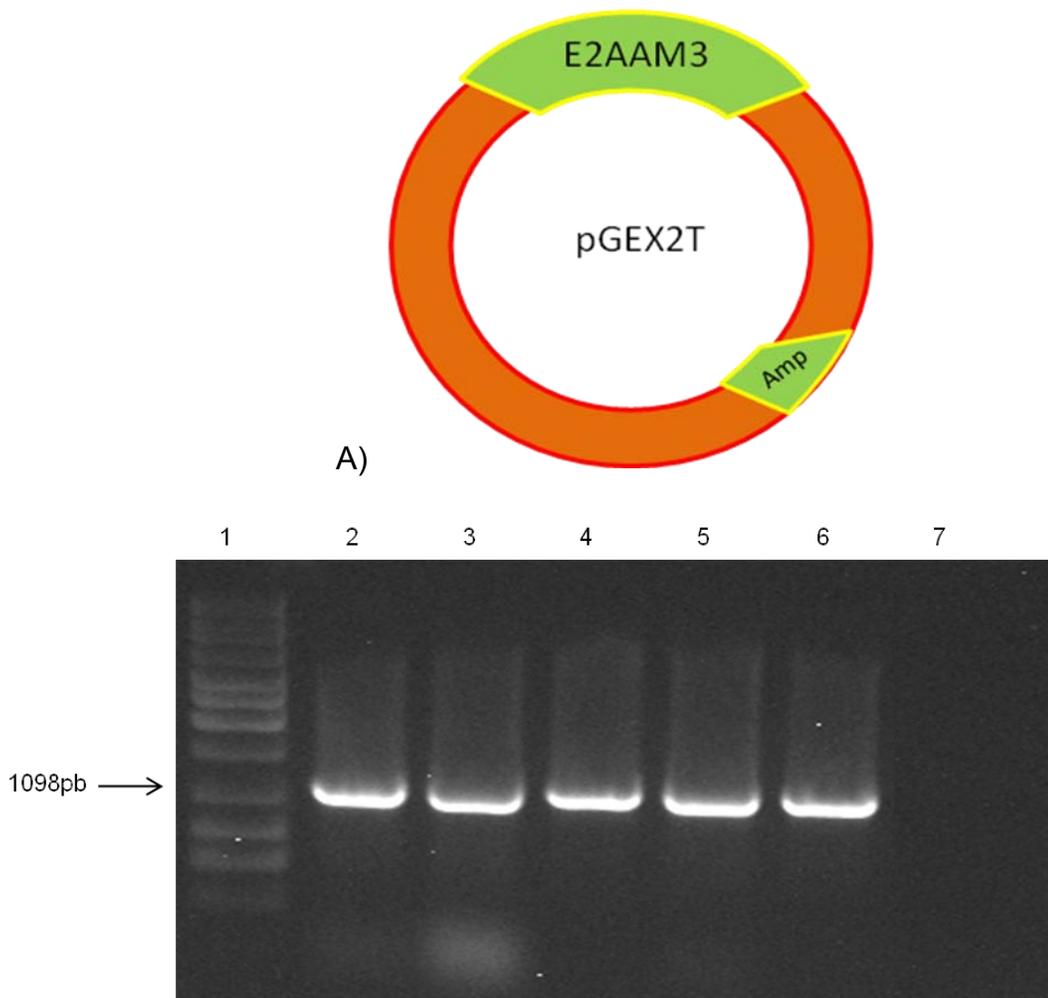


Figura 17. A) Esquema del plásmido pGEX2T-E2HPV16AAM3 B) Amplificación del fragmento E2HPV16AAM3. El carril 1 representa al marcador de 1Kb, 2 amplificación de pcDNA3-E2HPV16AAM3, 3 colonia 1 con el plásmido pGEX2T-E2HPV16AAM3, 4 colonia 2 con el plásmido correspondiente, 5 colonia 3 con el plásmido correspondiente, 6 colonia 4 con el plásmido correspondiente y 7 control negativo.

2. Expresión y captura de la proteína E2 del HPV16 de la variante AAcM3

Una vez obtenidos los plásmidos pGEX2T y pGEX2T-E2HPV16AAM3 se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa JM109DE3 para expresar las proteínas de fusión GST y GST-E2HPV16AAM3, respectivamente. Se seleccionaron aquellas colonias que presentaron resistencia a Ampicilina, de las cuales se hicieron pies de cultivo de 15mL cada uno con medio LB y 100 µg/µl de Ampicilina, a partir de estos pies de cultivo se realizaron diluciones 1:20 para su inducción con

IPTG (0.5 mM) hasta alcanzar la densidad óptica adecuada (0.5-0.6). Posteriormente se obtuvieron los lisados bacterianos en los que se encuentran las proteínas deseadas (figuras 18 y 19).

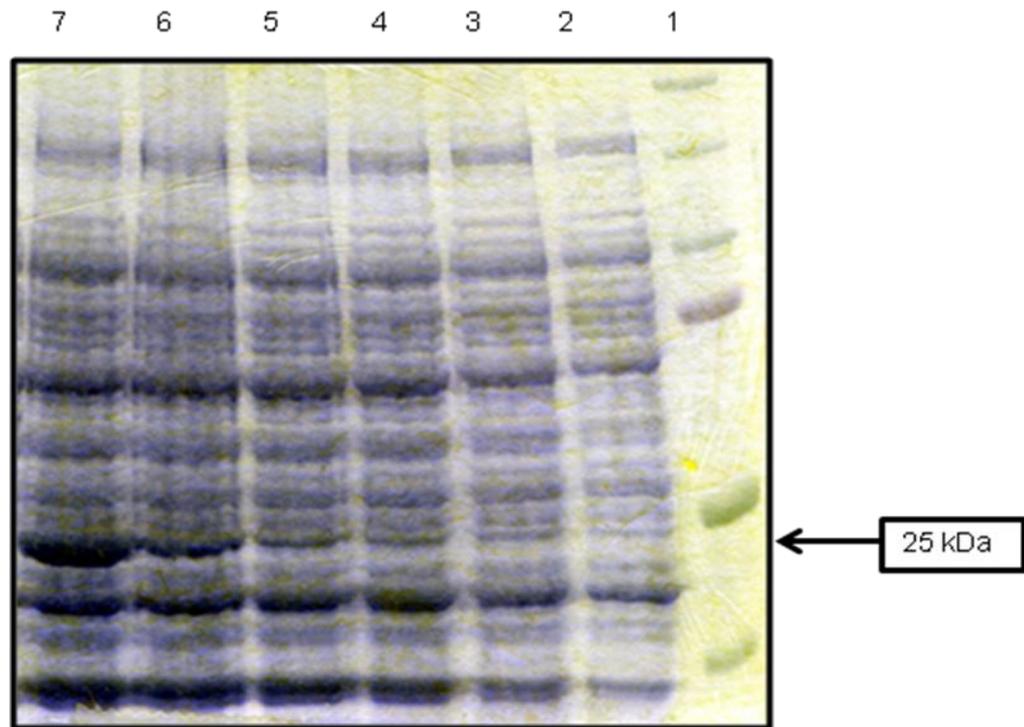


Figura 18. Inducción de la expresión de GST a distintas horas. Los carriles demuestran lo siguiente: 1 marcador de pesos moleculares, 2 sin inducción, 3 una hora de inducción, 4 dos horas de inducción, 5 tres horas de inducción, 6 cuatro horas de inducción y 7 cinco horas de inducción.

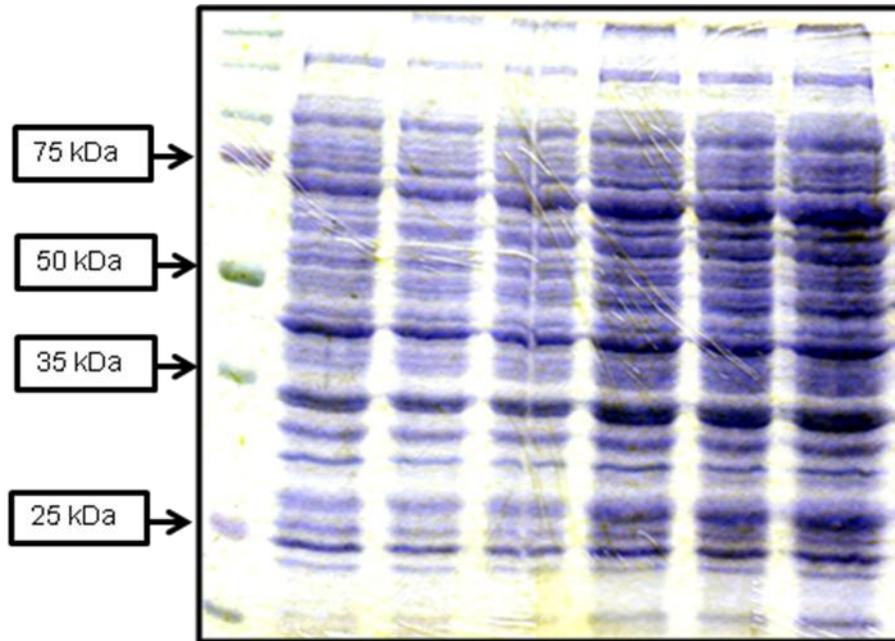


Figura 19. Inducción de la expresión de GST-E2HPV16AAM3 a distintas horas. Los carriles muestran lo siguiente: 1 marcador de pesos moleculares, 2 sin inducción, 3 una hora de inducción, 4 dos horas de inducción, 5 tres horas de inducción, 6 cuatro horas de inducción y 7 cinco horas de inducción.

Estas proteínas fueron capturadas con la resina de Glutación-Sepharosa de manera adecuada, lo que les proporcionó condiciones no-desnaturalizantes, alta fidelidad y una alta capacidad de preservar a las proteínas, así como su función; esto se hizo con la finalidad de obtener una proteína de fusión adecuada para poder realizar los ensayos directos de interacción entre proteínas; se corroboró su presencia en la resina mediante su migración electroforética en un gel SDS-PAGE y su posterior tinción con azul de Coomasie como se muestra en las figuras 20 y 21.

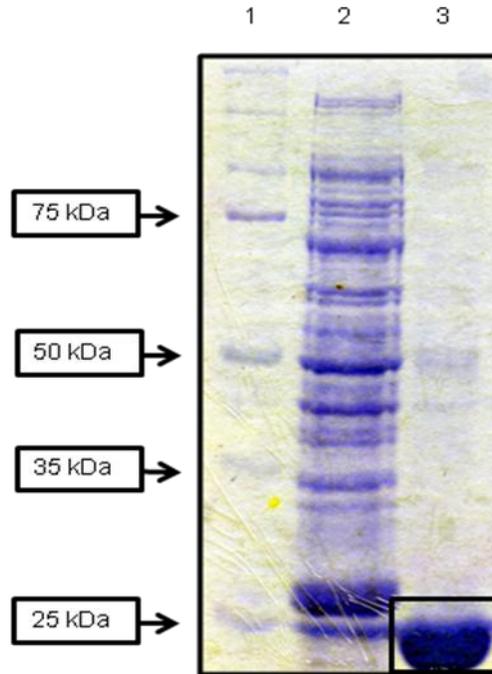


Figura 20. Captura de la proteína de fusión GST. Los carriles muestran lo siguiente: 1 marcador de pesos moleculares, 2 lisado bacteriano que contiene la proteína GST, 3 GST capturada como se muestra en el recuadro.

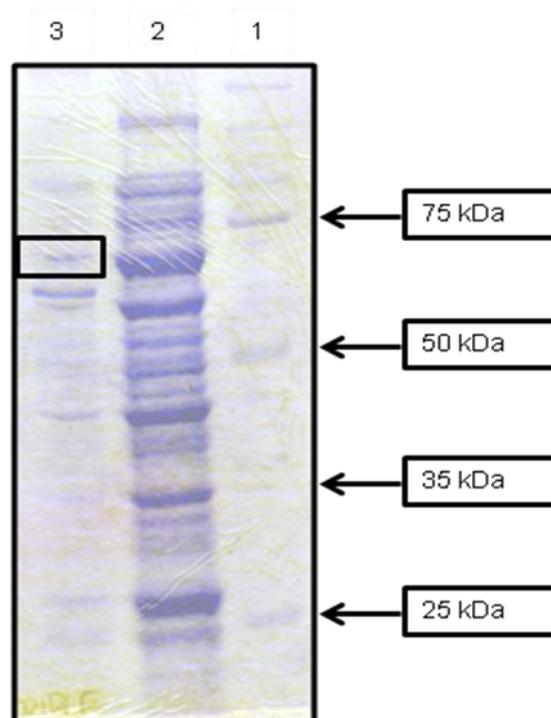


Figura 21. Captura de la proteína de fusión GST-E2HPV16AAM3. Los carriles muestran lo siguiente: 1 marcador de peso molecular, 2 lisado bacteriano que contiene la proteína GST-E2HPV16AAM3, 3 GST-E2HPV16AAM3 capturada como se muestra en el recuadro.

Para corroborar la identidad de la proteína GST-E2HPV16AAM3 (70kDa) capturada con la resina glutatión-Sefarosa se realizaron ensayos de Western-Blot empleando primeramente un anticuerpo primario anti-GST a diferentes concentraciones, con la finalidad de establecer la concentración del anticuerpo más adecuada para detectar las proteínas de fusión (Figura 22).

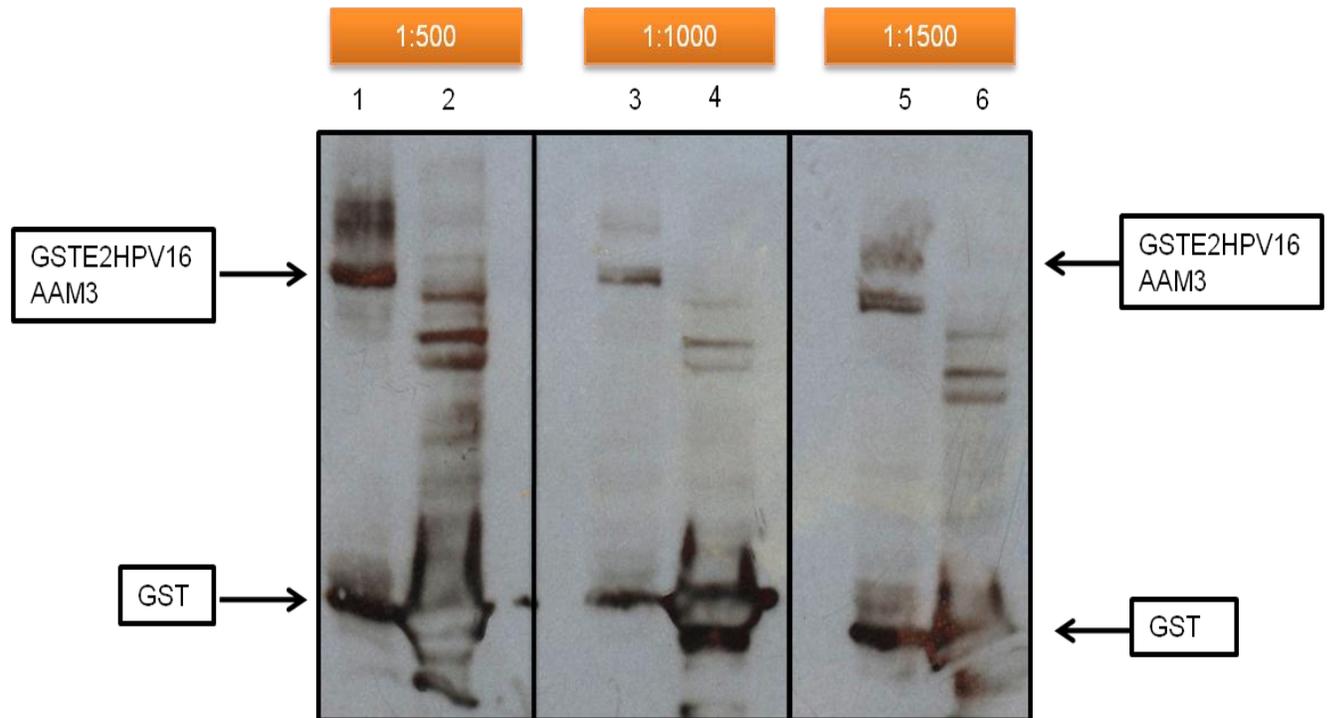


Figura 22. Western-Blot anti-GST. Se muestra la señal correspondiente a la proteína de fusión GST-E2HPV16AAM3 de aproximadamente 70 kDa, en los carriles 1, 3 y 5; en los carriles, 2, 4 y 6 se muestra la señal correspondiente a GST de aproximadamente 26 kDa dada con el anticuerpo anti-GST, a diferentes concentraciones

Adicionalmente se realizó también un Western-Blot usando un anticuerpo anti-E2 de HPV16 fabricado en nuestro laboratorio y por último el anticuerpo anti-E2 comercial, utilizando nuevamente y para ambos casos diferentes concentraciones de los mismos, los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 23 y 24.

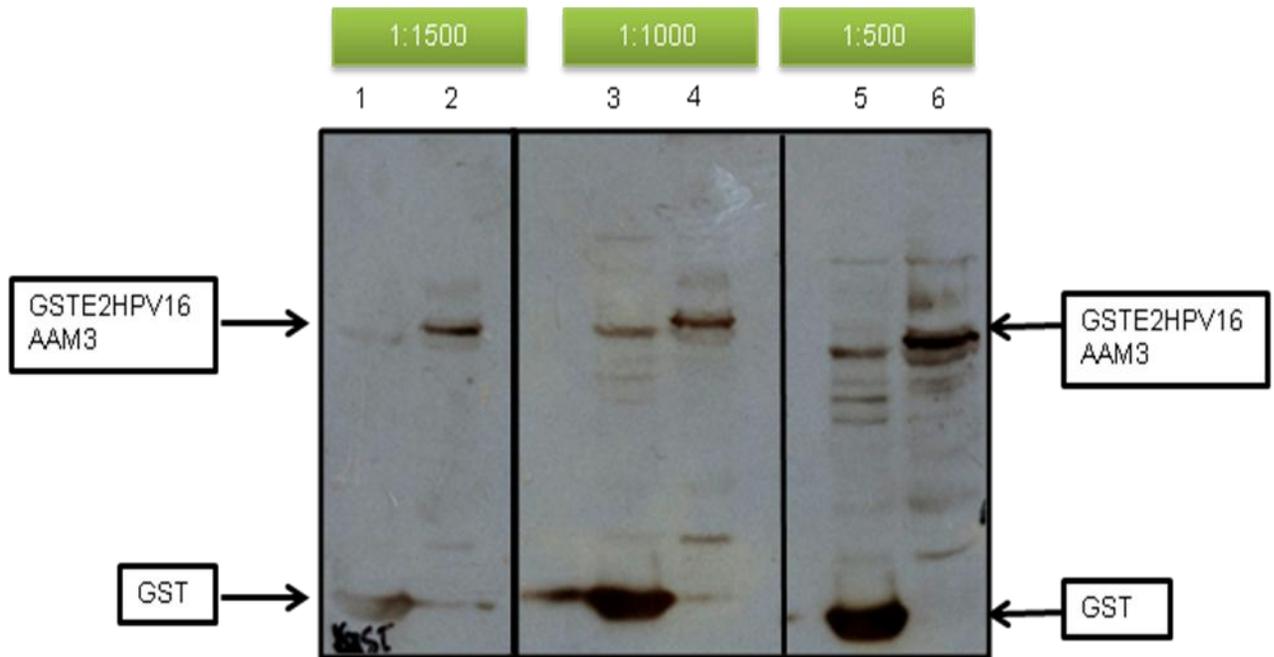


Figura 23. Western-Blot anti-E2 de HPV16 utilizando el anticuerpo producido en el laboratorio. Se muestra la señal correspondiente a la proteína de fusión GST-E2HPV16AAM3 de aproximadamente 70 kDa, en los carriles 2, 4 y 6; en los carriles, 1, 3 y 5 se muestra la señal correspondiente a GST de aproximadamente 26 kDa dada con el anticuerpo anti-E2 de HPV16 casero a diferentes concentraciones.

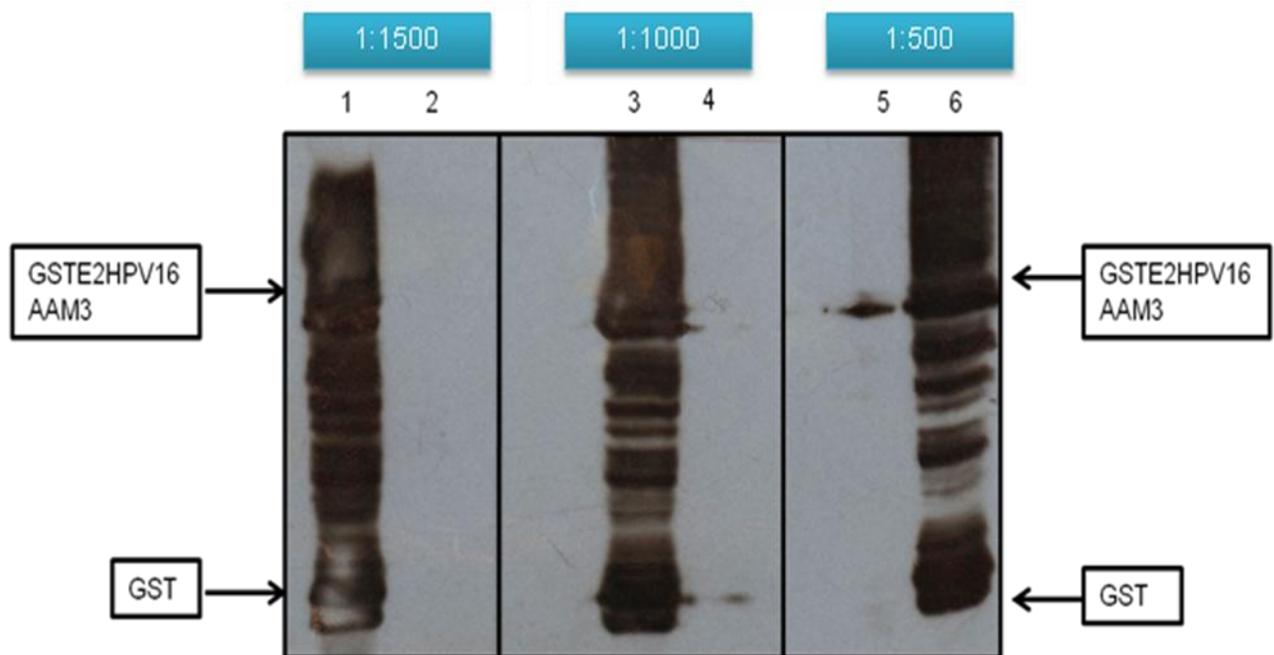


Figura 24. Western-Blot anti-E2 de HPV16 utilizando el anticuerpo comercial. Se muestra la señal correspondiente a la proteína de fusión GST-E2HPV16AAM3 de aproximadamente 70 kDa, en los carriles 1, 3 y 6; en los carriles, 2, 4, y 5 se muestra la señal correspondiente a GST de

aproximadamente 26 kDa dada con el anticuerpo anti-E2 de HPV16 comercial a diferentes concentraciones.

A partir de estos resultados se puede decir que la concentración más adecuada del anticuerpo primario para la detección de las proteínas de fusión GST-E2HPV16AAM3 (70kDa) y GST (26kDa) fueron las siguientes:

- ❖ anti-GST de 1:1000.
- ❖ anti-E2 de HPV16 producido en el laboratorio de 1:1500.
- ❖ anti-E2 de HPV16 comercial de 1:1500.

También podemos afirmar que el uso de la construcción pGEX2T-E2HPV16AAM3 funciona de manera adecuada para poder inducir la expresión de la proteína de fusión GST-E2HPV16AAM3 la cual se obtiene en calidad y cantidad suficiente para poder realizar los ensayos de interacción *in vitro*.

3. Producción de hTAF1-N marcada radioactivamente *in vitro*.

Se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α , con el plásmido pOS7-hTAF1N para propagarlo, aislarlo y purificarlo. La proteína hTAF1-N marcada radiactivamente se obtuvo mediante ensayos de Transcripción-Traducción acopladas *in vitro* en reticulocitos de conejo, marcada radioactivamente con ^{35}S -metionina, usando la construcción pOS7-hTAF1N correspondiente a la proteína antes mencionada (figura 25). Estos ensayos se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante (Promega). De acuerdo con este resultado podemos decir que los ensayos de Transcripción-Traducción *in vitro* nos permitió obtener suficiente proteína marcada radiactivamente con [^{35}S]-metionina, en calidad y cantidad suficiente para poder realizar los ensayos de interacción *in vitro*.

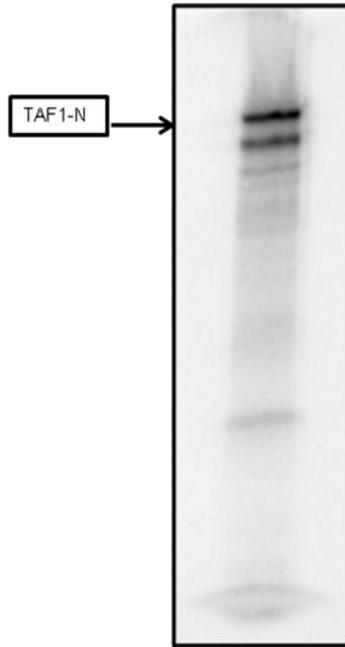


Figura 25. Migración electroforética de hTAF1-N marcada radiactivamente y obtenida por medio de Transcripción-Traducción *in vitro* en lisado de reticulocitos de conejo.

4. Análisis de la Interacción entre hTAF1-N y las proteínas E2HPV16AA y E2HPV16AAM3

Se realizaron los ensayos de interacción de la proteína hTAF1-N marcada radiactivamente, con las proteínas de fusión previamente capturadas en glutatión-Sefarosa GST-E2HPV16AA (control positivo) y GST-E2HPV16AAM3, usando como control de la interacción a la proteína GST (control negativo). En la figura 26 se muestra una imagen representativa de los resultados de la interacción de ambas proteínas de fusión con la proteína hTAF1-N. Se observa que la proteína hTAF1-N presenta una mayor interacción con la proteína de fusión GST-E2HPV16AA que con la GST-E2HPV16AAM3.

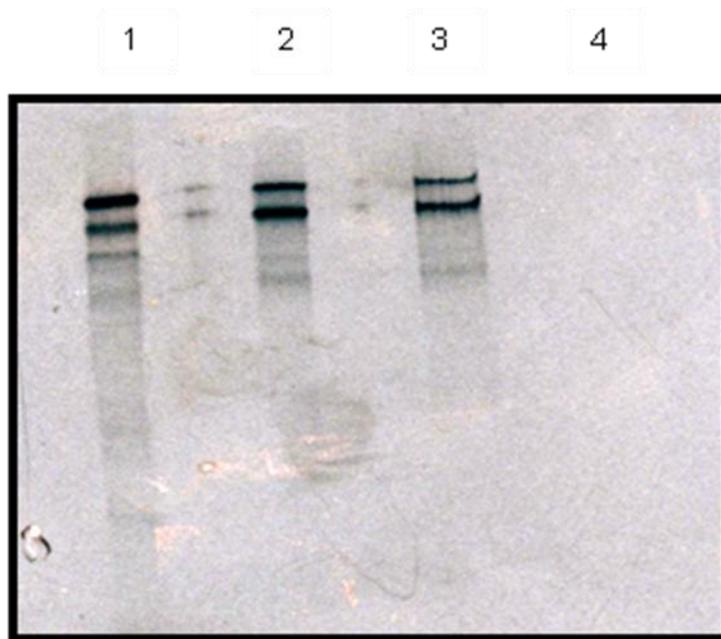


Figura 26. Interacción entre hTAF1-N marcada radioactivamente y las proteínas E2HPV16AA y E2HPV16AAM3. Carril 1 hTAF1-N sola, 2 hTAF1-N y E2HPV16A, 3 hTAF1-N y E2HPV16AAM3, 4 hTAF1-N y GST.

Para cada ensayo de interacción se realizó un control para descartar que las interacciones no se debieran a las variaciones en las proteínas capturadas en glutatión-Sefarosa (GST, GST-E2HPV16AA y GST-E2HPV16AAM3), un gel representativo de dichos controles de carga se muestra en la figura 27.

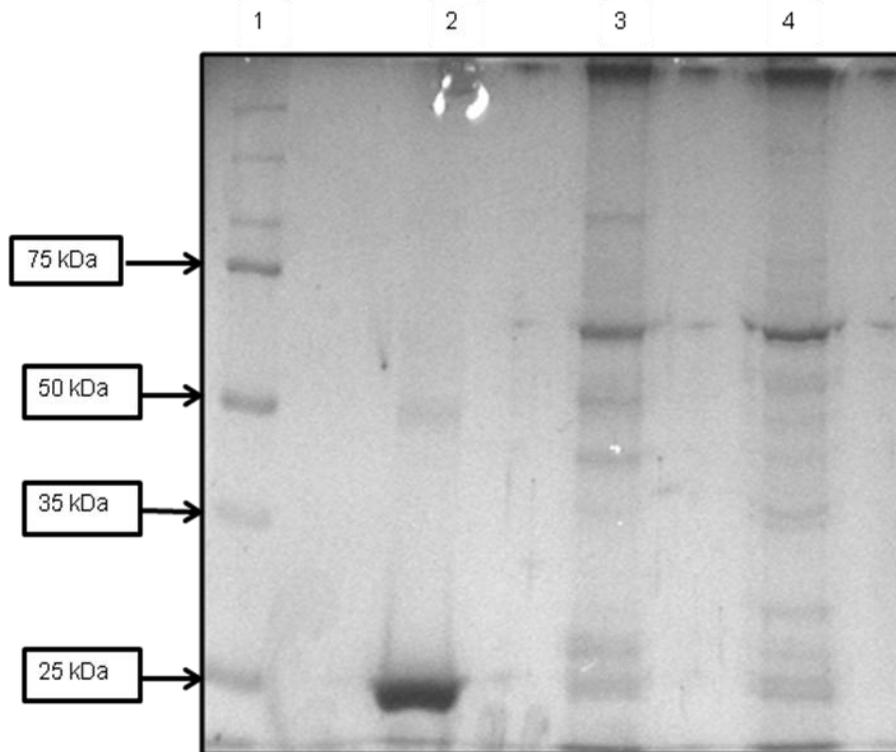


Figura 27. Controles de carga. Geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. Carril 1 marcadores moleculares, 2 GST, 3 GST-E2HPV16AAM3 y 4 GST-E2HPV16AA.

Realizando un análisis densitométrico a partir de los resultados obtenidos de la interacción entre hTAF1-N marcada radioactivamente y las proteínas E2HPV16AA y E2HPV16AAM3, que se muestran en la figura 25 se observó lo siguiente:

Tabla 2. Porcentaje que se presentó en la interacción entre las proteínas E2AAM3 y E2AA con hTAF1-N.

TAF1-N "input" = total cargado	0%
E2HPV16AA	100%
E2HPV16AAM3	33.81%

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La proteína E2 del virus de papiloma humano juega un papel importante en el desarrollo del CaCU, ya que se sabe que esta proteína tiene diferentes funciones en los procesos moleculares del ciclo replicativo del HPV. La proteína E2 es la principal molécula reguladora de la transcripción del genoma viral, funcionando como activador de la expresión de los oncogenes E6 y E7 en fases tempranas (Anston *et al.*, 2000; Hedge, 2002) y como represor en etapas tardías del ciclo viral a través de su unión a los E2BSs (Anston *et al.*, 2000); se asocia con la proteína E1 del virus del HPV para regular la replicación del genoma viral; y participa en la segregación del genoma viral asociado a los cromosomas celulares (Hedge, 2002).

Se ha visto que en la mayoría de los cánceres cervicales las células transformadas poseen varias copias del genoma de HPV, el cual se encuentra integrado en los cromosomas. En la mayoría de estos casos, el gen E2 ha sido afectado o roto. Además se ha visto que tanto el rompimiento del marco de lectura del gen E2 como las mutaciones en él, incrementan la eficiencia de inmortalización del HPV16 (Webster *et al.*, 2000; Romanczuk y Howley, 1992). Se ha demostrado que la proteína E2 puede provocar efectos en la fisiología celular, ya sea inhibición en la proliferación celular, bloqueo del ciclo celular, senescencia o apoptosis (Webster *et al.*, 2000). Se piensa que los efectos producidos por la proteína E2 sobre el ciclo celular pueden deberse a la interacción que presenta con otras proteínas celulares; como lo son los componentes de la maquinaria basal de la transcripción, tales como TBP y factores asociados a ella (TAFs); algunos factores de transcripción como son Sp1 y p53; o con proteínas remodeladoras de la cromatina que tienen actividad de histona acetil-transferasas como CBP, p300 y p/CAF (Hou *et al.*, 2000; Hou *et al.*, 2002).

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado la interacción entre las proteínas E2 de los virus BPV1 y HPV 18, con diferentes hTAF's, (Carrillo et al,

2004) y la interacción entre las proteínas E2 de las variantes E y AA del HPV-16 con hTAF1 (Centeno *et al.*, 2007; Ramírez-Salazar, 2005). Estos resultados pusieron de manifiesto que la proteína E2 de los diferentes tipos y variantes virales, poseen una afinidad diferente en su interacción *in vitro* con hTAF1, tal y como se muestra en las figuras 12 y 13. De acuerdo con estos resultados se puede decir que la mayor oncogenicidad de la variante AA con respecto a la variante E del HPV16, podría deberse a que la proteína E2AA tiene una mayor fuerza de interacción con hTAF1, lo que favorece la unión de componentes del PIC y la transcripción, debido a que TAF1 tiene la capacidad de unión al núcleo del promotor en los elementos iniciadores, así como la actividad de histona acetil-transferasa (Jacobson *et al.*, 2000; Carrillo *et al.*, 2004).

En nuestro grupo de trabajo, Centeno *et al.* demostraron que la proteína E2E puede cooperar con TAF1 para activar la transcripción. De la misma forma, Campos-León corroboró que esto sucede también con la proteína E2AA, y que la interacción *in vitro* E2AA-TAF1 sucede también *in vivo*. Con la intención de evaluar la participación de regiones particulares de E2 involucradas en estos efectos, Campos-León también realizó cambios a la secuencia de aminoácidos del DBD de la proteína E2AA, a través de mutagénesis sitio-dirigidas, los cambios de aminoácidos fueron los siguientes:

Tabla 3: Cambio de aminoácidos de la proteína E2AA

1 ^{er} cambio	2 ^{do} cambio	3 ^{er} cambio
N²⁹⁶-A²⁹⁶	K²⁹⁹-A²⁹⁹	R³⁰⁴-A³⁰⁴
AA T → G CT	AA A → G CT	AG A → G CT

Estos cambios tienen como consecuencia en la proteína E2AAM3 un abatimiento en su capacidad de unión al DNA (Webster *et al.*, 2000), y de acuerdo con los datos obtenidos por Campos-León, esto se vió reflejado en la pérdida de su actividad como proteína represora de la transcripción. Además, sus datos

sugieren que la proteína E2 actúa como un co-activador transcripcional, ya que puede activar la transcripción sin unirse al DNA.

A través de los E2-BSs que se encuentran situados en la inmediación a la caja TATA del promotor, la proteína E2 puede impedir que se lleve a cabo la transcripción, siendo este el principal mecanismo de represión de la transcripción por la proteína E2, ya que su unión al DNA constituye un impedimento en la configuración espacial para la unión de los factores celulares y el ensamblaje de la maquinaria basal de la transcripción, por lo tanto la función de E2 como represor transcripcional requiere forzosamente de su unión al DNA (Campos-León, 2008).

Es por esto que nos propusimos demostrar y analizar si los cambios en la secuencia de unión al DNA de la proteína E2AA (E2AAM3), afectan su interacción *in vitro* con hTAF1-N. Para este fin se realizó la construcción plasmídica pGEX2T-E2HPV16AAM3, que nos permitió la expresión de la proteína E2AAM3 (figura 17). Esta construcción fue introducida a bacterias BL21DE3 y la expresión de la proteína fue inducida con IPTG, para así obtener una proteína de fusión GST-E2HPV16AAM3 (figura 19). Para comprobar la identidad de la misma se realizaron inmunodetecciones con tres distintos anticuerpos: anti-E2 comercial, anti-E2 producido en nuestro laboratorio y anti-GST (Figuras 22, 23 y 24). Con estos resultados podemos afirmar que el uso de la construcción pGEX2T-E2HPV16AAM3 funcionó de manera adecuada para la inducción de la proteína de fusión GST-E2HPV16AAM3 la cual se obtuvo en calidad y cantidad suficiente.

Obtenido esto, la proteína se sometió a los ensayos de interacción con hTAF1-N. En nuestros resultados se muestra que la proteína E2AAM3 se une a hTAF1-N (figura 25), aparentemente la interacción de esta proteína viral es menor que la interacción presentada por la proteína E2 de HPV16 variante Asiático-Americana prototipo, lo que nos sugiere que los cambios presentes en la secuencia de aminoácidos de la proteína E2AAM3 provocan una conformación que le confiere una menor afinidad por hTAF1-N. Tomando en cuenta el análisis

densitométrico (Tabla 2) se observa que la interacción presentada entre E2AAM3 y hTAF1-N es de un porcentaje considerablemente bajo (33.81%) en comparación con E2AA (100%).

Los cambios realizados en el DBD de la proteína E2 (N²⁹⁶A, K²⁹⁹A, R³⁰⁴A) abaten su capacidad de unión a los E2-BSs, lo que haría suponer primeramente que su actividad de regulador transcripcional se vería nulificada. Sin embargo los resultados obtenidos por Campos-León indicaron que la forma mutada de la proteína E2 que no se une al DNA, aun es capaz de activar la transcripción y además, aún es capaz de cooperar con TAF1 en la activación transcripcional. Esto sugiere, que las mutaciones realizadas, no abaten la unión de E2 con TAF1, y que la interacción de ambas proteínas aún puede llevarse a cabo. Los ensayos realizados en este trabajo, corroboran este dato, ya que la interacción entre ambas proteínas aunque se ve disminuida, aún sucede.

Puede decirse que la fuerza de interacción *in vitro* de la proteína E2AA del HPV-16 con TAF1 es mayor que la de la proteína E2AAM3, lo que correlaciona con los datos *in vivo* que muestran que E2AAM3 tiene una menor eficiencia como activadora de la transcripción que su contraparte natural. También podemos señalar que los cambios de la proteína E2AAM3 se ven reflejados en la pérdida de su actividad como proteína represora de la transcripción en los ensayos *in vivo*, además podemos decir que la unión de la proteína E2 al DNA no es indispensable para llevar a cabo la transcripción, pero si es necesaria para la represión de la transcripción (Campos-León, 2008).

A diferencia de su papel como activador de la transcripción, la función como represor transcripcional de la proteína E2 requiere necesariamente de su unión al DNA, (Anston *et al.*, 2000; Hou *et al.*, 2002; Campos-León, 2008) el cual se encuentra abatido en la proteína E2AAM3, y por lo tanto hay poca interacción con la proteína celular TAF1.

CONCLUSIÓN

CONCLUSIÓN

Con nuestros resultados hemos demostrado que la proteína E2HPV16AAM3 presenta poca interacción con la proteína hTAF1-N, y que esta interacción tiene una fuerza menor a la presentada con la proteína E2HPV16AA prototipo.

Se demostró que los cambios en la secuencia de aminoácidos en la unión al dominio del DNA de la proteína E2 del HPV-16 variante Asiático-Americana Mutante triple modificaron su interacción con hTAF1-N, ya que la actividad transcripcional dependiente de hTAF1-N requiere de los sitios de unión de E2 al DNA.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Antson A, Burns J, Moroz O, Scott D, Saunders L, Bronstein I, Dodson G, Wilson K, Maitland N. (2000). **Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein.** *Nature*. 403(6771): 805-809.
- Berumen J, Ordoñez M.R, Lazcano E, Salmeron J, Galván S, Estrada R, Yunes E, García-Carrancá A, González-Lira G, Madrigal-de la Campa A. (2001). **Asian-American variants of Human Papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case–control study.** *Journal of the National Cancer Institute*, 93(17): 1325-1330.
- Blachon S, Bellanger S, Demeret C, Thierry F. (2005). **Nucleo-cytoplasmic shuttling of high risk human papillomavirus E2 proteins induces apoptosis.** *The Journal of Biological Chemistry*. 280(43): 36088–36098.
- Blachon S, Demeret C. (2003). **The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic.** *Biochimie* 8: 813–819.
- Bosch F, Lorincz A, Muñoz N, Meijer C.J, Shah K.V. (2002). **The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer.** *J Clin Pathol*, 55(4):244-65
- Bosch F, Muñoz N, Shah K. (1992). **Second International Workshop on the epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus.** *Int J Cancer*. 52:171-173.
- Burns J y Maitland N. (2005). **Human Papillomaviruses and cancer.** *Microbiology today*. 56:116-120.
- Calixto-Gómez M. (2005). **Vacunas contra el Papilomavirus humano.** *Tesis de maestría. Laboratorio de Inmunología clínica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá.*
- Campos-León K. (2008). **Análisis de la participación de TAF1 en la función de regulador transcripcional de la proteína E2 del HPV-16.** *Tesis de Maestría. Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN.*

- Carrillo E, Garrido E, Gariglio P. (2004) **Specific in vitro Interaction between Papillomavirus E2 Proteins and TBP-Associated Factors.** *Intervirology* 47, 342-349.
- Casas L, Galván SC, Ordoñez RM, López N, Guido M, Berumen J. (1999). **Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplifier in cervical carcinomas.** *Int. J. Cancer* 83: 449-455.
- Centeno F. (2003). **Análisis de la región de hTAF 250 que interactúa con la proteína E2 de HPV16.** *Tesis de Maestría, departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN.*
- Centeno F, Ramírez-Salazar E, García-Villa E, Gariglio P, Garrido E. (2007). **TAF1 Interacts with and modulates human papillomavirus 16 E2-dependent transcriptional regulation.** *Intervirology* 51: 137-143.
- Cortés-Gutiérrez E.I y Leal-Garza C.H. (2001). **Papilomavirus humano. Biología molecular y patogénesis.** *Revista Salud Pública y Nutrición.* Vol 2 No. 2 Abril-Junio.
- Cutts F.T, Franceschi S, Goldie S, Castellsague X, de Sanjose S, Garnett G, Edmunds W.J, Claeys P, Goldenthal K.L, Harper D.M, Markowitz L. (2007). **Human papilomavirus and HPV vaccines: a review.** *Bolletín of the World Health Organization.* 85: 19-26.
- de Villiers E.M, Fauquet C, Broker T.R, Bernard H.U, zur Hausen H. (2004). **Classification of papillomaviruses.** *Virology.* 324:17-27.
- Dikstein R, Ruppert S, Tijan R. (1996). **TAF_{II}250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the basal transcription factor RAP74.** *Cell.* 84: 781-790.
- Doorbar J. (2006). **Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer.** *Clinical Science.* 110:525-541.
- Dunphy E, Johnson T, Auerbach S, Wang E. (2000). **Requirement for TAF_{II}250 acetyltransferase activity in cell cycle progression.** *Molecular and Cellular Biology.* 20(4): 1134-1139.

- Flores E.R y Lambert P.F. (1997). **Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle.** *J Virol.* 71(10): 7167-7179.
- García-Carrancá A y Gariglio V.P. (1993). **Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cérvico-uterino.** *Revista de Investigación Clínica.* Vol 45 No 1 Enero-Febrero, 85-92.
- Gilbert D.M y Cohen S.N. (1987). **Bovine papilloma virus plasmid replicate randomly in mouse fibroblast throughout S phase of cell cycle.** *Cell.* 50(1): 59-68.
- Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck R.E, Sapp M. (2001). **Human Papillomavirus infection requires cell surface heparin sulfate.** *J Virol.* 75(3): 1565-1570.
- Harris S, Botchan M. (1999). **Crystal structure of the human papillomavirus type 18 E2 activation domain.** *Science.* 284: 1673-1677.
- Harwood C.A y Proby C.M. (2002). **Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer.** *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15: 101–114.
- Hegde R.S. (2002). **The Papillomavirus E2 Proteins: Structure, Function, and Biology.** *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31:343-360.
- Heilman C, Law M, Israel M, Howley P. (1980). **Cloning of human papilloma virus genomic DNAs and analysis of homologous polynucleotide sequences.** *J Virol.* 36(2): 395–407.
- Hou S.Y, Wu S.Y, Chiang C.M. (2002). **Transcriptional Activity Among High and Low Risk Human Papillomavirus E2 Proteins Correlates with E2 DNA Binding.** *Journal of Biological Chemistry.* Vol. 277: 45619-45629.
- Hou S.Y, Wu, S.Y, Zhou T, Thomas M.C, Chiang C.M. (2000). **Alleviation of Human Papillomavirus E2-Mediated Transcriptional Repression via Formation of a TATA Binding Protein (or TFIID)-TFIIB-RNA Polymerase II-TFIIF Preinitiation Complex.** *Molecular and Cellular Biology.* 20(1): 113-125.
- Jacobson R, Ladurner A, King D, Tjian R. (2000). **Structure and function of a human TAF_{II}250 double bromodomain module.** *Science.* 288: 1422-1429.

- McBride A, Byrne J.C, Howley P.M. (1989). **E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: Transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 86: 510-514.
- McBride A, Romanczuk H, Howley P.M. (1991). **The papillomavirus E2 regulatory proteins.** *The Journal of Biological Chemistry.* 266 (28): 18411-18414.
- Mizzen C, Yang X, Kokubo T, Brownell J, Bannister A, Owen-Hughes T, Workman J, Wang L, Berger S, Kouzarides T, Nakatani Y, Allis C. (1996). **The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity.** *Cell.* 87(7): 1261-1270.
- Morbeg M. (2004). **Human Papillomavirus load and cervical carcinoma.** Acta Universitatis Upsaliensis. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine* 1349. 50 pp. Uppsala.
- Morgan H, Balduzzi P. (1964). **Propagation of an intranuclear inclusion forming agent from human condyloma acuminatum.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 52(6): 1561–1564.
- Munger K. (2004) **Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis.** *J.Virol.* 78(21): 11451–11460.
- Muñoz N, Castellsagué X, de González A and Gissmann L. (2006). **Chapter 1: HPV in the Etiology of Human Cancer.** *Vaccine* 24S3, S1-S10.
- Nadra A.D, Eliseo T, Mok Y.K, Almeida F, Bycroft M, Paci M, de Prat-Gay G, Cicero D.O. (2004). **Solution Structure of the HPV-16 E2 DNA Binding Domain, a Transcriptional Regulator with a Dimeric Beta-Barrel Fold.** *Journal of Biomolecular NMR* 30: 211-214.
- Ordóñez R.M, Espinosa A.M, Sánchez-González D.J, Armendáriz-Borunda J, Berumen J. (2004) **Enhanced Oncogenicity of Asian-American Human Papillomavirus 16 Is Associated with Impaired E2 Repression of E6/E7 Oncogene Transcription.** *Journal of General Virology* 85, 1433–1444.
- Orth G, Favre M, Croissant O. (1977). **Characterization of a New Type of Human Papillomavirus That Causes Skin Warts.** *J Virol.* 24(1): 108–120.

- Palacio-Mejía L.S., Rangel-Gómez G., Hernández-Ávila M., Lazcano-Ponce E. (2003). **Cervical cancer, a disease of poverty: mortality differences between urban and rural areas in Mexico.** *Salud pública Méx* vol.45 suppl.3. S315-325.
- Palefsky J.M, Winkler B. Rabanus J.P. (1991). **Characterization of in vivo expression of the human papillomavirus type 16 E4 protein in cervical biopsy tissues.** *J Clin Invest.* 87(6): 2132-2141.
- Persson G, Andersson K, Krantz I. (1996). **Symptomatic genital papillomavirus infection in a community. Incidence and clinical picture.** *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 75: 287–290.
- Pfister H. (2003). **Human papillomavirus and skin cancer.** *J. Natl. Cancer. Inst. Monogr.* 31: 52–56.
- Ramírez-Salazar E. (2005). **Análisis de la Interacción de la Proteína E2 del Virus del Papiloma Humano Tipo 16 Variante Asiático-Americana (HPV16AA) con la Proteína hTAFII250.** *Tesis de Maestría, Depto. de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN.*
- Rawls A, Puztai R, Green M. (1990). **Chemical synthesis of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein: autonomous protein domains for induction of cellular DNA synthesis and for trans activation.** *J Virol.* 64(12): 6121–6129.
- Schweiger M, You J, Howley P. (2006). **Bromodomain Protein 4 Mediates the Papillomavirus E2 Transcriptional Activation Function.** *Journal of Virology,* 80(9): 4276–4285.
- Seedorf K, Krämmer G, Dürst M, Suhai S, Röwekamp W.G. (1985). **Human Papillomavirus Type 16 DNA Sequence.** *Virology.* 145: 181-185.
- Siegert A.L, Robbins P.D. (1999). **Rb Inhibits the Intrinsic kinase activity of TATA-binding protein-associated factor TAF_{II}250.** *Molecular and Cellular Biology.* 19 (19): 846-854.
- Spalholz B.A, Yang Y, Howley P.M. (1985). **Transactivation of a bovine papilloma virus transcriptional regulatory element by the E2 gene product.** *Cell* 42:183–191.

- Stanley M. (2001) **Human Papillomavirus and cervical carcinogenesis.** *Bailliere Clin Obstet Gynaecol.* 15(5):663-676.
- Straight S, Herman B, McCance D. (1995). **The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes.** *J. Virol.* 69(5): 3185-3192.
- Stone R. (1959). **Electron Microscope Study of the Development of the Papilloma Virus in the skin of the rabbit.** *The Journal of Experimental Medicine.* Vol 110: 543-546.
- Stöppler M.C, Ching K, Stöppler K, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. (1996). **Natural Variants of the Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein Differ in Their Abilities to Alter Keratinocyte Differentiation and to Induce p53 Degradation.** *Journal of Virology* 70, 6987-6993.
- Tan S.H, Leong L, Walker P, Bernard H.U. (1994). **The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID.** *J Virol.* 68(10): 6411-6420.
- Taylor E.R y Morgan J.M. (2003). **A novel technique with enhanced detection and quantitation of HPV16 E1 and E2 mediated DNA replication.** *Virology.* 315:103-109.
- Tornesello M.L, Duraturo M.L, Buonaguro L, Vallefucio G, Piccoli R, Palmieri S, Buonaguro F.M. (2007). **Prevalence of human papillomavirus genotypes and their variants in high risk West Africa women immigrants in South Italy.** *Infectious Agents and Cancer.* 2:1.
- Verrijzer C.P, Chen J.L, Yokomori K, y Tijan R. (1995). **Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II.** *Cell.* 81:1115-1125.
- Wang E.H, Zou S, Tijan R. (1997). **TAFII250-Dependent Transcription of Cyclin A is Directed by ATF Activator Proteins.** *Genes & Development.* 11, 2658-2669.
- Wassarman D, Aoyagi N, Pile L, Schlag E. (2000). **TAF250 is required for multiple developmental events in *Drosophila*.** *PNAS.* 97(3):1154-1159.

- Wassarman D, Sauer F. (2001). **TAF_{II}250: a transcription toolbox.** *Journal of Cell Science.* 114: 2895-2902.
- Webster K, Parish J, Pandya M, Stern P.L, Clarke A.R, Gaston K. (2000). **The Human Papillomavirus (HPV) 16 E2 Protein Induces Apoptosis in the Absence of Other HPV Proteins and Via a p53-Dependent Pathway.** *Journal of Biology Chemistry.* 275: 87-94.
- Wells S, Francis D.A, Karpova A.Y, Dowhanck J.J, Benson J.D, Howley P.M. (2000). **Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRb- and p21^{CIP}-dependent pathways.** *The EMBO Journal* 19 (21): 5762-5771.
- Wolf J y Ramírez P. (2001). **The molecular biology of cervical cancer.** *Cancer investigation.* 19(6), 621-629.
- Yamada T, Manos M.M, Peto J, Greer C, Muñoz N, Bosch F.X, Wheeler C.M. (1997). **Human Papillomavirus Type 16 Sequence Variation in Cervical Cancers: a Worldwide Perspectiva.** *Journal of Virology* 71(3): 2463-2472.
- Zur Hausen H. 1976 **Condylomata acuminata and human genital cáncer.** *Cancer Res.* 36:794.