



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de la cotransfección de la región larga de
control de distintos tipos de virus del papiloma
humano de alto riesgo, en su actividad
transcripcional**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

SAIDA CHACÓN CEDILLO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN**

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

<p>1. Datos del Alumno Chacón Cedillo Saida 56030925 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad Ciencias Biología 303641793</p>
<p>2. Datos del tutor Dra Marcela Lizano Soberón</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr Luis Alonso Herrera Montalvo</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dr Emilio Joaquín Córdova Alarcón</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dr Benito Estrada Mena</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 M en C Alejandro López Saavedra</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Efecto de la cotransfección de la región larga de control de distintos tipos de virus del papiloma humano de alto riesgo, en su actividad transcripcional 63p 2013</p>

La reflexión es el camino hacia la inmortalidad (nirvana),
la falta de reflexión, el camino hacia la muerte.

Gautama Buddha

Dedicada a Diana y a Charly, dos angeles
en mi vida. Siempre los llevaré en mi
corazón. Los amo.

AGRADECIMIENTOS

A la vida por darme la oportunidad de ser quien soy y vivir este sueño.

A mis padres y a mi hermano Julián por su apoyo incondicional y su gran amor y cariño. Gracias por todo, son lo mejor que me han pasado en la vida.

A mis tíos, tías y primos por sus consejos y recomendaciones y por escuchar mis bromas y frustraciones a lo largo de este camino. Y en gran medida a Vladi y a mi tía Martha por su apoyo, sus largas charlas y comidas excepcionales.

A la UNAM, a la Facultad de Ciencias y al INCAN por permitirme vivir esta experiencia llena de retos y alegrías.

A la Dra. Marcela Lizano por todo su apoyo, comprensión, por creer en mi y por permitirme concluir esta etapa tan importante en mi vida abriéndome las puertas de su laboratorio.

A Yisus, Linda, Rodrigo (Esclavo), Angélica, Angela, Elihú y a todos mis amigos de la facultad por formar parte de mi trayecto durante la carrera y compartir conmigo ratos de estudio y también de diversión.

A Mimí, Mariana, Omar, Maniwis, Joaquín y Marita por ser más que mis compañeros de trabajo, mis compañeros de viaje, por ser mis incondicionales y hacer de este viaje un verdadero disfrute. Y por supuesto a Paola mi complemento espiritual y a Hernán por ser como mi segundo hermano.

A mi Caballo adorado por que sin ti nunca hubiera terminado de escribir la tesis. Gracias por ser mi compañero, maestro y amigo en momentos de locura y de aprendizaje.

A Alejandro López por ser mi maestro y amigo, por compartir conmigo la pasión por la ciencia. Y por estar ahí siempre que lo necesité.

A mis dos guías, a Raúl Forcada por enseñarme a ver la vida con mayor alegría, apoyarme en momentos críticos y escucharme hasta el cansancio, y a Gisela López por ayudarme a descubrir mi vida espiritual y darme las herramientas para ser más fuerte cada día.

A todos mis compañeros del laboratorio que fueron punto clave en el desarrollo de todo esto. Gracias por ayudarme y brindarme su amistad.

Al Dr. Luis Herrera y a los integrantes de su laboratorio por permitirme entrar a su laboratorio y hacerme sentir como en casa y al Dr. Emilio Córdova por su apoyo, por escucharme y aconsejarme.

A cada una de las personas que transitó por mi vida durante este periodo y que me brindó su apoyo, comprensión y cariño.

Índice

Índice de tablas.....	I
Índice de figuras.....	II
Lista de abreviaturas.....	III
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
2.1. Cáncer Cervico Uterino (CaCu).....	3
2.2 .Virus del Papiloma Humano como factor etiológico.....	3
2.3. Características moleculares del Virus del.....	4
Papiloma Humano	
2.3.1. Genoma del Virus del Papiloma Humano.....	4
2.3.2. Región Larga de Control.....	6
2.3.3. Factores de transcripción.....	9
2.3.4. Oncoproteínas E6 y E7 y la transformación.....	13
celular	
2.4. Ciclo de vida del Virus del Papiloma Humano.....	15
2.5. Transformación inducida por el Virus del.....	18
Papiloma Humano	
2.6. Coinfecciones: Implicaciones en CaCu.....	18
3. Justificación.....	21

4. Hipótesis.....	22
5. Objetivo General.....	22
6. Objetivos específicos.....	22
7. Materiales y Métodos.....	23
7.1. Oligonucleótidos específicos.....	23
7.2. Plásmidos.....	23
7.3. Bacterias.....	24
7.4. Líneas Celulares.....	24
7.5. Construcción de vectores.....	25
7.5.1. Amplificación de las LCR mediante PCR.....	25
7.5.2. Digestión y ligación de vectores reporteros.....	26
7.6. Transformación bacteriana de células competentes.....	28
con los productos de ligación	
7.7. Obtención de los vectores construidos.....	29
7.8. Secuenciación de los vectores construidos.....	31
7.9. Transfección de las líneas celulares inmortalizadas.....	32
7.10. Ensayo de luciferasa.....	34
8. Resultados.....	35
8.1. Amplificación de las LCR de interés.....	35
8.2. Digestión con enzimas de restricción y ligación.....	37
de productos de PCR	
8.3. Detección del inserto en los vectores construidos.....	40

8.4. Transfecciones y cotransfecciones en HaCaT y C33.....	42
9. Discusión y conclusión	44
10. Bibliografía	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de oligonucléotidos específicos.....	21
para la amplificación de las LCR	
Tabla 2. Controles negativos y positivos del PCR.....	23
Tabla 3. Reacción de PCR para amplificación de LCR.....	24
Tabla 4. Condiciones de temperatura y tiempo para ciclo.....	24
de PCR	
Tabla 5. Reacciones de digestión.....	26
Tabla 6. Reacción de Ligación.....	26
Tabla 7. Reacción de PCR de colonias.....	29
Tabla 8. Reacción de digestión para liberación del inserto.....	29
Tabla 9. Reacción para secuenciación automatizada.....	30
Tabla 10. Condiciones de temperatura y número de ciclos.....	30
para la reacción de secuencia	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mortalidad en mujeres mexicanas por diferentes tipos..... 2 de cáncer	2
Figura 2. Genoma del VPH..... 5	5
Figura 3. Región Larga de Control de los VPH16 y 18..... 8	8
Figura 4. Identificación de las etapas principales del ciclo de vida..... 16 del papilomavirus en el epitelio escamoso	16
Figura 5. Vectores con los genes reporteros..... 25	25
Figura 6. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de..... 35 amplificación por PCR de las LCRs 18, 16 y 58	35
Figura 7. Electroforesis en geles de agarosa de las digestiones..... 36 de los plásmidos para la construcción de vectores con Luc y Rluc	36
Figura 8. Ligación de los vectores reporteros con las distintas LCR..... 38	38
Figura 9. PCR de colonias para comprobar la presencia del inserto.... 39	39
Figura 10. Doble digestión para liberar el inserto de los plásmidos..... 40 extraídos a partir de las colonias elegidas para PCR de colonia	40
Figura 11. Evaluación transcripcional de las LCR del VPH16 y 58..... 41 en la línea celular HaCaT	41
Figura 12. Evaluación transcripcional de las LCR del VPH16 y 18..... 42 en la línea celular C33	42

LISTA DE ABREVIATURAS

CaCu	Cáncer cervico uterino
VPH	Virus del Papiloma Humano
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
LCR	Región Larga de Control
ORF	Marco abierto de lectura
AP1	Proteína activadora 1
cEBP	Proteína potenciadora de unión
NFI	Factor nuclear I
Oct-1	Factor de transcripción-1 de unión a octámero
TEF-1,TEF-2	Factor tirotrófico embrionario
YY1	Factor de transcripción Ying Yang 1
TFIID	Factor iniciador de la transcripción
NFI	Factor nuclear I
ATF	Factor activador de la transcripción
EGF	Factr de crecimiento epidermal
KRF	Factor transcripcional específico de queratinocitos
SV40	Virus del simio 40
AAV	Virus adenoasociados
EBV	Virus de Epstein-Barr
CDK-4,CDK-2	Ciclina dependiente de cinasas
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
PIK3CA	Fosfoinositol 3-quinasa polipéptido catalítico alfa
c-IAP1	Proteína celular inhibidora de la apoptosis 1
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
TSLC1	Supresor de tumores en cáncer de pulmón

1. RESUMEN

A nivel global más del 90% de los cánceres cervicales invasores están asociados a los Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo. El genoma del VPH está conformado por una doble cadena de ADN y se divide en tres regiones, la Región Larga de Control (LCR), la region codificante para las proteínas tempranas y la region codificante para las proteínas tardías. La LCR de los papilomavirus es un segmento genómico que dirige la expresión génica y replicación viral. Algunos de los sitios de unión para los factores de transcripción de la LCR se encuentran presentes en todos los VPH, sin embargo existen variaciones en la ubicación y número de estos sitios de unión los cuales podrían provocar patrones diferenciales de expresión. Por otra parte las infecciones con múltiples tipos de VPH suelen encontrarse tanto en lesiones pre-malignas del cérvix como en cáncer invasor; sin embargo, no es claro cuáles son las implicaciones funcionales y clínicas de presentar coinfecciones de VPH. Por lo tanto resulta importante conocer estas implicaciones así como determinar si es posible que dos tipos de VPH lleven a cabo algún tipo de interacción.

El objetivo de este trabajo fue determinar si la presencia simultánea de dos LCR de distintos tipos de VPH en un mismo cultivo celular modifica la actividad transcripcional de alguna de ellas. Para ello, se utilizaron los tipos de VPH de mayor prevalencia en cáncer y en lesiones premalignas en la población mexicana (VPH16, 18 y 58), se utilizaron dos modelos *in vitro*, uno representativo de lesiones premalignas (HaCaT) y otro de cáncer invasor (C33). Se hicieron transfecciones y cotransfecciones de vectores con las distintas LCR de los VPH y genes reporteros, para determinar si la presencia de dos LCR de diferentes tipos de VPH generaba cambios en la expresión de alguno de ellos.

Se demostró que al cotransfectar la línea celular HaCat con las LCR del VPH16 y 58, la actividad de la LCR16 incrementa de forma significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a su actividad basal. De la misma forma pero con menos intensidad se observó con la combinación de VPH16 y 18 en la línea celular C33. Estos resultados sugieren que una LCR es capaz de afectar la actividad transcripcional de otra en una coinfección con distintos tipos de VPH.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Cáncer Cérvico uterino (CaCu)

El cáncer cérvico uterino es el tercer tipo de cáncer en mujeres y el séptimo de todos los cánceres a nivel mundial, con un estimado de 530,000 nuevos casos en el 2008. Más del 85% de los casos ocurre en países en vías de desarrollo. En el 2008 el cáncer cérvico uterino fue responsable de 275,000 muertes alrededor del mundo (Globocan 2008).

En México la incidencia de CaCu es de 10,186 mujeres al año de las cuales mueren alrededor de 5,217, y representa la segunda neoplasia más frecuente y causa de muerte a nivel nacional (Fig.1) (Globocan 2008).

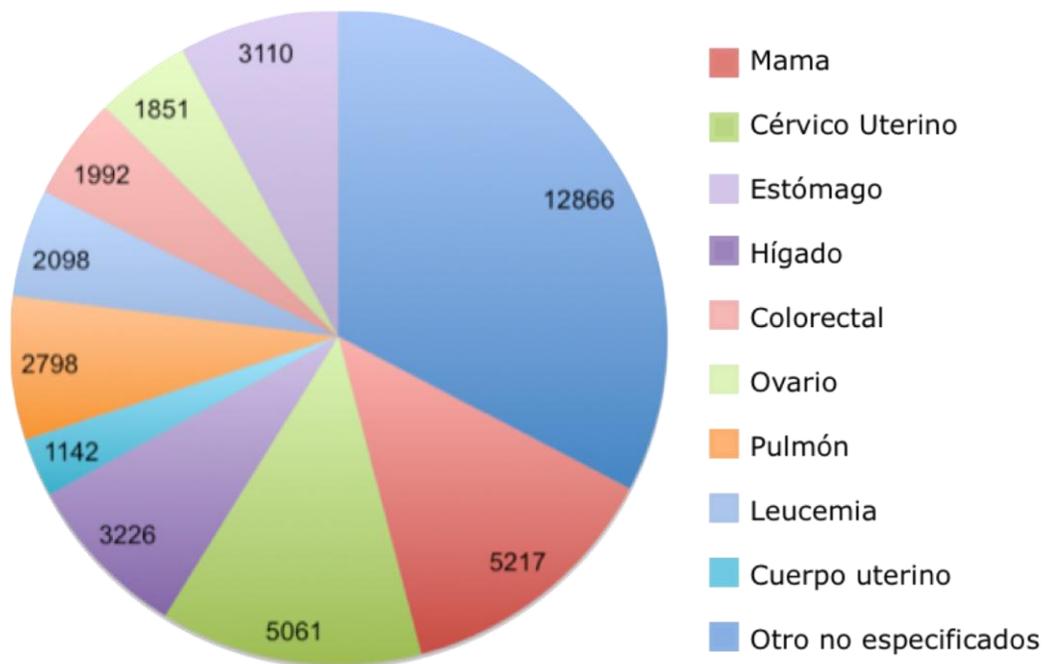


Figura 1. Mortalidad en mujeres mexicanas por diferentes tipos de cáncer. Alrededor de 5,217 mujeres mueren al año, convirtiéndose en la segunda neoplasia más frecuente y muerte por cáncer a nivel nacional (Globocan, 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>).

2.2. Virus del Papiloma Humano como factor etiológico

El virus del papiloma humano es actualmente la infección de transmisión sexual más común en el mundo (Baseman et al., 2005; Dunne et al., 2007; Ebrahim et al., 2005). La mayoría de estas infecciones son asintomáticas y eliminadas en un periodo de 1-2 años (Richardson et al., 2003; Franco et al., 1999; Hildesheim et al., 1994; Ho et al., 1998; Molano et al., 2003) Más de 100 tipos de VPH han sido descritos hasta este momento (Jo et al., 2005) los cuales pueden ser clasificados en virus cutáneos o de la mucosa dependiendo del lugar en el que se da la infección. Aproximadamente 40 de ellos infectan la mucosa genital. Estos virus se clasifican en virus de alto y bajo riesgo de acuerdo a su potencial oncogénico (Motoyama et al., 2004). Los virus de alto riesgo tales como el VPH18, el VPH16 y el VPH31 generan la progresión de las lesiones malignas, mientras los de bajo riesgo tales como el VPH6 y el VPH11 causan verrugas benignas y lesiones las cuales no se transforman en malignas (Li et al., 2005; Sur y Cooper, 1998).

En el mundo más del 90% de los cánceres cervicales invasores están asociados a los virus de alto riesgo. De estos aproximadamente el 55% de los casos son positivos para el VPH16, convirtiéndolo en el tipo de VPH más importante para el desarrollo de CaCu, seguido por el VPH18 en un 15% de los casos (Muñoz et al., 2007). Otros VPH de alto riesgo incluyendo al 31, 33, 35, 45, 52 y 58, que filogenéticamente están relacionados a los VPH16 y 18, representan el 18% restante de todos los casos de cáncer cervical (Smith et al., 2007; Villiers et al., 2001) .

Actualmente el uso de vacunas profilácticas contra el VPH impiden el desarrollo de lesiones de alto grado y cáncer. Estas vacunas van dirigidas contra los tipos virales más frecuentes, como el VPH16 y VPH18 (alto grado) y VPH6 y VPH11 (bajo grado). Estas vacunas no son terapéuticas, de manera que no tienen ningún efecto sobre las lesiones causadas por el VPH (La Torre et al., 2007).

Hasta el momento el tratamiento contra el carcinoma *in situ* del cérvix es la remoción quirúrgica de la lesión. En carcinomas localmente avanzados el

tratamiento es quimio-radioterapia concomitante y braquiterapia, con un porcentaje de supervivencia del 40-70% (Abu-Rustum y Sonoda, 2010; Barton et al., 2006).

2.3. Características moleculares del VPH

2.3.1. Genoma del VPH

El genoma del VPH está conformado por una doble cadena de ADN la cual tiene una longitud de aproximadamente 8kb y se divide en tres regiones, una región no codificante llamada Región Larga de Control (LCR, ~1kb), la región codificante para las proteínas tempranas (E, ~4kb) y la región codificante para las proteínas tardías (L, ~3kb) (Fig. 2) (Longworth y Laimins, 2004, Jo y Kim, 2005). El genoma viral codifica para seis proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y dos proteínas tardías (L1 y L2). La transcripción de los genes tempranos y tardíos está controlada por la LCR. Las proteínas virales son traducidas a partir de ARNm policistrónicos que contienen marcos de lectura sobrelapados (Jo y Kim, 2005).

Cuando el VPH entra a la célula del huésped los genes E1 y E2 son expresados y codificados de manera inicial para la formación de las proteínas para la replicación del ADN viral (Motoyama et al., 2004). E1 y E2 forman un complejo que se une al origen viral de la replicación y recluta polimerasas del huésped que son necesarias para la replicación. E1 presenta una actividad de helicasa, desenrollando el ADN que hay después del origen de la replicación y E2 regula la transcripción de los genes tempranos del promotor viral. Cuando los niveles de E2 son bajos se une al promotor e induce la transcripción, mientras que en altos niveles la transcripción de los genes tempranos se reprime incluyendo a E6 y E7 mediante el impedimento de la unión de los factores de transcripción al promotor viral (Nair y Pillai, 2005) El gen E4 solamente es expresado en las etapas tardías del ciclo viral cuando las partículas virales se ensamblan. El gen E5 frecuentemente es eliminado en las células del carcinoma cervical lo que sugiere que no es necesario para mantener la transformación celular (Longworth y Laimins, 2004).

Por su parte los genes que codifican para las oncoproteínas E6 y E7 provocan la transformación celular en el huésped y se involucran en el mantenimiento del genoma del VPH a un nivel extracromosómico.

Los dos genes tardíos L1 y L2 codifican para las proteínas estructurales que forman la cápside viral la cual presenta una forma icosaédrica compuesta de 72 capsómeros (Jo y Kim, 2005; zur Hausen, 2009a).

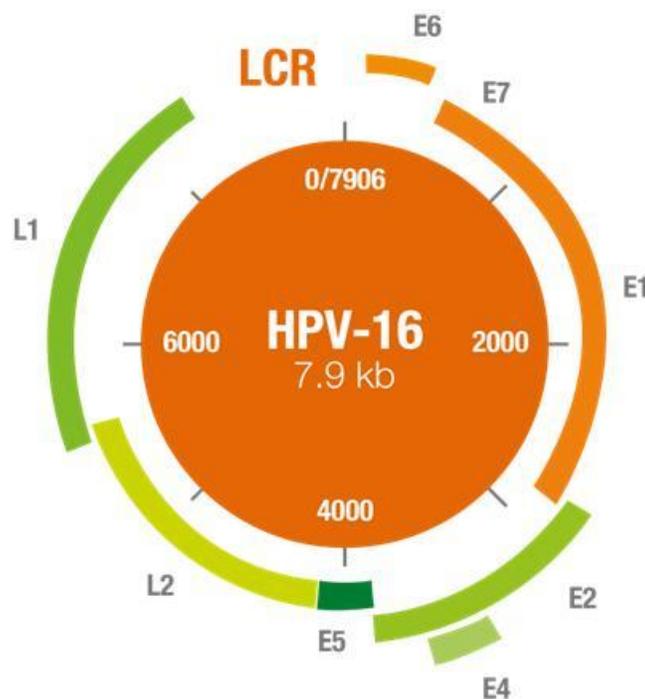


Figura 2. Genoma del VPH. El VPH está compuesto de una molécula de doble cadena de ADN circular de aproximadamente 8000 pares de bases y se encuentra agrupado en genes denominados tempranos y tardíos. Los genes tempranos codifican para seis proteínas que son E1, E2, E4, E5, E6 y E7, y los genes tardíos que codifican para dos proteínas estructurales que son L1 y L2. La región larga de control (LCR) controla la transcripción y replicación del ADN del VPH (Modificado de Niladri y Suraj, 2009).

2.3.2. Región Larga de Control

La región larga de control (LCR) de los papilomavirus es un segmento genómico sin marcos de lectura de traducción abiertos (ORF) el cual contiene una gran cantidad de elementos de respuesta *cis* que dirigen la expresión génica y replicación viral. Su tamaño varía desde un 7% hasta un 11% del total del genoma dependiendo del tipo viral, en el caso de los VPH tiene un tamaño de aproximadamente 850 pares de bases (pb) y se encuentra ubicada entre el gen L1 y el E6 (Bernard y Apt, 1994).

Las LCR de los papilomavirus que están cercanamente relacionados no muestran grandes similitudes en la secuencia nucleotídica. No obstante, se pueden observar un cierto número de motivos cortos que están altamente conservados, y es probable que suceda lo mismo en PV no cercanos (Chong et al., 1990)

La LCR de los VPH contiene cuatro sitios de unión para E2 y los primeros dos de ellos dividen a la LCR en distintos segmentos funcionales, los cuales han sido identificados en tres segmentos: 1) el segmento 5', 2) el segmento central y 3) el segmento 3' (Fig. 3) (Fuchs y Fister, 1994; Lambert, 1991).

❖ **Segmento 5'**: Este segmento tiene un tamaño de aproximadamente 300pb, flanqueado por el codón de terminación de L1 y el sitio de unión para E2. Este sitio contiene la terminación de la transcripción y sitios de poliadenilación para los transcritos tardíos, así como un elemento de regulación negativa que actúa al nivel de la estabilidad del ARNm tardío (Kennedy et al., 1991; Furth y Baker, 1991).

❖ **Segmento central**: Este segmento delimitado por dos sitios de unión a E2, tiene un tamaño de aproximadamente 400pb y se ha demostrado en los VPH11, VPH16 y VPH18 que tiene una función de potenciador transcripcional epitelio específico o “enhancer” (Chin et al., 1989; Cid et al., 1993; Cripe et al., 1987; Gloss et al., 1987). Hoy en día se cree que más que un receptor específico de membrana, el cual puede limitar la infección viral, es un enhancer de tejido específico el cual determina el tropismo epitelial de los VPH (Müller et al., 1995; Roden et al., 1994). Además de proveer una especificidad tisular, el enhancer también está involucrado en la modulación de la expresión de los genes virales en

respuesta al estado fisiológico y de diferenciación de los queratinocitos del huésped en distintas capas del epitelio escamoso estratificado. Tales cambios son provocados por la unión diferencial de los factores de transcripción en los sitios consenso del potenciador (Apt et al., 1993; Bernard y Apt, 1994).

Hasta ahora se han mostrado por lo menos once factores de transcripción celular que se unen *in vitro* a más de 20 diferentes sitios en el enhancer del VPH16. Estos son AP1, cEBP, receptor de glucocorticoide, receptor de progesterona, NFI, NF-IL6, Oct-1, PEF-1, TEF-1, TEF-2 y YY1. En el lado 3', la región central se encuentra flanqueada por el sitio #2 de unión de E2, el cual está involucrado en el inicio de la replicación (Chiang et al., 1992; Russel y Botchan, 1995; Sverdrup y Khan, 1995) y también modula la transcripción de los genes de E6 y E7 (Romanczuk et al., 1990).

❖ **Segmento 3'**: El sitio número 2 de unión a E2 y el gen E6 marcan los límites de este segmento el cual tiene un tamaño de aproximadamente 140pb. Este segmento contiene un solo sitio de unión a E1, el cual se identifica como el origen de replicación. El sitio de inicio de la transcripción, tiene un tamaño de aproximadamente 5 pb ubicado río arriba del ATG de E6 y alrededor de 90pb río abajo del sitio de unión a E1. Un segmento de aproximadamente 45 pb dentro del de 90pb contiene un sitio de unión para el factor de transcripción SP1 y dos sitios de unión para E2, así como la caja TATA (Bouvard et al., 1994; Demeret et al., 1994; Dostatni et al., 1991). Estos cuatro sitios son complejos destinados a la modulación de la actividad promotora de E6/E7. La caja TATA es requerida para la unión de TFIID y el establecimiento del complejo de pre iniciación y el factor SP1 para mediar el efecto de largo alcance del potenciador. Los sitios de E2 se sobrelapan con la caja TATA y con el sitio de SP1, esta interferencia provocada por las proteínas de E2 desplaza a TFIID y al factor SP1 (Gloss y Bernard, 1991; Tan et al., 1994).

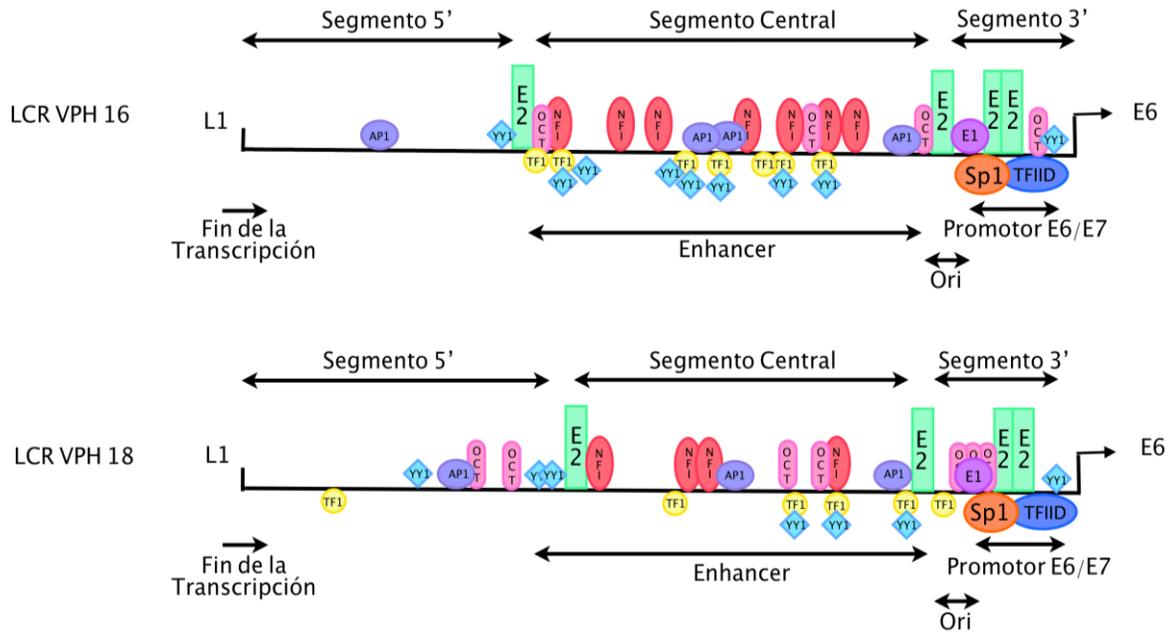


Figura 3. Region Larga de Control de los VPH16 y 18. Contiene cuatro sitios de unión para E2 que delimitan a la LCR, dos de estos sitios dividen a la LCR en segmentos diferencialmente funcionales, los cuales han sido llamados: 1) el segmento 5', 2) el segmento central y 3) el segmento 3'. El segmento 5' contiene la señal de terminación de la transcripción, el segmento central contiene la mayoría de los sitios de unión de los factores de transcripción y el segmento 3' contiene el origen de replicación y el promotor E6/E7. Algunos de los sitios de unión para los factores de transcripción de la LCR se encuentran presentes en todos los VPH, sin embargo los diferentes VPH tienen variaciones en los sitios de unión para los factores de transcripción los cuales podrían provocar patrones diferenciales de expresión (Modificado de Garcia-Vallve et al., 2006 y O'Connor et al., 1995)

2.3.3. Factores de Transcripción

Solamente de un número limitado de tipos de VPH se han estudiado las LCR de manera experimental. En dichos estudios se ha determinado la participación de factores de transcripción en la actividad biológica de los respectivos tipos virales. Se han descrito sitios consenso de unión a factores transcripcionales presentes en cada LCR.

NFI

El factor nuclear I fue originalmente identificado por el papel que juega en la replicación del genoma del adenovirus en el cual se une a la secuencia TTGGC (N)₆ CCAA (deVries et al., 1985; Nagata et al., 1983). En el genoma del VPH, al parecer todos los sitios de NFI están constituidos por la secuencia no palindrómica de baja afinidad TTGGC, aun así la proteína de NFI se une como un dímero el cual se forma en solución (Mermod et al., 1985). Debido a que NFI es una familia de factores de transcripción, hay una gran cantidad de genes que dan el aumento de proteínas con los mismos dominios de dimerización y de unión al ADN, pero que difieren en los dominios de activación y sus propiedades biológicas. Además debido a que cada gen produce un número diferencial de productos por procesamiento alternativo o “splicing” se da un arreglo de posibles dímeros los cuales puedan unirse al motivo TTGGC (Apt et al., 1994; Butz y Hoppe-Seyler, 1994). Todavía no es claro porque solo debieran de existir sitios no palindrómicos de NFI en los potenciadores de VPH. Sin embargo, debido a la agrupación de estos sitios en el segmento central de la LCR, es muy posible especular que NFI pueda jugar un papel arquitectónico en el potenciador del VPH así como ha sido propuesto para ciertos factores en la determinación de la estereoespecificidad de otros potenciadores (Tjian y Maniatis, 1994).

AP-1

AP-1 se une como un heterodímero formado por proteínas derivadas de los genes de la familia de jun, fos y ATF y reconoce los motivos de ADN relacionados con la secuencia TGANTCA, donde N puede ser cualquier base y sirve como un blanco río abajo de mecanismos de señalización intracelular (Vogt y Bos, 1990). Los sitios AP-1 presentes en el potenciador del VPH modulan la expresión génica del virus en respuesta a los factores de crecimiento tales como EGF, KRF y los factores de crecimiento tumorales mediante la vía de la proteincinasa C (Chan et al., 1990). También se ha propuesto que API puede contribuir a la activación epitelio específica debido a que los genes que generan sus sub unidades son expresadas de manera diferencial (Thierry et al, 1992). Los estudios muestran que todas las LCR de los VPH contienen por lo menos un sitio para API, teniendo la mayoría de

3 a 4 sitios. De estos, usualmente todos, o todos menos uno, quedan dentro del segmento central de la LCR en el potenciador epitelio específico. Más allá, estos sitios parecen conservarse dependiendo de su posición, en todos los virus de mucosa genital teniendo 1 ó 2 sitios API en la porción central del potenciador, y 1 ó 2 en la parte final 3' del potenciador (Turek, 1994) .

Oct-1

La proteína Oct-1 regula un gran número de genes virales y celulares, y es un miembro de la familia de los factores POU. Todos los factores POU tienen un gran dominio bipartito homólogo de unión al ADN. En el dominio POU, un subdominio POU_S N-terminal reconoce el final 5' de la secuencia de reconocimiento, ATGCAAAT para Oct-1 (Verrijzer et al., 1991), y este es separado por un enlazador, el cual varía de tamaño y secuencia en diferentes factores POU, del subdominio el cual reconoce el final 3' de la secuencia de reconocimiento (Faus et al., 1994). Incluso versiones poco degeneradas del motivo octamérico pueden ser reconocidas por Oct-1 (O'Connor y Bernard, 1995). Sin embargo, para los sitios degenerados, las tres bases de acompañamiento juegan un papel en la determinación de la afinidad de la unión (Baumruker et al., 1988).

Observaciones iniciales en las cuales la sobre expresión de Oct-1 dieron como resultado una regulación negativa de la actividad del promotor del VPH el cual no requirió de la unión del factor Oct-1 en este. Esto sugiere que la represión se pudo haber dado como resultado de un “aplastamiento” de co-factores necesarios para la estimulación del promotor (Gill y Ptashne, 1988; Martin et al., 1990) el cual fue ocasionado por los niveles no fisiológicos elevados de Oct-1 provocados durante el experimento. Estudios más recientes muestran que a niveles fisiológicos presentes en las células epiteliales, Oct-1 activa al potenciador del VPH mediante la unión a un elemento regulador compuesto conservado que está en el final 3' del potenciador (O'Connor y Bernard, 1995). Este elemento compuesto está constituido por un motivo octamérico separado por 2pb de un motivo TTGGC, y Oct-1 parece no activar al potenciador directamente, sino que lo hace mediante la estabilización de la unión de NFI al elemento compuesto, el cual en respuesta genera altos niveles en la actividad del potenciador (Sibbet y Campo, 1990).

YYI

La proteína YYI fue nombrada en un inicio como “ying y yang 1” debido a su habilidad tanto para reprimir o activar al promotor P5 de los virus adeno-asociados (Shi et al., 1991). La unión de YYI río arriba del promotor P5 provoca una regulación negativa, sin embargo esta represión se traduce en una activación sobre la interacción de la unión de la proteína E1A con YY1 (Lewis et al., 1995; Shi et al., 1991). Mientras que el mecanismo exacto que se encuentra detrás de la habilidad de YY1 para reprimir la expresión del gen P5 no es conocido, se han hecho varios reportes que muestran que YYI tiene la capacidad de interactuar directamente con reguladores transcripcionales (Shrivastava et al., 1993; Seto et al., 1993; Lewis et al., 1995) y en algunos casos se ha visto que desplaza a activadores transcripcionales o dobla al DNA. Se cree que estas características pueden jugar un papel en la represión de la actividad del promotor. Por otra lado se ha visto que al cotransfectar YYI se activa el promotor de c-myc (Wang et al., 1993) y existe bastante evidencia que muestra que YYI puede actuar como un factor iniciador de la transcripción.

Podría ser que YYI juegue un papel en la regulación negativa de la expresión génica de numerosos virus asociados a infecciones persistentes incluyendo a AAV, adenovirus (Shi et al., 1991) y EBV (Montalvo et al., 1991). Por lo tanto es posible que YYI pueda funcionar como regulador para mantener niveles bajos de la transcripción del VPH lo cual permite que se generen infecciones a largo plazo, mientras que los cambios en el ambiente transcripcional, o mutaciones en los sitios de YYI (May et al., 1994; Dong et al., 1994) puedan dar como resultado un aumento en la expresión de los genes del VPH.

TEF-1 y TEF-2

Los factores potenciadores de la transcripción TEF-1 y TEF-2 fueron originalmente identificados como factores de unión al potenciador de SV40 (Davidson et al., 1988; Fromental et al., 1988) y TEF-2 también fue identificado como un factor el cual se unía a la caja CAC del promotor de la β -globina humana (deBoer et al., 1988). Se ha visto que TEF-1 contribuye a la actividad del potenciador del VPH-16

(Ishiji et al., 1992) y la proteína purificada puede unirse, in vitro, a muchos sitios en el potenciador de este. Sin embargo, todavía no está claro en que sitios se une TEF-1 en un contexto de extractos nucleares en donde otros factores de transcripción pueden competir por los sitios de unión.

Esto es de gran importancia debido a la similitud que existe en las secuencias de reconocimiento entre TEF-1, TEF-2 y YY1 (Chong et al., 1990). Resultados obtenidos en análisis computacionales muestran que mientras los potenciales motivos de TEF-1 no están presentes en todos los VPH, la mayoría posee un número de sitios que va de los 2 a los 8. Sin embargo, muchos de estos sitios, también son capaces de unir a YY1 dando como consecuencia que el número de sitios que actualmente se unen TEF-1 sean menores (Chong et al., 1990).

2.3.4. Oncoproteínas E6 y E7 y la transformación celular

La oncoproteína E7 tiene una longitud de 100 aminoácidos (Münger y Howley, 2002). Se ha demostrado que esta oncoproteína se une a la proteína del retinoblastoma (pRb) e inactiva su función evitando la unión de pRb con el factor de transcripción E2F. (Dyson et al., 1989). La proteína pRb se encuentra activa en su forma hipofosforilada y se une al factor de transcripción E2F para impedir el inicio de la fase S del ciclo de vida. Durante el ciclo de vida normal, pRb es fosforilado por los complejos de ciclina D1/CDK4 y E/CDK2 provocando la disociación de pRb y E2F permitiendo una progresión a la fase S del ciclo de vida. (Münger y Howley, 2002; Jo y Kim, 2005). E7 se une a la forma hipofosforilada de pRb evitando su unión a E2F. Por lo tanto en las células en las que se sobre expresa la proteína E7 el punto de monitoreo en la transición de las fases G1/S se pierde y las células continúan en el ciclo celular provocando una proliferación celular no controlada. (Dyson, 1998; Jo y Kim, 2005). También se ha demostrado que E7 provoca la degradación de pRb a través de la vía mediada por la ubiquitinación proteosómica. (Boyer et al., 1996). La unión de E7 a pRb se da mediante la presentación del motivo LXCXE a E7. (Liu et al., 2006). Además de su interacción con proteínas de la familia de pRb, E7 también interactúa con otra

variedad de proteínas celulares. Una de estas proteínas son las histonas desacetilasas (HDACs), las cuales funcionan como co-represores transcripcionales; la unión de E7 a las HDACs mediante la vía de Mi2 permite la transcripción dependiente de E2F la cual promueve la proliferación celular. (Brehm et al., 1999; Longworth y Laimins, 2004) Otras proteínas blanco de E7 son los complejos CDK2/ciclinaA y CDK2/ ciclinaE los cuales son activados provocando la fosforilación de pRb induciendo la transcripción de los genes de la fase S (Arroyo et al., 1993; McIntyre et al., 1996). También se ha encontrado que E7 se une a los inhibidores de CDK (CKIs) p27 y p21, los cuales evitan el punto de monitoreo de la interfase G1/S del ciclo celular provocando la progresión del ciclo celular (Zerfass-Thome et al., 1996; Funk et al., 1997)

La oncoproteína E6 tiene un tamaño de 160 aminoácidos (Münger y Howley, 2002). Y en el caso de los VPH de alto riesgo es suficiente para la inducción y el mantenimiento de la transformación celular. Se ha reportado que se une a p53 causando la degradación del proteosoma de p53 por el proteosoma 26S (Li y Coffino, 1996). De modo interesante los niveles de p53 en células normales son muy bajos; durante la sobre expresión de la proteína E7 los niveles de p53 se elevan debido a la inhibición del factor MDM2 involucrado en la degradación vía proteosoma de p53 en células normales (Eichten et al., 2002). La degradación de p53 ocurre mediante un complejo trimérico que contiene a E6, la proteína asociada a E6 (E6AP) y p53. (Zanier et al., 2005). E6AP actúa como una ubiquitin ligasa E3 que ubiquitina a p53 y lo marca para su posterior degradación por el proteosoma. También E6 es capaz de inactivar a p73, el cual es un homólogo de la proteína p53 (Park et al., 2001). Además E6 de los VPH de alto riesgo también pueden bajar la actividad de p53 al marcar a la proteína de unión CREB (CBP) y a p300 (Zimmermann et al., 1999), co-activadores de éste. Sin embargo en reportes recientes se ha mostrado que E6 de los VPH de alto riesgo pueden degradar a p53 incluso en ausencia de E6AP. La inactivación de p53 compromete a la integridad del ADN provocando el daño de este y la inestabilidad cromosómica promoviendo la proliferación celular y dando como resultado el desarrollo del tumor (Schaeffer et al., 2004). Por su parte E6 de los VPH de bajo riesgo puede unirse a p53 pero con una afinidad muy baja y no degrada a p53. En células que

expresan a E6 del VPH-11 se da una acumulación de p53 después del daño al ADN en células que están arrestadas en la fase G1 del ciclo celular. También se ha demostrado que E6 de bajo riesgo no se une a E6AP para formar el complejo trimérico de E6/E6AP/p53 como se da en el caso de E6 de alto riesgo (Zanier et al., 2005). Se ha reportado que E6 del VPH-16 inhibe la apoptosis mediante un mecanismo independiente a p53 el cual involucra la inhibición de la expresión del gen Bax y la degradación de la proteína Bax en keratinocitos humanos (Magal et al., 2005). La inhibición de la proteína proapoptótica Bax provoca la inhibición de la apoptosis y por lo tanto las células acumulan mutaciones en su ADN. Por otra parte puede inhibir la apoptosis mediante la unión al receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR1) evitando la señalización de TNFR1 (Filippova et al., 2002). Esta proteína también es capaz de inmortalizar a las células evitando que se de el acortamiento de los telómeros mediante el aumento de la expresión de la subunidad catalítica de la reverso transcriptasa de la telomerasa humana (hTERT) formando un complejo con E6AP y uniéndose directamente al promotor de hTERT (Gewin et al., 2004; Seo et al., 2004)

2.4. CICLO DE VIDA DEL VPH

El ciclo de vida del VPH se encuentra estrechamente relacionado a la biología celular del huésped (Fig. 4). Inicia cuando las células epiteliales escamosas normales crecen hacia un epitelio estratificado a partir de la capa basal dividiéndose como células no diferenciadas o células amplificadoras transitorias (Watt, 1998). Después de la división, una de las células hija migra hacia arriba e inicia el proceso de diferenciación terminal, mientras que las otras células permanecen en la capa basal como renovadoras de la población presentando un ciclo celular lento. Los viriones de VPH de manera inicial infectan la capa basal del epitelio, probablemente a través de microlesiones, iniciando una interacción celular con receptores transmembranales como la α -6 integrina para el VPH16 (Yoon et al., 2001).

En las células infectadas en la capa basal la síntesis viral se da a un nivel bajo generando aproximadamente de 50-100 copias episomales por célula. Los genes tempranos E1 y E2 mantienen la replicación del DNA viral y su segregación permitiendo de esta manera que las células troncales puedan mantenerse en la lesión por un largo periodo (Munger et al., 2004). Conforme las células infectadas migran hacia las capas superiores del epitelio, los productos de los genes virales tardíos son producidos para iniciar la fase vegetativa del ciclo viral del VPH, dando como resultado niveles elevados en la amplificación del genoma viral (zur Hausen, 2002). Debido a que la replicación del ADN viral depende casi por completo de los factores de replicación presentes en el huésped exceptuando a la helicasa viral E1, otros genes tempranos E5, E6 y E7 están considerados como los encargados de coordinar un ambiente celular adecuado en el huésped para la replicación del ADN, que en ocasiones induce la síntesis del ADN celular del huésped y previene la apoptosis. En las capas externas del epitelio, el ADN viral es empaquetado dentro de las cápsides y una progenie de viriones es liberada para dar lugar a una nueva infección (zur Hausen, 2002). Debido a la baja inmunogenicidad de los viriones sintetizados en las capas superiores del epitelio escamoso estratificado estos pasan por una menor vigilancia por parte de las células del sistema inmune. Además E6 y E7 inactivan al factor regulador del interferón (IRF) para que los virus del VPH puedan permanecer como una infección asintomática persistente (Ronco et al., 1998; Um et al., 2002).

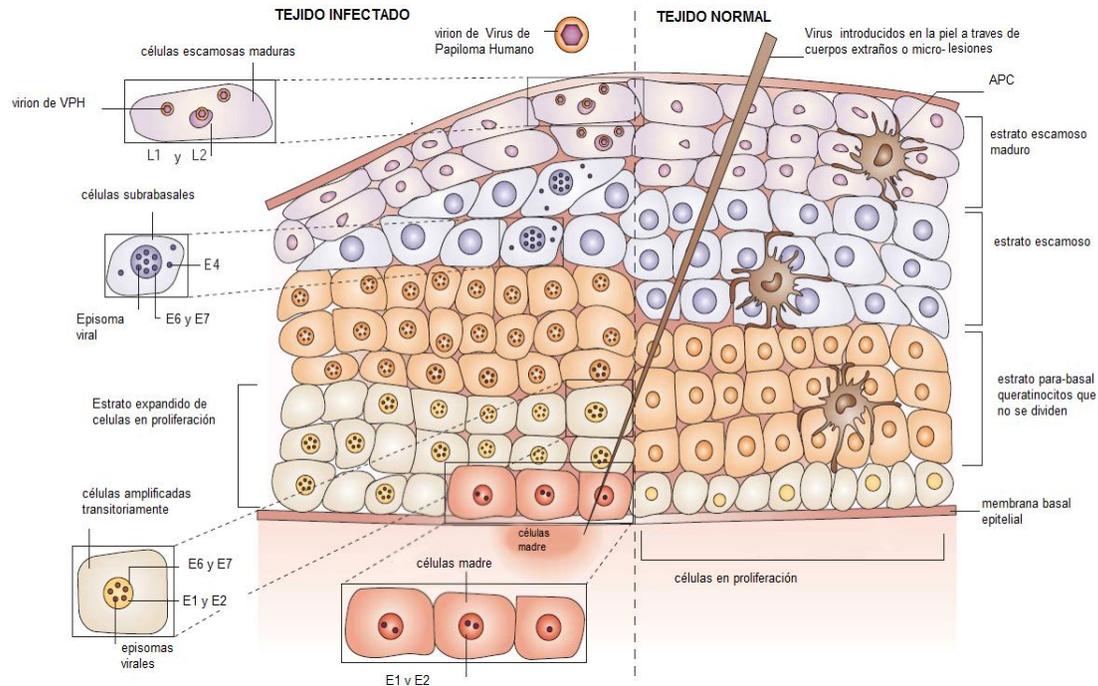


Figura 4. Identificación de las etapas principales del ciclo de vida del papilomavirus en el epitelio escamoso. Arquitectura celular del epitelio cervical estratificado escamoso y la expresión de proteínas del virus del papiloma humano. Las células hijas del epitelio de células madre se dividen a lo largo de la base de la membrana y maduran verticalmente a través del epitelio sin divisiones posteriores. Después de la introducción del VPH en las células madre en la capa basal de epitelio aparentemente debido a laceraciones del epitelio se da la expresión de las proteínas no estructurales del virus. Bajo la regulación de estas proteínas, la población celular en división se expande de manera vertical y la diferenciación celular del epitelio se retarda y no se completa. Las proteínas virales son expresadas de manera secuencial con la diferenciación como se muestra, y los viriones maduros son generados solamente en la capa más superficial del epitelio (Modificado de Frazer, 2004).

2.5. TRANSFORMACIÓN INDUCIDA POR VPH

Los cánceres cervicales se originan del revestimiento del cérvix que es la parte baja del útero. La unión escamocolumnar del epitelio escamoso estratificado no queratinizado del exocérnix con el epitelio columnar del endocérnix es un área altamente susceptible a la infección por VPH y es el sitio en el cual más del 90% de las neoplasias se desarrollan en el tracto genital inferior. La infección con VPH

de alto riesgo está asociada a la displasia cervical o a la neoplasia intraepitelial cervical (NIC), y se cree que los cánceres cervicales se desarrollan a partir de estas lesiones después de una infección persistente (zur Hausen, 2009b; Munger et al., 2004). Las lesiones de NIC-1 (displasia leve) y NIC-2 (displasia moderada) muestran relativamente niveles bajos de expresión de E6 y E7 en las cuales los genomas virales se replican de manera episomal, mientras que en las lesiones de NIC-3 (displasia severa, carcinoma in situ) y cáncer invasor se observan altos niveles de expresión de E6 y E7, y en la mayoría de los casos la integración del ADN viral en el genoma celular del huésped a través del cual se cree que se desarrollan las neoplasias (von Knebel, 2002).

A pesar de que las infecciones por VPH son comunes y el riesgo a adquirir la infección a lo largo de la vida es de aproximadamente un 80% en mujeres en etapa reproductiva, en la mayoría de los casos ésta se resuelve de manera espontánea gracias a una respuesta inmune efectiva (Narisawa-Saito y Kiyono, 2007). Sin embargo, datos obtenidos de estudios experimentales y epidemiológicos indican que la presencia del virus no es suficiente para provocar un cáncer cervical sino que se requieren de eventos genéticos y epigenéticos adicionales para alterar los factores celulares (zur Hausen, 2002). Eventos como la sobre expresión de PIK3CA, c-myc, ErbB2 y c-IAP1, mutaciones en ras y una disminución en la expresión de PTEN y TSLC1 han sido reportados en cáncer cervical (Steenbergen et al., 2004; Bertelsen et al., 2006; Zhang et al., 2002; Imoto et al., 2002; Minaguchi et al., 2004).

2.6. COINFECCIONES: IMPLICACIONES EN CaCu

Hoy en día los estudios de detección de VPH muestran que más del 10% de estas lesiones clínicas contienen por lo menos dos diferentes tipos de VPH (Bachtiary et al., 2002; Brown et al., 1999; Kalantari et al., 1997; Silins and Dillner, 2000; Thompson et al., 1997), lo que ha sido llamado “infecciones múltiples de VPH” o “coinfecciones de VPH”. Inclusive, se ha reportado que la incidencia de infecciones múltiples por VPH en cáncer cervical asciende hasta un 85% (Fife et al., 2001). Sin embargo, no se sabe si múltiples tipos de VPH pueden existir en la

misma célula e interactuar unos con otros o si solamente están presentes en el mismo tejido. Por lo tanto es importante señalar que la presencia de más de un tipo de VPH en la misma célula puede tener varias implicaciones, incluyendo la posibilidad de la recombinación y el trans-empaquetamiento de estos. Aunado a esto, no es claro si la infección con múltiples tipos de VPH pueda funcionar como un marcador para predecir el estado y la severidad de la enfermedad.

Estudios realizados para conocer el efecto de infecciones múltiples de VPH en muestras de condiloma acuminado, muestran que muchas de estas contienen múltiples tipos de VPH (Brown et al., 1994, 1999). Además, un gran porcentaje de condilomas presentes en pacientes inmunosuprimidos tienen varios tipos de VPH en comparación con aquellos pacientes saludables, sugiriendo que los tipos de VPH adicionales pueden ser mantenidos en bajo número de copias pero comenzarán a replicarse si ocurre una inmunosupresión en los pacientes (Brown et al., 1994). Por otro lado Evans et al. (1992) reportó que existía una disminución en el riesgo de desarrollar lesiones escamosas intraepiteliales en mujeres con un historial de verrugas anogenitales, sugiriendo que la adquisición de un VPH de bajo riesgo protegía a la paciente de adquirir un segundo tipo de VPH de alto riesgo. También se reportó una interacción antagonista entre el VPH16 y VPH6/11 en dos estudios prospectivos en cáncer cervical invasivo (Luostarinen et al., 1999; Silins et al., 1999). Estos estudios sugieren que las infecciones con VPH de bajo riesgo muestran un efecto de protección contra las neoplasias cervicales ya sea mediante la prevención de una segunda infección con un VPH de alto riesgo o debido a una interferencia con el segundo VPH de alto riesgo. En contraste, un estudio ha reportado que mujeres que presentan un condiloma con infección múltiple tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer cervical (Chuang et al., 1984); sin embargo, otro estudio reportó que mujeres con verrugas genitales no exhiben un mayor riesgo de desarrollar cáncer cervical (Sigurgeirsson et al., 1991).

3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones con múltiples tipos de VPH suelen encontrarse tanto en lesiones pre-malignas del cérvix como en cáncer invasor. No se sabe si estas infecciones múltiples se encuentran dentro de la misma célula, en donde los virus pudieran interactuar entre sí, o si solamente se encuentran presentes en el mismo tejido. De igual forma no es claro cuáles son las implicaciones clínicas de contraer estas infecciones múltiples.

Este trabajo se realiza con el fin de tratar de entender el papel que las infecciones múltiples por VPH juegan en el desarrollo del CaCu y en su propio ciclo viral, por lo que resulta importante debido a que podría sugerir si es posible que dos tipos de VPH lleven a cabo algún tipo de interacción.

4. HIPÓTESIS

La presencia simultánea de dos Regiones Largas de Control (LCR) de distintos tipos de VPH en un mismo cultivo celular modifica la actividad transcripcional de alguna de ellas.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto sobre la actividad transcripcional de la LCR de un tipo específico de VPH cuando se introduce de manera simultánea otro vector reportero con la LCR de un diferente tipo de VPH en un mismo cultivo celular.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Construcción de los vectores reporteros pGL4.11[luc2P] y pGL4.71[hRlucP] que contengan la LCR de los diferentes tipos virales. Los tipos virales a estudiar son VPH 16, VPH 18 y VPH 58, dado que son aquellos tipos de alto riesgo oncogénico que en CaCU y en NICs se encuentran con mayor frecuencia en coinfecciones.

- ❖ Transfección transitoria de las líneas celulares HaCaT y C33 con las construcciones mencionadas anteriormente para poder analizar la actividad transcripcional de las distintas LCR mediante la expresión y la cuantificación de las proteínas de los genes reporteros.

- ❖ Cotransfección de las mismas líneas celulares con dos de los vectores construidos para evaluar si la actividad transcripcional de alguno de los tipos de VPH se ve alterada por la presencia del otro.

7. MATERIALES Y METODOS

7. 1. Oligonucleótidos específicos

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de las distintas LCR a los cuales se les agregaron los sitios para las enzimas de restricción Kpn1 con dirección 3' y SacI con dirección 5'(Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias de primers específicos

VPH16	SacI: GGG GAG CTC CAG ACC TAG ATC AGT TTC CT	29pb
	Kpn1: GGG GGT ACC GGT CCT GAA ACA TTG CAG TTC	30pb
VPH18	SacI: GGG GAG CTC GTG CCA GGA AGT AAT ATG TG	29pb
	Kpn1: GGG GGT ACC CAT AGT ATT GTG GTG TGT TTC	30pb
VPH58	SacI: GGG GAG CTC CAT CCA CCA AAC GCA AAA AG	29pb
	Kpn1: GGG GGT ACC GAA CAT AGT CCT GCA GTA GC	29pb

7. 2. Plásmidos

- ❖ Las LCR de los VPH16 y VPH18 fueron clonadas en el vector reportero pGL4.11[luc2P] (Promega, Part# 9PIE666) el cual codifica el gen reportero luc2P (*Photinus pyralis*) (Figura 5b).
- ❖ Las LCR de los VPH 18 y VPH58 fueron clonadas en el vector reportero pGL4.71[hRlucP] (Promega, Part# 9PIE689) el cual codifica el gen reportero de luciferasa hRlucP (*Renilla reniformis*) (Figura 5a).
- ❖ El pRL-CMV Vector (Promega, #E2261) fue utilizado como control positivo para verificar que la proteína renilla no interfiere en la actividad de los vectores contruidos con las LCR en las transfecciones.

- ❖ El pGL-3 Control Vector (Promega, #E1741) fue utilizado como control positivo para los ensayos de transfección.

- ❖ Para poder verificar la eficiencia de transfección se utilizó GFP el cual es un vector de expresión de la proteína verde fluorescente.

- ❖ El vector pCDNA fue utilizado para completar las cantidades de ADN que fueron elegidas para que de esta manera el total de ADN utilizado para las transfecciones sea de 600ng quedando la misma cantidad tanto en las transfecciones como en las cotransfecciones. El pCDNA fue transfectado de manera individual para verificar que la secuencia génica de éste no repercute en los resultados obtenidos.

7. 3. Bacterias

La cepa bacteriana que fue utilizada para la construcción de los vectores fue la de *Escherichia coli* DH5 α la cual presenta una mutación en el gen recA1 provocando una reducción en la recombinación homóloga para la obtención de un inserto más estable y una mutación en el gen endA1 que inactiva las nucleasas intracelulares que degradan los plásmidos en diferentes métodos de purificación.

7. 4. Líneas Celulares

- ❖ HaCaT
Es una línea celular proveniente de queratinocitos humanos, espontáneamente inmortalizados in vitro, que no contiene secuencias genómicas de VPH.

- ❖ C-33 A
Es una línea celular transformada de origen epitelial, proveniente de una biopsia de cáncer cérvico uterino, sin secuencias de VPH.

7. 5. Construcción de vectores

7. 5. 1. Amplificación de las LCR mediante PCR

Para la amplificación de las LCR se utilizaron muestras de ADN provenientes de biopsias de cérvix positivas a secuencias de VPH. Los tipos de VPH contenidos en estas muestras fueron 16, 18 y 58.

Se obtuvieron tres productos de PCR de diferentes tamaños. Incluyendo los sitios de restricción que fueron añadidos se obtuvieron 3 regiones: (1) VPH16 de 821 pb que va de la posición 116 a la posición 7026; (2) VPH18 de 813 pb que va de la posición 107 a la posición 7122; (3) VPH58 de 817 pb que va de la posición 7109 a la posición 115. Se utilizaron controles positivos y negativos para la amplificación de cada LCR (Tabla 1):

Tabla 2. Controles negativos y positivos del PCR

	Control Positivo	Control Negativo
LCR VPH 16	SiHa: línea celular positiva para VPH 16	Mezcla PCR sin DNA
LCR VPH 18	HeLa: línea celular positiva para VPH 18	Mezcla PCR sin DNA
LCR VPH 58	Otra muestra de DNA previamente tipificada para VPH 58	Mezcla PCR sin DNA

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa preparado a una concentración del 1% con bromuro de etidio. Posteriormente se purificaron los productos con el kit PCR Centrifugal Filter Devices (Montage®, P36461). Las tablas 2 y 3 muestran las condiciones en que las reacciones de amplificación fueron realizadas.

Tabla 3. Reacción de PCR para amplificación de LCR

Reactivos	Volúmen
10x Buffer	2µl
MgCl ₂ (25 mM)	2µl
dNTPs (2mM)	2µl
Primer LCR 5' (50pm)	0.2µl
Primer LCR 3' (50pm)	0.2µl
Taq Gold	0.13µl
DNA de VPH16 (50ng/µl)	200 ng
H ₂ O	c.b.p
20µl volumen total	

Tabla 4. Condiciones de temperatura y tiempo para ciclo de PCR

	Temperatura Ciclos	Temperatura Ciclos	Temperatura Ciclos
	1 1	3 30	2 1
Temperatura	94°C	94°C 60°C 72°C	72°C 4°C
Tiempo	10:00	0:45 0:45 1:00	10:00 ∞

7. 5. 2. Digestión y ligación de vectores reporteros

Para llevar a cabo la digestión de los productos de PCR de las diferentes LCR y de los vectores reporteros se utilizaron las enzimas FastDigest® SacI (Fermentas, #FD1134) y FastDigest® KpnI (Fermentas, #FD0524). Se realizaron digestiones sencillas y dobles digestiones para verificar que ambas enzimas estuvieran realizando los cortes de manera eficiente. Dado que ambas enzimas utilizan el

mismo buffer en las reacciones preparadas para las dobles digestiones se agregaron las dos enzimas al mismo tiempo. Para las reacciones tanto de dobles digestiones como de digestiones sencillas se dejaron incubar de 1-2 horas a una temperatura de 37° C.

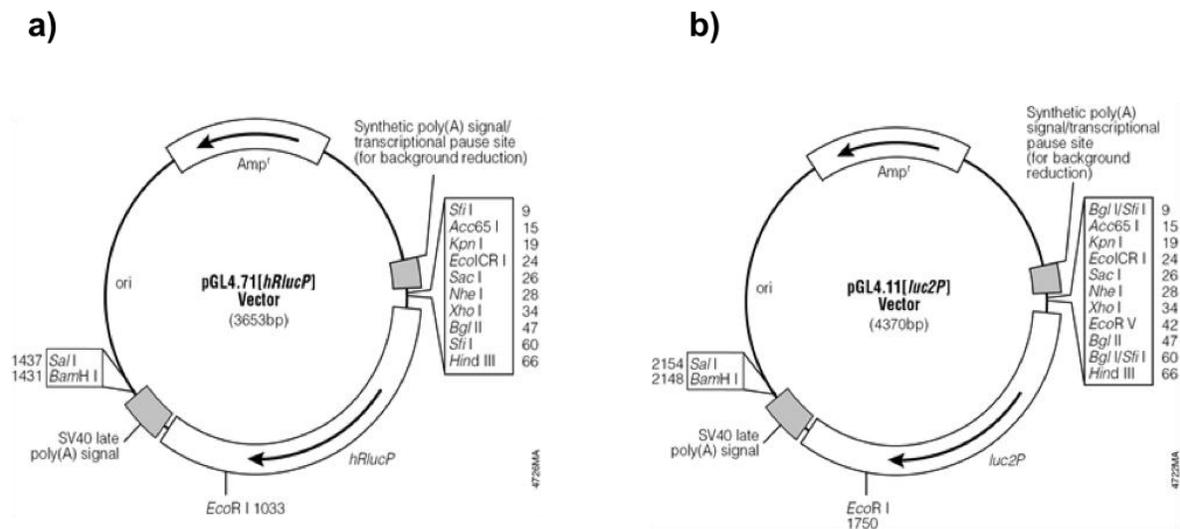


Figura 5. Vectores con los genes reporteros. a) pGL4.11[luc2P] con el gen de luciferasa y b) pGL4.71[hRlucP]) con el gen de renilla los cuales fueron clonados con las distintas LCR.

Tabla 5. Reacciones de digestión

Reactivos	Volumen Digestión Sencilla Sacl	Volumen Digestión Sencilla Kpn1	Volumen Doble Digestión
Plásmido / LCR	1µl	1µl	1µl
<i>FastDigest®</i> Sacl	1µl		1µl
<i>FastDigest®</i> Kpn1		1µl	1µl
10X <i>FastDigest®</i> Buffer	2µl	2µl	2µl
H ₂ O	c.b.p.	c.b.p.	c.b.p.
	20µl	20µl	20µl

Posteriormente se analizaron los productos generados mediante la doble digestión en un gel de agarosa con bromuro de etidio al 0.8%. Nuevamente se purificaron los productos con el kit PCR Centrifugal Filter Devices (Montage®, P36461) para poder continuar con la ligación. Una vez purificados los productos se llevó a cabo la ligación del vector con su respectivo inserto utilizando la ligasa T4 DNA Ligase (Fermentas, #EL0016) agregando a la reacción un ADN total de 2 µg, 1 µg de inserto y 1 µg de plásmido (Tabla 6). Posteriormente se dejó incubar la reacción por 45 minutos a 22°C en el termociclador.

Tabla 6. Reacción de Ligación

Reactivos	Volúmen Ligación LCR/PGL4
Plásmido con doble digestión	1µg
LCR con doble digestión	1µg
<i>T4 DNA Ligase</i>	1µl
<i>5x Rapid Ligation Buffer</i>	4µl
H ₂ O	c.b.p.
	20µl

7.6. Transformación bacteriana de células competentes con los productos de la ligación

Para poder seleccionar los vectores construidos con las LCR se llevo a cabo la transformación en las bacterias competentes *E. coli* DH5 α las cuales fueron tratadas para ser competentes mediante la técnica de Cloruro de Calcio.

❖ Células competentes: A partir de un vial con la cepa de *E. coli* DH5 α congelada se tomó una asada de la bacteria y se introdujo en un tubo de cultivo estéril con 5ml de medio dejándose incubar toda la noche a 250 rpm a una temperatura de 37°C. Después de la incubación se tomaron 500 μ l de las bacterias, se sembraron en un matraz con 50ml de medio LB sin ampicilina y se colocó en agitación constante por un periodo de 2.45 horas aproximadamente hasta alcanzar una densidad óptica de OD₆₀₀ de 0.4. Posteriormente se incubaron las bacterias por un lapso de 15 minutos en hielo, y se centrifugaron las células por un tiempo de 10 minutos a una velocidad de 2500 rpm y a una temperatura de 5°C. Se decantó cuidadosamente el sobrenadante y se resuspendió el botón en 25ml de CaCl₂ 100mM/ Tris 10mM a un pH de 7.5, frío y estéril dejándose reposar de 20-30 minutos. Nuevamente se centrifugaron las bacterias por 10 minutos a una velocidad de 2500 rpm y a una temperatura de 5°C para finalmente resuspender el botón en 3.3 ml de CaCl₂/Tris el cual se dejó en el cuarto frío toda la noche.

❖ Transformación: Se utilizaron 200 μ l de bacterias competentes previamente preparadas, que fueron colocadas en un tubo Eppendorf, a las cuales se les añadió 100 ng de plásmido, en el caso de los vectores construidos, y 40 ng para el plásmido sin inserto. Se dejó incubar en hielo por 30 min para después someterlo a choque térmico a una temperatura de 42°C por 2 minutos. Después se incubó en hielo por dos minutos y se agregaron 800 μ l de medio LB para aforar la mezcla a 1 ml. Una vez aforado se incubó por 45 minutos en agitación a una velocidad de 300 rpm. Se sacó de la incubación para tomar 100 μ l para plaqurear la forma diluida en cajas de petri con agar LB y ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml. Finalmente el resto del contenido se centrifugó ligeramente para remover el

sobrenadante y resuspenderlo con el medio restante el cual se plaqueó en las cajas de petri para obtener la forma concentrada. Se dejaron incubar durante toda la noche a 37°C.

7.7. Obtención de los vectores construidos

A partir de las cajas de petri diluidas y concentradas se seleccionaron las colonias que se identificaron como posibles portadoras del vector construido para ser inoculadas en cajas de petri con agar LB/ampicilina (100mg/ml) y en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100mg/ml) para incubarlas en agitación constante a una velocidad de 350rpm durante toda la noche. Se sacaron de incubación y mediante el PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, #K2100-10) se purificaron los plásmidos que quedaron resuspendidos en Buffer TE (10mM Tris-HCL, pH 8.0; 0.1 mM EDTA). Para verificar cuáles colonias eran las que presentaban el vector con el inserto, se llevó a cabo un PCR de colonias tomando la colonia seleccionada e introduciéndola en la mezcla de PCR (Tabla 7). Posteriormente el producto de PCR fue analizado mediante un corrimiento de gel de agarosa a una concentración del 1% con bromuro de etidio y TBE al 1x en la cámara de electroforesis.

Tabla 7. Reacción de PCR de colonias

Reactivos	Volúmen
10x Buffer	2µl
MgCl ₂ (25 mM)	2µl
dNTPs (2mM)	2µl
Primer LCR 5' (50µM)	0.2µl
Primer LCR 3' (50µM)	0.2µl
Taq Gold	0.13µl
Colonia seleccionada	-
H ₂ O	c.b.p
20µl volumen total	

También se llevó a cabo una doble digestión, de los plásmidos previamente purificados, con las enzimas Kpn1 y SacI (Tabla 8) la cual fue analizada en un gel de agarosa que se encontraba a una concentración del 0.8% y bromuro de etidio para poder ver el inserto liberado.

Tabla 8. Reacción de digestión para liberación inserto

Reactivos	Volumen Digestión Sencilla SacI	Volumen Digestión Sencilla Kpn1	Volumen Doble Digestión
Plásmido / LCR	1µl	1µl	1µl
<i>FastDigest</i> ® SacI	1µl		1µl
<i>FastDigest</i> ® Kpn1		1µl	1µl
10X <i>FastDigest</i> ® Buffer	2µl	2µl	2µl
H ₂ O	c.b.p.	c.b.p.	c.b.p.
20µl		20µl	20µl

7.8. Secuenciación de los vectores construidos

Para confirmar que los vectores construidos tuvieran la secuencia correcta de las LCR de los diferentes tipos de VPH se llevó a cabo la secuenciación de estos (Tabla 8 y 9). La reacción de secuenciación se llevó a cabo utilizando el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®) (Tabla 9 y 10).

Tabla 9. Reacción para secuenciación automatizada

Reactivos	Volúmen
Big Dye Terminator	0.5µl
dNTPs (2mM)	2µl
Primer LCR 5'/3' (10pm)	0.3µl
10X BDT Buffer	0.75µl
Plásmido purificado	500 ng
H ₂ O	c.b.p
10µl volumen total	

Tabla 10. Condiciones de temperatura y número de ciclos para la reacción de secuencia

	Temperatura Ciclos	Temperatura Ciclos	Temperatura Ciclos
	1 1	3 25	2 1
Temperatura	96°C	96°C 55°C 60°C	60°C 4°C
Tiempo	5:00	0:10 0:10 4:00	7:00 ∞

Posteriormente a 10 µl de la reacción se le añadieron 60 µl de isopropanol al 100% y 30 µl de H₂O, todo a temperatura ambiente. Se vortexó la muestra y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente protegiéndola de la luz. Se

centrifugó a 13000 rpm por 25 minutos y se eliminó el sobrenadante con pipeta. Después se lavó el pellet obtenido con 250 µl de EtOH al 70% y frío se vortexeó para centrifugarlo a 13000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Se quitó el sobrenadante con pipeta y se secó el pellet en el Speed Vac el cual se resuspendió en 20µl de Hi- Di formamida. Finalmente se desnaturalizó la muestra por un periodo de 5 minutos a una temperatura de 96°C para después colocarlo en hielo por 5 minutos. Terminado el proceso se pasó el contenido a una placa de lectura en las posiciones elegidas sin dejar burbujas para llevarla al aparato de secuencia.

Una vez que se verificó que la secuencia del inserto correspondía a la secuencia de las LCR se inocularon las colonias positivas para el plásmido en 250ml de medio LB/ ampicilina (100mg/ml) para una purificación de este a mayor escala mediante el PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit (Invitrogen™, #K210017).

7.9. Transfección en líneas celulares inmortalizadas

Para poder evaluar la actividad transcripcional de las diferentes LCR se utilizó la técnica de transfección celular mediante el uso de liposomas los cuales son vesículas que se pueden fusionar con la membrana debido a que están formadas por una bicapa de fosfolípidos. Esta técnica está basada en el uso de un lípido cargado positivamente para poder formar un agregado con el material genético el cual está cargado negativamente. Se utilizó como reactivo para la transfección la Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent debido a que presenta una alta eficiencia de transfección en diferentes tipos celulares además de que los complejos formados por la lipofectamina y el ADN pueden ser añadidos directamente al medio de cultivo sin importar la presencia o ausencia de suero.

Para llevar a cabo la transfección se sembraron 3×10^4 células en el caso de la línea celular HaCaT y 8×10^4 para la línea celular C33, en placas de cultivo de 24 pozos quedando en 500 µl de medio DMEM/F-12 Media (Gibco®) con suero bovino fetal añadido. Las células fueron incubadas por un periodo de 24 horas a

37°C y 5% de CO₂. Cumplidas las 24 horas se revisaron cada uno de los pozos para verificar que la confluencia fuera de un 80%-85%.

Posteriormente por cada caja de 24 pozos se tomaron 1.5 ml de medio Opti-MEM® Reduced Serum Medium sin rojo fenol (Gibco®) para mezclarlos con 30µl de lipofectamina y dejar incubar mientras se preparan las mezclas de transfección para los pozos. Debido a que cada ensayo de transfección se llevó a cabo por cuatuplicado se hicieron los cálculos para transfectar 5 pozos, así de esta manera se tenía un exceso para compensar cualquier pérdida de volumen. Como resultado se obtenía un volumen final de 250 µl por muestra de ADN teniendo un total de 600 ng de ADN. En el caso de las transfecciones se agregaron 300ng de ADN del vector problema y se rellenaba con pcDNA para tener de concentración final 600ng, y en el caso de las cotransfecciones se agregaban 300ng de ADN de cada vector problema, teniendo 600ng de concentración final. Una vez hecha la mezcla se tomaron 250 µl de la lipofectamina con el medio OPTI-MEM y se agregaron a cada uno de las muestras se mezcló suavemente con la micropipeta y se dejó incubar para que se formaran los complejos lipídicos con el ADN.

Una vez transcurridos los 30 minutos de incubación se resuspendió la mezcla de medio/lipofectamina/ ADN muy suavemente para adicionar 100 µl de esta a cada uno de los pozos correspondientes. Los 100 µl de la mezcla se agregaron en el centro del pozo y se hizo lentamente para que fuera en forma de goteo y evitar estresar a las células. Una vez añadido se movió la placa inclinándola hacia los lados para que de esta forma la mezcla se distribuyera de manera uniforme en todo el tapete celular. Después se dejó incubar por 5 horas para finalmente cambiar el medio sin lavar con PBS. A las 24 horas nuevamente se cambió el medio sin lavar con PBS. Finalmente a las 48 horas se quitó el medio, se lavó cuidadosamente cada uno de los pozos con PBS, se adicionaron 100µl de PBL (Buffer de lisis) 1x diluido en agua y se dejó incubar 15 minutos a temperatura ambiente para posteriormente almacenar a -70°C.

7.10. Ensayo de luciferasa

Para medir la actividad transcripcional de las LCR transfectadas se llevó a cabo el ensayo de luciferasa. Este ensayo se basa en la producción de las enzimas de

luciferasa y renilla por parte de los vectores las cuales al entrar en contacto con una mezcla de ATP, oxígeno y sustrato (luciferina para la luciferasa y celenteracina para la renilla) producen una descarboxilación oxidativa la cual produce CO₂, oxiluciferina (luciferasa) o celenteramida (renilla), AMP y luz. Si el sustrato es agregado en exceso, la cantidad de luz generada es proporcional a la cantidad de enzima. Por esta razón la reacción es muy útil para medir la actividad transcripcional de un promotor in vitro, pues de este depende la cantidad de enzima producida en una célula que porta dicho promotor.

Se utilizó el Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System (Promega #TM040) debido a que permite leer ensayos duales de reporteros ya que la luminiscencia generada por la reacción de la luciferasa se puede apagar mientras que de manera simultánea se activa la reacción de luminiscencia de renilla.

Para realizar las lecturas de las transfecciones se sacaron las cajas que estaban almacenadas a -70°C para que alcanzaran la temperatura ambiente. Una vez a temperatura ambiente se tomaron 30µl de lisado celular del pozo y se colocaron en un tubo de lectura. Para el caso de las transfecciones si la muestra contenía el vector con el gen de luciferasa se añadieron 30µl de sustrato LarII (luciferina) y si tenía el vector con el gen de renilla se agregó el sustrato Stop & Glo (colenteracina). Se agitó suavemente y se introdujo el tubo al lector del luminómetro para obtener los valores de la luminiscencia. Para las cotransfecciones primero se agregó LarII se agitó suavemente y se hizo la lectura de luciferasa en el luminómetro, posteriormente se sacó el tubo se agregó Stop & Glo nuevamente se agitó y se volvió a introducir al luminómetro para obtener la lectura de renilla.

8. RESULTADOS

8.1. Amplificación de las LCR de interés

Para poder evaluar la actividad transcripcional de las LCR16, 18 y 58, se eligieron dos vectores con genes reporteros cuyos productos generan actividades enzimáticas que pueden identificarse de manera diferencial: luciferasa (Luc) y renilla (Rluc). Las LCR fueron amplificadas por PCR a partir de ADN obtenido de tumores de cérvix con los tipos virales correspondientes y clonadas para generar los 4 vectores reporteros: 1) Luc18, 2) RLuc18, 3) Luc16 y 4) RLuc58.

En la figura 6 se muestran los productos de las LCR 18, 16 y 58 obtenidos de las amplificaciones por PCR. Para la LCR18 se amplificaron 9 muestras (Fig. 6A carriles 2-9) dado que los productos aparecían de menor intensidad y se requería contar con el suficiente producto de PCR para la construcción posterior de los vectores Luc18 y RLuc18. En la figura 6B se muestran los productos de las amplificaciones de la LCR del VPH16 (carriles 2 y 3). Por último, en la Fig. 6C se observan las amplificaciones de la LCR del VPH 58 (carriles 2-5). Los diferentes productos obtenidos tienen un peso de aproximadamente 800pb.

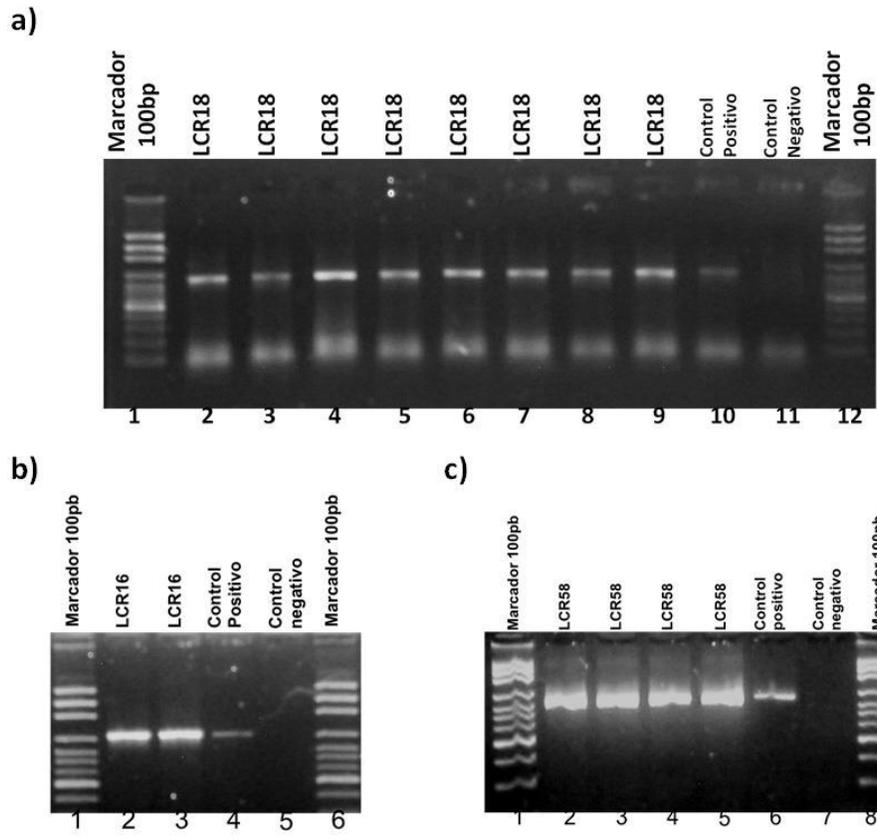


Figura 6. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación por PCR de las LCR 18, 16 y 58. a) LCR18: Los carriles 2-9 muestran los productos amplificados. El carril 10 tiene muestra de ADN de la línea celular HeLa y el carril 11 reacción sin ADN. Los carriles 1 y 12 tienen el marcador de 100pb; b) LCR16: Los carriles 2 y 3 muestran el producto amplificado. El carril 4 contiene ADN de la línea celular SiHa y el carril 5 contiene la reacción sin ADN . Los marcadores de peso molecular en los carriles 1 y 6. c) LCR58. En los carriles 2-5 se encuentran los productos amplificados, reacción con ADN de VPH 58 de otra muestra y reacción sin ADN en los carriles 6 y 7 respectivamente y a los extremos el marcador de peso molecular 100pb.

8.2. Digestión con enzimas de restricción y ligación de productos de PCR

Para llevar a cabo la construcción de los vectores recombinantes, se realizaron las digestiones de los plásmidos reporteros Luc y Rluc de los productos de PCR de las LCR, con las enzimas de restricción SacI y KpnI (Figura 7):

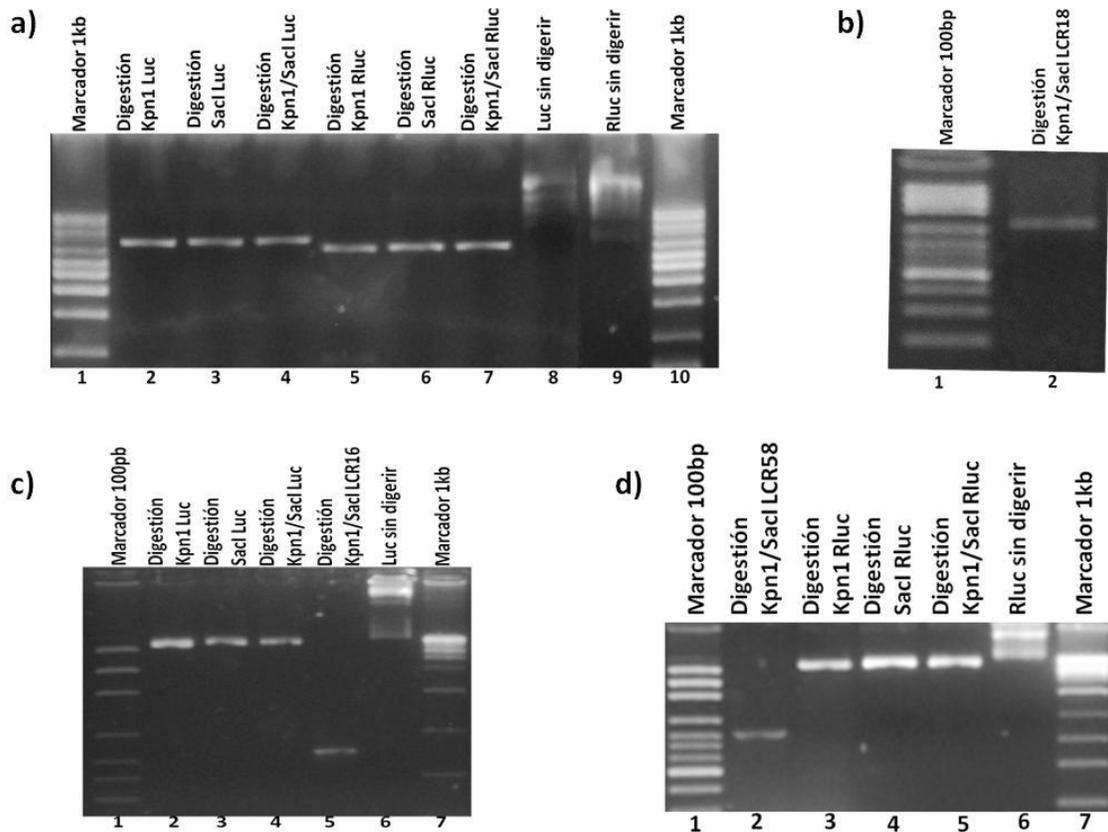


Figura 7. Electroforésis en geles de agarosa de las digestiones de los plásmidos para la construcción de vectores con Luc y Rluc. a) En los carriles 2 y 3 y 5 y 6 se muestran las digestiones sencillas de Luc y Rluc respectivamente. En el carril 4 y 7 se muestran las dobles digestiones de Luc y Rluc también respectivamente. En los carriles 8 y 9 están los plásmidos Luc y Rluc sin digerir y en los carriles de los extremos se encuentran los marcadores de 1kb. B) Digestión de la LCR del VPH18 en el carril 1 y marcador de 100bp en el carril 2. C) Digestión sencilla de Rluc en los carriles 2 y 3. Los carriles 4 y 5 muestran las dobles digestiones de Rluc y la LCR del VPH16 respectivamente y el carril 6 muestra el plásmido Rluc sin digerir. El carril 1 muestra el marcador de 100pb y el carril 7 el marcador de 1kb. D) Digestión sencilla de Rluc en los carriles 3 y 4. Las dobles digestiones de Rluc y la LCR del VPH58 se muestran en los carriles 5 y 2 respectivamente. En el carril 6 está Rluc sin digerir y los carriles 1 y 7 tienen los marcadores de 100pb y 1kb.

Para construir los vectores Luc18 y Rluc18 se realizaron las dobles digestiones de los plásmidos Luc (figura 7A carril 4), Rluc (figura 7A carril 7) y la LCR18 (figura 7B carril 2). En el caso de Luc las bandas se encuentran ligeramente por debajo de las bandas de Rluc debido al peso de estos, que es de 4370 para Luc y de 3653 para Rluc. Posteriormente para poder realizar la construcción del vector Rluc16 se hizo la doble digestión de Rluc (Figura 7C carril 4) y de la LCR del VPH16 (Figura 7C carril 4). Finalmente se llevó a cabo la doble digestión de Rluc (Figura 7D carril 5) y de la LCR del VPH58 (Figura 7D carril 2) para la construcción del vector Rluc58. En todos los casos para comprobar que las digestiones de los vectores reporteros se habían realizado de manera eficiente se hicieron digestiones sencillas para verificar que cada una de las enzimas de restricción utilizadas no estuviera digiriendo de manera parcial. Esto se comprueba ya que el corrimiento de las bandas, tanto de las digestiones sencillas como de las dobles digestiones, no presentan un barrido de fondo como se observa en los controles sin digerir, cuyo patrón muestra este barrido de fondo. Los marcadores de bases fueron utilizados en cada uno de los corrimientos para verificar que el peso de los vectores y las LCR corresponde con los pesos esperados.

Una vez realizadas las digestiones se llevó a cabo la ligación de los vectores con las diferentes LCR (Figura 8). Se ligó la LCR 18 con los vectores Luc y Rluc (Fig. 8a carriles 2 y 3), la LCR 16 con el vector Rluc (Fig. 8b carriles 2 y 3) y la LCR 58 con el vector Rluc (Fig 8c carriles 2-5). La correcta ligación de los vectores fue sugerida por que los patrones de corrimiento de todas las ligaciones fueron similares a las de los plásmidos sin digerir, a diferencia de los plásmidos digeridos que presentan una sola banda que indica la linearización del vector.

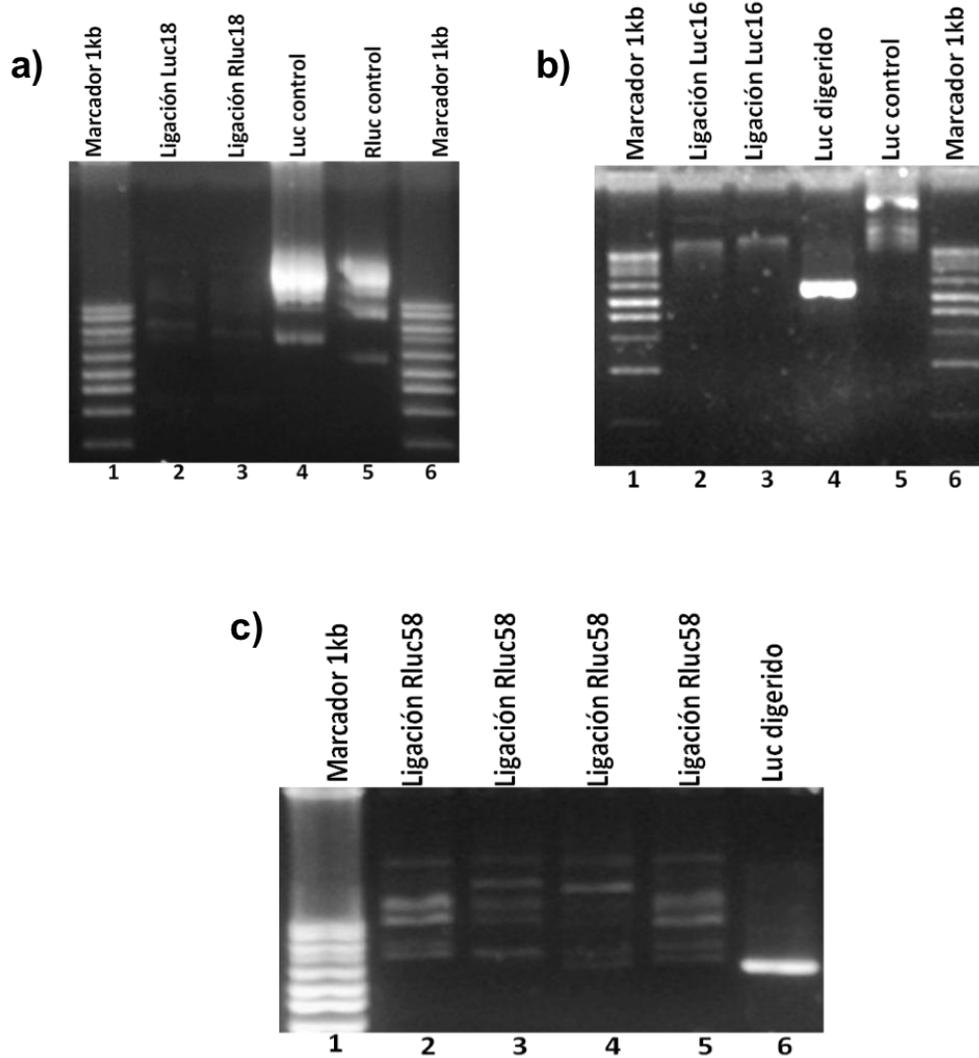


Figura 8. Ligación de los vectores reporteros con las distintas LCR. a) Vectores Luc y Rluc ligados con la LCR del VPH18 en los carriles 2 y 3 respectivamente. Los carriles 4 y 5 muestran los plásmidos Luc y Rluc sin digerir. El marcador de 1kb en los carriles de los extremos. b) Vector Rluc ligado con la LCR del VPH16 en los carriles 2 y 3. El carril 4 tiene el plásmido sin ligar y el carril 5 el plásmido sin digerir. Marcadores de 1kb en los carriles 1 y 6. c) Vector Rluc ligado con la LCR del VPH58 en los carriles del 2-5; plásmido Luc sin ligar en el carril 6 y marcador de 1kb en el carril 1.

8.3. Detección del inserto en los vectores construidos

Los vectores construidos fueron introducidos en bacterias a través del método de transformación por choque térmico. Se eligieron algunas de las clonas resistentes a ampicilina, para que mediante un PCR de colonia se pudiera comprobar si el vector tenía el inserto (Figura 9a, b, c y d). De las colonias que resultaron positivas se realizó la extracción del plásmido y posteriormente, la doble digestión para ver la liberación del inserto (Figura 10a, b, c y d). Finalmente para verificar que el inserto de cada uno de los vectores correspondía a los diferentes tipos de VPH utilizados se llevó a cabo la secuenciación de estos. Las secuencias obtenidas fueron contrastadas en la base de datos BLAST y se verificó que las secuencias coincidieran con las secuencias de las LCR de los diferentes tipos de VPH.

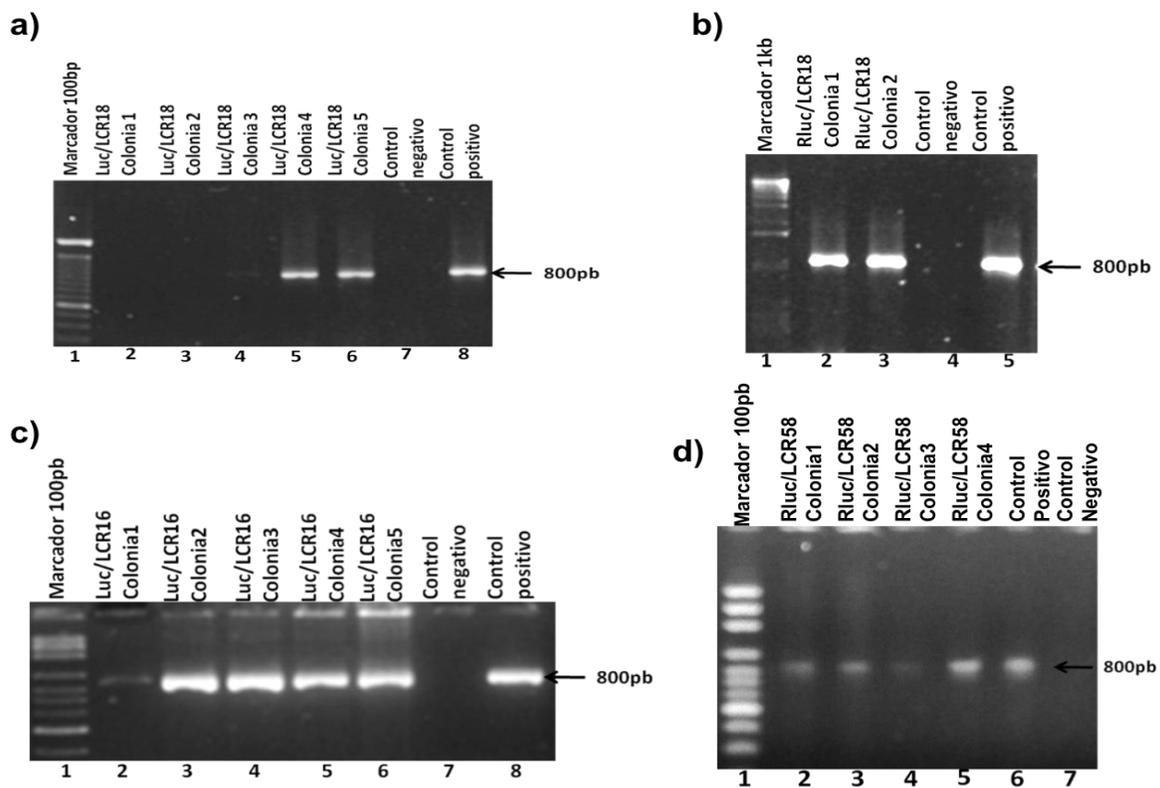


Figura 9. PCR de colonias para comprobar la presencia del inserto. a) Amplificación del vector Luc18 a partir de 5 colonias elegidas. Los carriles 2-4 muestran colonias que no amplificaron el inserto y los carriles 5 y 6 son colonias que amplificaron la LCR18. En los carriles 7 y 8 tenemos muestra sin colonia y muestra con ADN de la línea celular HeLa respectivamente. b) Amplificación del vector Rluc18 a partir de 2 colonias elegidas. Los carriles 2 y 3 muestran colonias que

amplificaron la LCR18 y los carriles 4 y 5 tienen muestra sin colonia y muestra con ADN de la línea celular HeLa respectivamente. c) Amplificación del vector Luc16 a partir de 5 colonias elegidas. Los carriles 2-6 son colonias que amplificaron la LCR16 y los carriles 7 y 8 son muestra sin colonia y muestra con ADN de la línea celular SiHa respectivamente. d) Amplificación del vector RLuc58 a partir de 4 colonias elegidas. Los carriles 2-5 contienen las colonias que amplificaron la LCR58 y en los carriles 6 y 7 tenemos muestra con ADN de VPH58 y muestra sin colonia respectivamente. En el carril 1 de todas las amplificaciones se colocó el marcador de peso el cual en el caso de las figuras a, c y d el marcador fue de 100pb y en la figura b fue de 1kb.

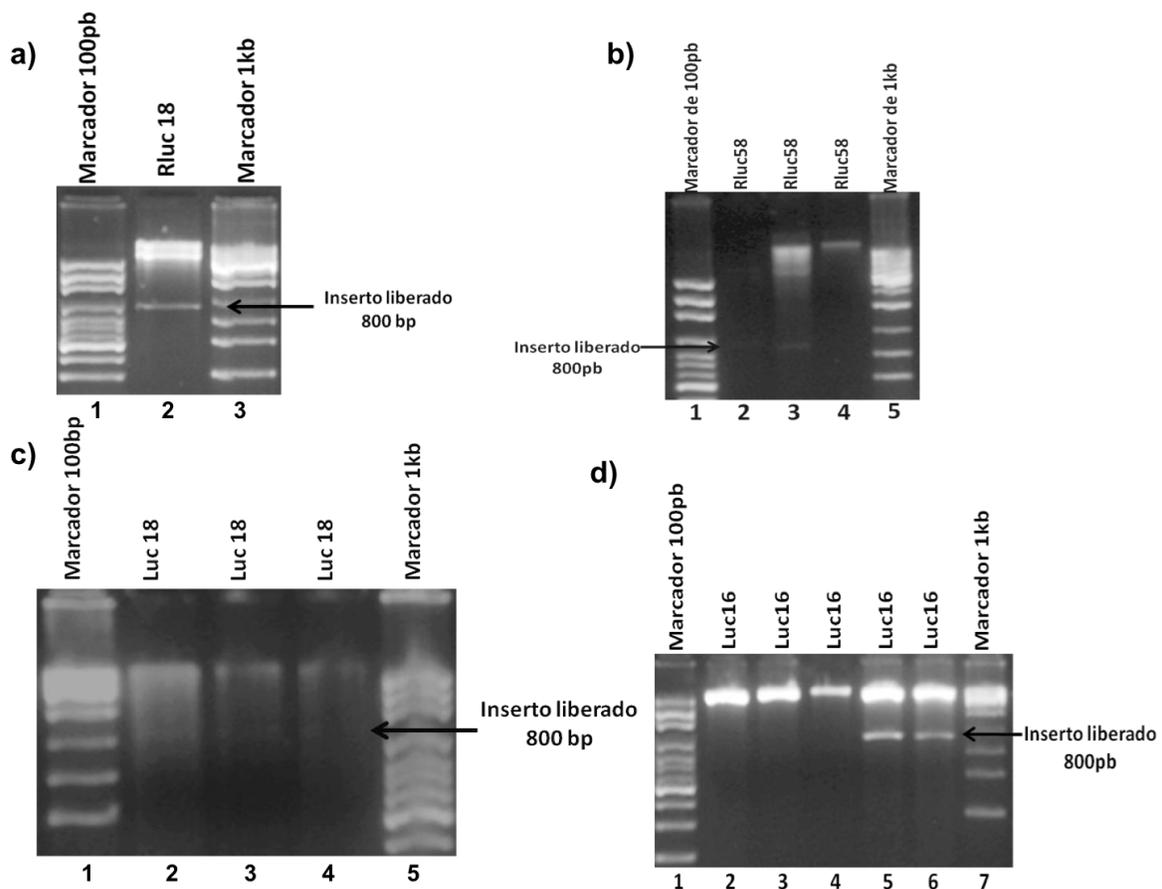


Figura 10. Doble digestión para liberar el inserto de los plásmidos extraídos a partir de las colonias elegidas para PCR de colonia. a) Inserto liberado a partir del vector RLuc18 en el carril 2, los marcadores de 100pb y 1kb en los carriles 1 y 3 respectivamente. b) Insertos liberados a partir del vector RLuc58 en los carriles 2 y 3, en el carril 4 el inserto no fue liberado. Los marcadores de 100pb y de 1kb en los carriles 1 y 5 respectivamente. c) Insertos liberados a partir del vector Luc18 en los carriles 2-4, los marcadores de 100pb y 1kb en los carriles 1 y 5 respectivamente. d) Insertos liberados a partir del vector Luc16 en los carriles 5 y 6, en los carriles 2-4 el inserto no fue liberado. Los marcadores de 100pb y de 1kb en los carriles 1 y 7 respectivamente.

8.4. Evaluación transcripcional de las distintas LCR en las líneas celulares HaCaT y C33.

Para evaluar el efecto de una LCR sobre la actividad transcripcional de otra en un mismo sistema celular, se transfectaron y cotransfectaron los vectores construidos en las líneas celulares HaCaT y C33, la primera línea con el motivo de tener un modelo que se acerque a las características que presentan las lesiones pre-malignas y la segunda a un cáncer invasor.

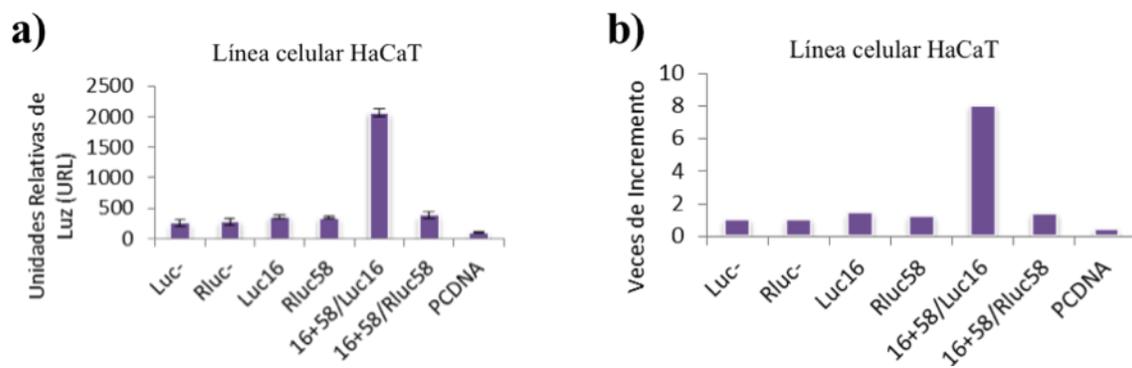


Figura 11. Evaluación transcripcional de las LCR del VPH16 y 58 en la línea celular HaCaT. a) Unidades relativas de Luz de la transfección y cotransfección de Luc16 y Rluc58. Las barras Luc16 y Rluc58 representan las transfecciones y las barras 16+58/Luc16 y 16+58/Rluc58 representan las lecturas de la LCR16 y la LCR58 en la cotransfección respectivamente. Las barras Luc- y Rluc- muestran la transfección con los vectores Luc y Rluc sin inserto respectivamente. b) Veces de incremento de la transfección y cotransfección de Luc16 y Rluc58. Las barras muestran cuantas veces aumentó la luminiscencia en las muestras en comparación con las transfecciones de los vectores Luc- y Rluc-, los valores de Rluc 58 fueron contrastados contra Rluc- y los valores de Luc16 contra Luc-.

En la línea celular HaCaT se pudo observar que la presencia simultánea de las LCR de los VPH16 y 58 generó un cambio significativo en la actividad transcripcional (Figura 11a) de la LCR del VPH16 ($p \leq 0.05$) en relación a su actividad independiente. En la figura 11 se observa que este incremento fue de aproximadamente de 7 veces (Figura 11b) en comparación con el nivel transcripcional de la transfección única del vector reportero con la LCR de VPH16.

Por otra parte, la actividad transcripcional de la LCR del VPH58 no se vio modificada por la presencia del vector reportero con la LCR del VPH16.

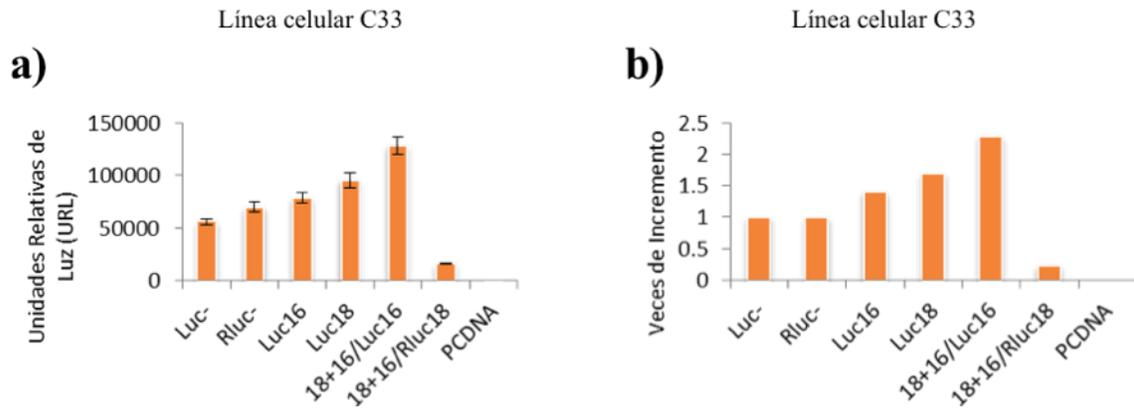


Figura 12. Evaluación transcripcional de las LCR del VPH16 y 18 en la línea celular C33. a) Unidades relativas de Luz de la transfección y cotransfección de Luc16 y Rluc18. Las barras Luc16 y Rluc18 representan las lecturas de las transfecciones y las barras 18+16/Luc16 y 18+16/Rluc18 representan las lecturas de la LCR16 y la LCR18 en la cotransfección respectivamente. Las barras Luc- y Rluc- muestran la transfección con los vectores Luc y Rluc sin inserto respectivamente. b) Veces de incremento de la transfección y cotransfección de Luc16 y Rluc18. Las barras muestran cuantas veces aumentó la luminiscencia en las muestras en comparación con las transfecciones de los vectores Luc- y Rluc-, los valores de Rluc 18 fueron contrastados contra Rluc- y los valores de Luc16 contra Luc-.

En la línea celular C33, un efecto similar se observó para VPH16 en presencia de la LCR de VPH18, donde la actividad transcripcional de la LCR de VPH16 aumentó ($p \leq 0.05$) en un factor de 1.6 veces (Figura 12a,b). Pero en este caso ocurrió algo muy interesante en relación a la actividad de la LCR de VPH18, pues la cotransfección de ambas LCR (16 y18) disminuyó notablemente la actividad de la LCR de VPH18 ($p \leq 0.05$). Es decir, la actividad de esta LCR18 disminuyó alrededor de 8.75 veces en relación a su actividad basal (Figura 12a,b).

9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

A nivel mundial la incidencia de infecciones múltiples por VPH en cáncer cervical asciende hasta un 85% (Fife et al., 2001). Sin embargo no se sabe si los diferentes tipos de VPH pueden existir en la misma célula o solamente existen en el mismo tejido. Además, las consecuencias de las infecciones múltiples con VPH tanto en el ciclo viral de éste como en el paciente, son desconocidas.

McLaughlin y Meyers (2004) utilizaron un modelo experimental donde los genomas completos de los VPH 31, 39, 45 y 18 fueron transfectados mediante electroporación, a queratinocitos primarios y mostraron que algunos VPH pueden coexistir en la misma célula de manera estable y replicarse de forma episomal. Sin embargo, aparentemente, ocurren interacciones que provocan un efecto generalmente negativo en uno o dos de los virus en cuestión. Otros autores como Mejlhede y cols. (2010) demostraron la coexistencia de los VPH, y aunque no encontraron dependencia biológica entre ellos, estos autores han sugerido que las infecciones con algunos tipos de VPH pueden influenciar la existencia de otros tipos.

Un aspecto interesante en la organización genómica de los papilomavirus, es que las LCR de diferentes tipos virales presentan sitios de respuesta diferencial a diversos factores transcripcionales. Por una parte, cambios o mutaciones sutiles en la secuencia genómica de la LCR repercuten en la actividad transcripcional de un mismo tipo viral, y por otra, un mismo tipo de VPH puede responder de forma diferencial según el contexto en el que se analice su actividad transcripcional (López-Saavedra et al., 2009; Rose et al., 1998; Hubert, 2005; Spink y Laimins, 2005). En este trabajo se considera la posibilidad de que si coexisten dos LCR en una misma célula podrían competir por los mismos factores de transcripción, generándose un cambio a nivel de la transcripción en uno o los dos tipos virales involucrados.

Nuestro objetivo en este trabajo fue determinar los cambios en la actividad transcripcional de las LCR que pudieran darse por las interacciones entre dos LCR de distintos tipos de VPH *in vitro*.

Se realizaron transfecciones y cotransfecciones de vectores conteniendo las distintas LCR y genes reporteros para determinar si la presencia de dos LCR de

diferentes tipos de VPH generaban cambios en su expresión. Para elegir los tipos de VPH a utilizar se recurrió a estudios previos realizados en el “Laboratorio de Epidemiología y Biología molecular de Virus Oncogénicos” del Instituto Nacional de Cancerología en México donde se mostraba que en México la presencia de infecciones múltiples era del 40% de todos los casos analizados y con presencia tanto en lesiones pre-malignas del cérvix, cómo de cáncer invasor. Los datos también mostraron que la combinación más frecuente, cuando se detectaron dos tipos virales en lesiones pre-malignas, fue del VPH16 con el VPH58. Por otra parte a nivel mundial en cáncer invasor cérvico uterino el 55% de los casos son positivos para el VPH16 y el 15% para el VPH18. Basándonos en estos antecedentes se eligió trabajar con los VPH tipo 18, 16 y 58. Se obtuvieron vectores reporteros a partir de las diferentes LCR de los VPH obtenidos de muestras de biopsias de tumores de cérvix con caracterización previa del tipo de VPH contenido.

En relación a lo anterior, para este trabajo se eligieron dos líneas celulares, HaCaT y C33. HaCat es una línea celular inmortalizada proveniente de queratinocitos humanos, que podría acercarse al fenotipo de una lesión pre-maligna y C33 es un cáncer invasor de cérvix sin secuencias de VPH. Thierry (2009) mostró que la transcripción de los VPH podrían presentar una especificidad celular en donde la region reguladora del virus no se activa en tipos celulares diferentes a los queratinocitos o células de carcinoma cervical. Nuestros resultados mostraron la factibilidad de detectar actividad transcripcional en las líneas celulares HaCaT y C33, mediadas a través de la actividad de los productos de los genes reporteros Luciferasa y Renilla en las transfecciones independientes (simples) de los vectores con las LCR 16, 18 y 58. Es cierto que la actividad transcripcional de estos vectores no es muy fuerte, probablemente debido al número de vectores transfectados, sin embargo al comparar con los valores de los vectores vacíos, si se detectan valores aumentados de actividad generada por los promotores estudiados. Para los próximos estudios nosotros proponemos llevar a cabo ensayos con GFP los cuales serán analizados mediante citometría de flujo para poder tener mayor evidencia de la eficiencia de la transfección en cada uno de los ensayos. Mientras tanto y con los ensayos actuales nosotros registramos la actividad transcripcional basal de cada una de las LCR y determinamos el

efecto de las cotransfecciones sobre esta actividad basal. De manera muy interesante, nuestros resultados mostraron que al cotransfectar la línea celular HaCat con las LCR de VPH16 y 58, la actividad de la LCR16 incrementa de forma significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a su actividad basal. Es decir, la presencia de la LCR de VPH58 incrementó 7 veces la actividad que la LCR16 presentó de manera aislada en la línea celular HaCat. De forma similar, la combinación de las LCR de VPH16 y VPH18 en la línea celular C33, incrementó la actividad transcripcional de la LCR16 en 1.6 veces, en relación a su actividad independiente. Sin embargo y de manera contraria, la actividad de la LCR de VPH18 disminuyó 8.75 veces en presencia de la LCR de VPH16.

Estos resultados evidencian que una LCR sí es capaz de afectar la actividad transcripcional de otra dentro de un modelo *in vitro* de lesiones premalignas y cáncer invasor. El resultado de este trabajo podría asociarse a lo reportado por Méndez y cols. (2005) en donde demostró que los individuos infectados con VPH16 ó VPH18 tenían una probabilidad de 5-7 veces mayor de adquirir una infección subsecuente con VPH58 que aquellos individuos no infectados con estos tipos de VPH. También por su parte Fife y cols (2001) sugirieron que un VPH adicional puede jugar un papel significativo en el desarrollo de las displasias y considera como candidatos en cooperación con el VPH16 a los VPH58, 51, 52 y 56. Aunque este evento pudiera tener múltiples explicaciones, una de estas podría ser que la presencia de un tipo viral promoviera la actividad transcripcional de un segundo tipo viral y que esto se reflejara en una ventaja selectiva, de ahí nuestra idea de que estos resultados podrían ser asociados con nuestro trabajo ya que mostramos un comportamiento que apoyan los resultados de Méndez y cols. al proponer un sistema en donde un tipo de VPH (representado por nuestras LCR) se está potenciando o suprimiendo por la presencia del otro.

Sin embargo, con nuestro trabajo no podemos explicar el efecto potenciador observado en la actividad transcripcional de la LCR del VPH 16 cuando es cotransfectada con la LCR del VPH 58 o 18. No obstante, nosotros tenemos la hipótesis de que esta situación podría generarse debido a una competencia por los factores iniciadores de la transcripción, donde la unión de los mismos pudiera ser más eficaz sobre la LCR de VPH16. Esta hipótesis concuerda con lo propuesto

por McLaughlin y Meyers (2004) y por Badaracco y cols. (2002) los cuales en su estudio demostraron que el porcentaje episomal del genoma del VPH16 aumentaba cuando se encontraba en una coinfección con el VPH18 en comparación a la infección única sugiriendo que el VPH16 es más agresivo. Sin embargo para verificar que el cambio en las actividades transcripcionales en las cotransfecciones es debido a este fenómeno, es necesario complementar con ensayos utilizando diferentes concentraciones y relaciones entre las distintas LCR cotransfectadas mediante relaciones de concentración de ADN de 1 a 2, 1 a 3 así sucesivamente para todas las combinaciones .

Por otra parte, nuestros resultados obtenidos de la actividad de la LCR del VPH18 mostraron un dato contrario al efecto observado para VPH16. En este caso, la cotransfección con las LCR 16 y 18 afectó inversamente a la actividad de VPH18, la cual disminuyó en factor de 8.75 veces. En este caso lo que sugerimos es que la LCR de VPH18 pudiera ser más afin a factores represores como YY1, de manera que por una parte pudiera secuestrar los factores YY1 de la LCR del VPH16 y por otro lado, la unión de los factores YY1 a la LCR del VPH18 impidiera la unión de otros factores potenciadores, evitando la activación de su actividad transcripcional (Baucknecht *et al.*,1992). Esta situación pudiera asemejarse a lo descrito por Hardin (1960) en el “Principio Ecológico de Exclusión Competitiva”, el cual dice que cuando organismos similares compiten por los mismos recursos en la misma manera, el más fecundo o virulento excluirá al organismo menos adecuado. Este principio ha sido demostrado que incluye a múltiples tipos de virus (Bremermann y Thieme,1989).

Nuestro estudio aborda un aspecto específico de la posible interacción entre las LCR de distintos tipos de VPH, sin embargo para fortalecer los resultados sería importante agregar otros experimentos que nos permitan confirmar que los cambios en la transcripción de las LCR es debido a las diferencias en los sitios de unión de los factores de transcripción y no a causa de variables generadas por el modelo experimental elegido. Para asegurarnos que las diferencias en la actividad transcripcional en las cotransfecciones no se generó debido a la cantidad de plásmidos transfectados (más plásmidos transfectados de un tipo de LCR que del otro) es necesario realizar un PCR en tiempo real con ADN extraído de las células

transfectadas. De esta manera se puede normalizar el número de plásmidos transfectados y contrastarlo con el valor de las unidades relativas de luz permitiendo asegurar que el cambio en la actividad transcripcional es debido a la presencia de otra LCR. También se deberían de identificar los factores transcripcionales específicos que influyen en las variaciones de las actividades transcripcionales observadas mediante un ensayo de cambio de la movilidad electroforética (EMSA) para poder ver específicamente que factores son mas afines a una LCR y ver si esta unión se ve modificada en las cotransfecciones cambiando el tipo (potenciadores o reguladores) y el número de factores de transcripción unidos. Además para asegurarnos que las unidades relativas de luz registradas por la actividad de los genes reporteros no es influenciada debido a efectos post transcripcionales se podría llevar a cabo un RT-PCR en tiempo real utilizando ARN extraído de las transfecciones y poder tener un valor preciso de la cantidad de transcritos generados por los genes reporteros.

Por otra parte, para entender de forma global el significado funcional de la presencia de más de un tipo de VPH en una célula, en los estudios futuros se deberán de incluir otras interacciones como por ejemplo proteínas virales como E2, E6 y E7, en conjunto con las distintas LCR de distintos genomas de VPH .

Con nuestros resultados concluimos que nuestro sistema puede ser utilizado para mostrar un acercamiento al estudio sobre los efectos de las infecciones virales múltiples en las actividades transcripcionales de cada uno de los virus, como lo mostramos en nuestro caso con el VPH. Así mismo, se concluye que la actividad transcripcional de una LCR de VPH afecta la actividad de otra en relación a otro tipo de VPH distinto.

10. REFERENCIAS

1. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>
2. Abu-Rustum NR and Sonoda Y. (2010) Fertility-sparing surgery in early stage cervical cancer: indications and applications. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 8(12):1435-8.
3. Apt D, Chong T, Liu Y and Bernard HU. (1993) Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 67: 4455–63.
4. Apt D, Liu Y and Bernard HU. (1994) Cloning and functional analysis of spliced isoforms of human nuclear factor I-X: interference with transcriptional activation by NFI/CTF in a cell-type specific manner. *Nucleic Acids Res.* 22:3825–33.
5. Arroyo M, Bagchi S and Raychaudhuri P. (1993) Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase E2F/cyclin complex. *Mol. Cell. Biol.* 13:6537–46.
6. Bachtary B, Obermair A, Dreier B, Birner P, Breitenecker G, Knocke E, Selzer E and Potter R. (2002) Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Int. J. Cancer.* 102 (3) 237– 43.
7. Badaracco G, Venuti A, Sedati A and Marcante ML.(2002) HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol.* 67(4):574-82.
8. Barton MB, Frommer M, Shafiq J. (2006) Role of radiotherapy in cancer control in low-income and middle-income countries. *Lancet Oncol.* 7:584-95.

9. Baseman JG and Koutsky LA. (2005) The epidemiology of human papillomavirus infections. *J. Clin. Virol.* 32 (Suppl 1), 16–24.
10. Bauknecht T, Angel P, Royer HD and zur Hausen H. (1992) Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J.* 11(12):4607-17.
11. Baumruker T, Sturm R, and Herr W. (1988) OBP100 binds remarkably degenerate octamer motifs through specific interactions with flanking sequences. *Genes Dev.* 2:1400–13.
12. Bernard HU and Apt D. (1994) Transcriptional control and cell type specificity of HPV gene expression. *Arch. Dermatol.* 130:210–5.
13. Bertelsen BI, Steine SJ, Sandvei R, Molven A and Laerum OD. (2006) Molecular analysis of the PI3K-AKT pathway in uterine cervical neoplasia: frequent PIK3CA amplification and AKT phosphorylation. *Int. J. Cancer.* 118: 1877–83.
14. Bouvard V, Storey A, Pim D, and Banks L. (1994) Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J.* 13:5451–9.
15. Boyer SN, Wazer DE and Band V. (1996) E7 protein of human papilloma virus 16 induces the degradation of retinoblastoma protein through ubiquitin–proteasome pathway. *Cancer Res.* 56:4620–4.
16. Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister A J and Kouzarides T. (1999) The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth; *EMBO J.* 18:2449–58.

17. Bremermann HJ and Thieme HR. (1989) A competitive exclusion principle for pathogen virulence. *J Math Biol.* 27(2):179-90.
18. Brown DR, Bryan JT, Cramer H, Katz BP, Handy V and Fife KH. (1994) Detection of multiple human papillomavirus types in condylomata acuminata from immunosuppressed patients. *J. Infect. Dis.* 170(4):759– 65.
19. Brown DR, Schroeder JM, Bryan JT, Stoler MH and Fife KH. (1999) Detection of multiple human papillomavirus types in Condylomata acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. *J. Clin. Microbiol.* 37(10):3316– 22.
20. Butz K, and Hoppe-Seyler, F. (1993) Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: Composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J. Virol.* 67:6476–86.
21. Chan WK, Chong T, Bernard HU, and Klock G. (1990) Two AP1 sites in the long control region of human papillomavirus type 16 lead to phorbol ester stimulation of the viral E6/E7 promoter. *Nucleic Acids Res.* 18:763–9.
22. Chiang CM, Dong G, Broker TR and Chow LT (1992) Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *J. Virol.* 66:5224–31.
23. Chin MT, Broker TR, and Chow LT. (1989) Identification of a novel constitutive enhancer element and an associated binding protein: implications for human papillomavirus type 11 enhancer regulation. *J. Virol.* 63: 2967–77.
24. Chong T, Chan WK, and Bernard HU. (1990) Transcriptional activation of human papillomavirus 16 by nuclear factor I, AP1, steroid receptors and a possibly novel transcription factor, PVF: a model for the composition of genital papillomavirus enhancers. *Nucleic Acids Res.* 18:465–70.

25. Chuang TY, Perry HO, Kurland LT and Ilstrup DM. (1984) Condyloma acuminatum in Rochester, Minn, 1950– 1978: II. Anaplasias and unfavorable outcomes. *Arch. Dermatol.* 120(4):476– 83.
26. Cid A, Auewarakul P, Garcia-Carranca A., Ovseiovich R, Gaissert H, and Gissmann L. (1993) Cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *J. Virol.* 67:6742–52.
27. Cripe TP, Haugen TH, Turk JP, Tabatabai F, Schmid PG, Dürst M, Gissmann L., Roman A, and Turek L (1987) Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte dependent enhancer, and by viral E2 transactivator and repressor gene products: implications for carcinogenesis. *EMBO J.* 6:3745–53.
28. Davidson I, Xiao JH, Rosales R, Staub A, and Chambon P. (1988) The HeLa cell protein TEF-1 binds specifically and cooperatively to two SV40 enhancer motifs of unrelated sequence. *Cell.* 54:931–42.
29. deBoer E, Antoniou M, Mignotte V, and Grosveld F. (1988) The human beta-globin promoter: nuclear protein factors and erythroid specific induction of transcription. *EMBO J.* 13:4203–12.
30. deVries E, van Driel W, Tromp M, van Boom J, and van der Vliet PC (1985) Adenovirus DNA replication in vitro: site-directed mutagenesis of the nuclear factor I binding site of the Ad2 origin. *Nucleic Acids Res.* 13:4935–52.
31. Demeret C, Yaniv M and Thierry F. (1994) The E2 transcriptional repressor can compensate for SP1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter. *J. Virol.* 68:7075–82.

32. Dong XP, Stubenrauch F, Beyer-Finkler E, and Pfister H. (1994) Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV-16 DNA from cervical cancers. *Int. J. Cancer*. 58:803–8.
33. Dostatni N, Lambert PF, Sousa R, Ham J, Howley PM, and Yaniv M. (1991) The functional BPV-1 E2 transactivating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev*. 5:1657–71.
34. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS and Markowitz LE. (2007) Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*. 297(8):813–9.
35. Dyson N. (1998) The regulation of E2F by pRb-family proteins. *Genes Dev*. 12: 2245–62.
36. Ebrahim SH, McKenna MT and Marks JS. (2005) Sexual behaviour: related adverse health burden in the United States. *Sex. Transm. Infect.* 81(1): 38–40.
37. Eichten A, Westfall M, Pietenpol JA and Münger K. (2002) Stabilization and functional impairment of the tumor suppressor p53 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Virology* 295:74–85.
38. Evans BA, Bond RA and MacRae KD. (1992) A colposcopic case-control study of cervical squamous intraepithelial lesions in women with anogenital warts. *Genitourin. Med.* 68(5):300–4.
39. Faus I, Huey-Juang H and Fuchs E. (1994) Oct-6: a regulator of keratinocyte gene expression in stratified squamous epithelia. *Mol. Cell Biol.* 14:3263–75.

40. Fife KH, Cramer HM, Schroeder JM and Brown DR. (2001) Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. *J. Med. Virol.* 64(4):550–9.
41. Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS and Duerksen-Hughes PJ. (2002) The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277:21730–9.
42. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Désy M, Rohan TE. (1999) Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J. Infect. Dis.* 180(5):1415–23.
43. Frazer IH (2004). Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat. Rev. Immunol.* 4(1):46-54.
44. Fromental C, Kanno M, Nomiyama H, and Chambon P. (1988) Cooperativity and hierarchical levels of functional organization in the SV40 enhancer. *Cell.* 54:943–53.
45. Fuchs, PG and Pfister H. (1994) Transcription of papillomavirus genomes. *Intervirology.* 37:159–67.
46. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B and Galloway DA. (1997) Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with HPV16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 11:2090–100.
47. Furth PA and Baker CC. (1991) Anelement in the bovine papillomavirus late 30 untranslated region reduces polyadenylated cytoplasmic RNA levels. *J. Virol.* 65:5806–12.

48. Garcia-Vallve S, Iglesias-Rozas JR, Alonso A and Bravo IG. (2006) Different papillomaviruses have different repertoires of transcription factor binding sites: convergence and divergence in the upstream regulatory region. *BMC Evol. Biol.* 6:20.
49. Gewin L, Myers H, Kiyono T and Galloway DA. (2004) Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev.* 18:2269–82.
50. Gloss B, Bernard HU, Seedorf K and Klock G. (1987) The upstream regulatory region of the human papillomavirus-16 contains an E2 protein independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J.* 6:3735–43.
51. Gloss B and Bernard HU. (1990) The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distal element. *J. Virol.* 64:5577–84.
52. Gill G, and Ptashne M. (1988) Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature.* 334:721–4.
53. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, Scott DR, Rush BB, Lawler P and Sherman ME. (1994) Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J. Infect. Dis.* 169(2), 235–40.
54. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ and Burk RD. (1998) Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N. Engl. J. Med.* 338(7): 423–8.

55. Hubert WG. (2005) Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle. *J Virol.* 79:5914-22.
56. Imoto I, Tsuda H, Hirasawa A, Miura M, Sakamoto M, Hirohashi S and Inazawa J. (2002) Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy. *Cancer Res.* 62:4860–6.
57. Ishiji T, Lacey MJ, Parkinen S, Anderson RD, Haugen RH, Cripe TP, Xiao JH, Davidson I, Chambon P, and Turek LP. (1992) Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific coactivator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J.* 11:2271–81.
58. Jo H and Kim JW. (2005) Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Ther.* 3:419–34.
59. Kalantari M, Karlsen F, Johansson B, Sigurjonsson T, Warleby B and Hagmar B. (1997) Human papillomavirus findings in relation to cervical intraepithelial neoplasia grade: a study on 476 Stockholm women, using PCR for detection and typing of HPV. *Hum. Pathol.* 28(8):899– 904.
60. Kennedy IM, Haddow JK, and Clements JB. (1991) A negative regulatory element in the human papillomavirus type 16 genome acts at the level of late mRNA stability. *J. Virol.* 65:2093–7.
61. Lambert PF. (1991) Papillomavirus DNA replication. *J. Virol.* 65:3417–20.
62. La Torre G, de Waure C, Chiaradia G, Mannocci A and Ricciardi W. (2007) HPV vaccine efficacy in preventing persistent cervical HPV infection: a systematic review and meta-analysis. *Vaccine.* 25(50): 8352-8.

63. Lewis B, Tullis G, Seto E, Horikoshi N, Weinmann R, and Shenk T. (1995) Adenovirus E1A proteins interact with the cellular YY1 transcription factor. *J. Virol.* 69:1628–36.
64. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ and Clifford GM. (2011) Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int. J. Cancer.* 128(4):927–35.
65. Li TT, Zhao LN, Liu ZG, Han Y and Fan DM. (2005) Regulation of apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene. *World J. Gastroenterol.* 11:931–7.
66. Li X and Coffino P. (1996) High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J. Virol.* 70:4509–16.
67. Longworth MS and Laimins LA. (2004) Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:362–72.
68. López-Saavedra A, González-Maya L, Ponce-de-León S, García-Carrancá A, Mohar A and Lizano M. (2009) Functional implication of sequence variation in the long control region and E2 gene among human papillomavirus type 18 variants. *Arch Virol.* 154(5):747-54.
69. Luostarinen T, af Geijersstam V, Bjorge T, Eklund C, Hakama M, Hakulinen T, Jellum E, Koskela P, Paavonen J, Pukkala E, Schiller JT, Thoresen S, Youngman LD, Dillner J and Lehtinen M. (1999) No excess risk of cervical carcinoma among women seropositive for both HPV16 and HPV6/11. *Int. J. Cancer* 80(6):818–22.

70. Martin K, Lillie J, and Green, M. (1990) Evidence for interaction of different eukaryotic transcriptional activators with distinct cellular targets. *Nature*. 346:147–52.
71. Magal SS, Jackman A, Ish-Shalom S, Botzer LE, Gonen P, Schlegel R and Sherman L. (2005). Downregulation of Bax mRNA expression and protein stability by the E6 protein of human papillomavirus 16. *J. Gen. Virol.* 86:611–21.
72. May M, Dong XP, Beyer-Finkler E, Stubenrauch F, Fuchs PG, and Pfister H. (1994) The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV-16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J.* 13:1460–6.
73. McLaughlin-Drubin ME and Meyers C. (2004) Evidence for the coexistence of two genital HPV types within the same host cell in vitro. *Virology*. 321(2):173-80.
74. McIntyre MC, Ruesch MN and Laimins LA . (1996) Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology*. 215 73–82.
75. Mejlhede N, Pedersen BV, Frisch M and Fomsgaard A. (2010) Multiple human papilloma virus types in cervical infections: competition or synergy? *APMIS*. 118:346–52.
76. Minaguchi T, Yoshikawa H, Nakagawa S, Yasugi T, Yano T, Iwase H, Mizutani K, Shiromizu K, Ohmi K, Watanabe Y, Noda K, Nishiu M, Nakamura Y, and Taketani Y. (2004) Association of PTEN mutation with HPV-negative adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer Lett.* 210: 57–62.

77. Montalvo E, Shi Y, Shenk T, and Levine A. (1991) Negative regulation of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 65:3647–55.
78. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S and Maruo T. (2004) The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J. Med. Sci.* 50:9–19.
79. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen L, Owens M, Grace M and Huh K. (2004) Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 78: 11 451–60.
80. Müller M, Gissmann L, Cristiano RJ, Sun XY, Frazer IH, Jenson AB, Alonso A, Zentgraf H, and Zhou J. (1995) Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J. Virol.* 69:948–54.
81. Münger K and Howley PM. (2002) Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 89:213–28.
82. Nair S and Pillai MR. (2005) Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral. Dis.* 11:350–9.
83. Nagata K, Guggenheimer RA, and Hurwitz J. (1983) Specific binding of a cellular DNA replication protein to the origin of replication of adenovirus DNA. *Proc. Natl. Acads. Sci.* 80:6177–81.
84. Narisawa-Saito M, and Kiyono T. (2007) Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 98:1505–11.
85. Niladri Ganguly and Suraj P. (2009) Parihar. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci.* 34(1):113–23.

86. O'Connor M and Bernard HU. (1995) Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NFI at a conserved composite regulatory element. *Virology*. 207:77–88.
87. Park JS, Kim EJ, Lee JY, Sin HS, Namkoong SE and Um SJ. (2001) Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins. *Int. J. Cancer*. 91:822–7.
88. Roden RBS, Kirnbauer R, Jenson AB, Lowy DR, and Schiller JT. (1994) Interaction of Papillomaviruses with the cell surface. *J. Virol*. 68:7260–6.
89. Romanczuk H, Thierry F, and Howley PM. (1990) Mutational analysis of cis-elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J. Virol*. 64:2849–59.
90. Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. (1998) Human papillomavirus 16, E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*. 12:2061–72.
91. Rose B, Steger G, Dong X, Thompson C, Cossart Y, Tattersall M and Pfister H. (1998) Point mutations in SP1 motifs in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 18 isolates from cervical cancers increase promoter activity. *J Gen. Virol*. 79:1659-63.
92. Russel J and Botchan MR. (1995) Cis-acting components of human papillomavirus (HPV) DNA replication: linker substitution analysis of the HPV type 11 origin. *J. Virol*. 69:651–60.

93. Schaeffer AJ, Nguyen M, Liem A, Lee D, Montagna C, Lambert PF, Ried T and Difi lippantonio MJ (2004) E6 and E7 oncoproteins induce distinct patterns of chromosomal aneuploidy in skin tumors from transgenic mice; *Cancer Res.* 64:538–46
94. Seo EJ, Kim HJ, Lee CJ, Kang HT and Hwang ES. (2004) The role of HPV oncoproteins and cellular factors in maintenance of hTERT expression in cervical carcinoma cells. *Oncology.* 94:40–47
95. Seto E, Lewis B, and Shenk T. (1993) Interaction between transcription factors Sp1 and YY1. *Nature.* 365:462–4.
96. ShiY, Seto E, Chang L-S, and Shenk T. (1991) Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell.* 67:377–88.
97. Shrivastava D, Saleque S, Kalpana G, Artandi S, Goff S and Calame K. (1993) Inhibition of transcriptional regulator YY1 by association with c-myc. *Science.* 262:1889–92.
98. Sibbet GJ and Campo MS. (1990) Multiple interactions between cellular factors and the non-coding region of humanpapillomavirus type 16. *J. Gen. Virol.* 71:2699–707.
99. Sigurgeirsson B, Lindelof B and Eklund G. (1991) Condylomata acuminata and risk of cancer: an epidemiological study. *BMJ.* 303(6798):341– 4.
100. Silins I, Wang Z, Avall-Lundqvist E, Frankendal B, Vikmanis U, Sapp M, Schiller JT and Dillner J. (1999) Serological evidence for protection by human papillomavirus (HPV) type 6 infection against HPV type 16 cervical carcinogenesis. *J. Gen. Virol.* 80(11):2931– 6.

101. Silins I and Dillner J. (2000) Interactions between different HPV types. *Papillomavirus Rep.* 11(3):49–52.
102. Spink KM and Laimins LA. (2005) Induction of the human papillomavirus type 31 late dependent promoter requires differentiation but not DNA amplification. *J. Virol.* 79:4918-26.
103. Steenbergen RD, Kramer D, Braakhuis BJ, Stern PL, Verheijen RH, Meijer CJ and Snijders PJ. (2004) TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 96:294–305.
104. Sverdrup F and Khan SA. (1995) Two E2 binding sites alone are sufficient to function as the minimal origin of replication of human papillomavirus type 18 DNA. *J. Virol.* 69:1319–23.
105. Tan SH, Leong LEC, Walker PA, and Bernard HU. (1994) The human papillomavirus type 16 transcription factor E2 binds with low cooperativity to two flanking binding sites and represses the E6 promoter by displacement of Sp1 and TFIID. *J. Virol.* 68:6411–20.
106. Thierry F. (2009) Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology.* 384(2):375-9.
107. Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, and Howley PM. (1992) Two AP1 sites binding junB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J. Virol.* 66:3740–48.
108. Thompson DA, Belinsky G, Chang TH, Jones DL, Schlegel R and Munger K. (1997) The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints. *Oncogene.* 15(25):3025– 35.

109. Tjian R and Maniatis, T. (1994) Transcriptional activation: A complex puzzle with few easy pieces. *Cell*. 77:5–8.
110. Turek LP. (1994) The structure, function and regulation of papillomavirus genes in infection and cervical cancer. *Adv. Virus. Res.* 44:305–56.
111. Um SJ, Rhyu JW, Kim EJ, Jeon KC, Hwang ES and Park JS. (2002) Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. *Cancer Lett.* 179: 205–12.
112. Verrijzer CP, Arnoud JK, and van der Vliet PC. (1990) The Oct-1 homeo domain contacts only part of the octamer sequence and full Oct-1 DNA binding activity requires the POU-specific domain. *Genes Dev.* 4:1964–74.
113. Vogt P, and Bos T. (1990) Jun oncogene and transcription factor. *Adv. Cancer Res.* 55:1–35.
114. von Knebel Doeberitz M. (2002) New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur.J. Cancer.* 38: 2229–42.
115. Watt FM. (1998) Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353: 831–7.
116. Wang H-G, Rikatake Y, Carter M, Yaciuk P, Abraham S, Zerler B, and Moran E. (1993) Identification of specific adenovirus E1A N-terminal residues critical to the binding of cellular proteins to the control of cell growth. *J. Virol.* 67:476–88.
117. Yoon CS, Kim KD, Park SN and Cheong SW. (2001) Alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283:668–73.

118. Zanier K, Charbonnier S, Baltzinger M, Nominé Y, Altschuh D and Travé G. (2005) Kinetic analysis of the interactions of human papillomavirus E6 oncoproteins with the ubiquitin ligase E6AP using surface plasmon resonance. *J. Mol. Biol.* 349:401–12
119. Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU and O'Connor MJ. (1999) The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J. Virol.* 73:6209–19.
120. Zeffass-Thome K, Zwerschke W, Manhardt B, Tindle R, Botz JW and Jansen-Durr P. (1996) Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16, E7 oncoprotein. *Oncogene.* 13:2323–30.
121. Zhang A, Maner S, Betz R, Angström T, Stendahl U, Bergman F, Zetterberg A and Wallin KL. (2002) Genetic alterations in cervical carcinomas: frequent low-level amplifications of oncogenes are associated with human papillomavirus infection. *Int. J. Cancer.* 101: 427–33.
122. zur Hausen H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer.* 2: 342–50.
123. zur Hausen H. (2009a) Human papillomavirus & cervical cancer. *Indian J. Med. Res.* 130(3):209.
124. zur Hausen H. (2009b) The search for infectious causes of human cancers: where and why (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48(32):5798–808.