



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Título:

**EFEECTO DE LA ONCOPROTEÍNA E6 DEL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO TIPO 18 (VPH18) SOBRE COFILINA 1**

T E S I S

Que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

Katia Montserrat Ramírez Alcántara

Tutor:

Dr. Joaquín Manzo Merino
Instituto Nacional de Cancerología



Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2017



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.

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología (INCan/Instituto de Investigaciones Biomédicas), bajo la supervisión del Dr. Joaquín Manzo Merino. Este proyecto fue apoyado por el Instituto Nacional de Cancerología.

El comité revisor estuvo conformado por:

Dr. Joaquín Manzo Merino
Tutor principal
Instituto Nacional de Cancerología.

Dr. Roberto Eduardo López Urrutia
UNAM/Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED).

Dr. Luis Enrique Arias Romero
UNAM/Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED).

Dr. Felipe Vaca Paniagua
Instituto Nacional de Cancerología, UNAM/ Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED).

Dra. Sonia Andrea León Cabrera
UNAM/ Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED).

Los resultados de este trabajo fueron presentados en el “*3rd ICGEB workshop on Human Papillomavirus and associated malignancies: biology, prevention and therapy*” realizado en la ciudad de Sao Paulo, Brasil, en el mes de septiembre de 2017, en la modalidad de presentación oral y en el “X Congreso Nacional de Virología” celebrado en la ciudad de Chautla, Puebla en el mes de octubre del mismo año, en la modalidad de cartel.

AGRADECIMIENTOS

Es difícil encontrar las palabras para agradecer a las personas que hicieron posible la realización de mi tesis y para demostrar lo que cada una de ellas significó durante esta etapa de mi vida, sin embargo no me queda más que decir de todo corazón y sinceramente **MUCHAS GRACIAS**:

Al Dr. Joaquín Manzo Merino por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto bajo su dirección; fue la tolerancia para impartir su profundo conocimiento, así como la pasión hacia su trabajo, un motivo para seguir día con día no sólo para el término de este proyecto, sino también para el comienzo de muchos otros. Gracias por ampliar mis perspectivas y aumentar en mí la gran ilusión de seguir creciendo siempre.

A la Dra. Marcela Lizano, por su apoyo para la realización de este proyecto y por permitirme compartir con todo su equipo no sólo momentos de grandes conocimientos, sino también momentos que fomentan grandes amistades.

A mi familia, pero especialmente a mi madre, hermano y abuela, por ser siempre el motor que me impulsa a seguir adelante y porque a pesar de las dificultades sé que siempre estarán para mí.

A todos mis compañeros de laboratorio, Josué, Sergio, Leslie, Alfredo, Omar, Jhonner, Ashlin, Adriana, Adela y todos los que faltan, por compartir conmigo sus conocimientos y por las críticas constructivas que fueron tan necesarias para lograr el término de mi tesis, así como por los grandes momentos y nuevas experiencias vividas con ustedes.

A mis amigos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, pero principalmente a Diana, Brenda y Fernanda, mis mayores amistades de la carrera, por estar siempre conmigo, por su confianza y por compartir conmigo la emoción del término de mi tesis. A Jiel, por su apoyo incondicional, su cariño sincero, confianza y motivación para alcanzar no sólo este logro, sino muchos otros.

A la Ma. María del Pilar Ramos Godínez, en la Unidad de Patología del INCan, por su gran apoyo para la obtención de imágenes de las partículas virales generadas en este proyecto,

A la UNAM porque es en esta gran casa de estudios donde obtuve los conocimientos necesarios que me guiaron para llevar a cabo un proyecto de tesis.

Al INCan por abrirme las puertas no sólo para llevar a cabo mi proyecto de tesis, sino también por permitirme formar parte del enorme grupo de personas que trabajan para el conocimiento del cáncer y para mejorar la calidad de vida de las personas que lo padecen.

ÍNDICE

I. LISTA DE ABREVIATURAS	1
II. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	2
III. RESUMEN	3
IV. INTRODUCCIÓN	4
IV.i Agentes infecciosos causantes de cáncer	4
IV.ii Virus oncogénicos	5
IV.iii Virus del Papiloma humano (VPH)	6
Proteínas L1 y L2	
Proteína E1	
Proteína E2	
Proteína E4	
Proteína E5	
Proteína E7	
Proteína E6	
IV.iv Mecanismo oncogénico del VPH	9
IV.v Microfilamentos de actina: regulación por Cofilina 1 (CFL-1)	10
V. ANTECEDENTES	12
VI. JUSTIFICACIÓN	13
VII. HIPÓTESIS	13
VIII. OBJETIVOS	14
VIII.i General	
VIII.ii Particulares	
IX. MATERIALES Y MÉTODOS	14
X. RESULTADOS	19
XI. DISCUSIÓN	26
XII. CONCLUSIONES	28
XIII. FUTURAS DIRECCIONES	28
XIV. BIBLIOGRAFÍA	29
XV. ANEXOS	34

I. LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Centígrados
µg	Microgramos
ADA3	Adenosina Deaminasa 1
ADF	Factor Despolimerizador de Actina
ATP	Adenosín Trifosfato
CaCu	Cáncer Cervicouterino
CBP	Proteína de Unión a CREB
CFL-1	Cofilina 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2F	Factor de Elongación 2
E6AP	Proteína Asociada a E6
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal
ETS	Enfermedades de Transmisión Sexual
Gps2	Supresor 2 de la ruta de las Proteínas G
GST	Glutatió S-Transferasa
HRP	Peroxidasa de rábano
hrs	Horas
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
IRF-3	Factor Regulador del Interferón 3
kDa	Kilo Dalton
LCR	Región Larga de Control
LIMK	Cinasa de LIM
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Open Reading Frame
pb	Pares de bases
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial Hidrógeno
pRb	Proteína del Retinoblastoma
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SFB	Suero Fetal Bovino
SIDA	Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida
Tm	Temperatura de alineamiento
TNF R1	Receptor 1 del Factor de Necrosis Tumoral
VHB y VHC	Virus de la hepatitis B y C
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VPH	Virus del Papiloma humano

II. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Mecanismos mediante los cuales los agentes infecciosos pueden contribuir a la transformación maligna

Figura 2. Amplificación de E6

Figura 3. Crecimiento y selección de clonas transformantes

Figura 4. Presencia del inserto en clonas transformantes

Figura 5. Análisis de secuenciación

Figura 6. Vectores lentivirales

Figura 7. La expresión de E6 del VPH 18 produce un incremento en los niveles de p-CFL-1

Figura 8. E6 interactúa con LIMK1

Figura 9. E6 modula los niveles de expresión de LIMK1

Figura 10. E6 favorece la translocación de LIMK1 al núcleo celular.

Tabla 1. Virus humanos y su asociación con cáncer

III. RESUMEN

El Virus del Papiloma humano (VPH) es uno de los principales agentes infecciosos causantes de cáncer y debe su potencial transformante principalmente a las proteínas E6, E7 y E5, consideradas oncoproteínas virales. La oncoproteína E6 del VPH tipo 18 tiene una alta capacidad de interacción con proteínas con dominios PDZ, reconociendo y enviando a degradación a algunas de ellas, implicadas en los fenómenos de polaridad y adhesión celular. La polaridad y adhesión celular son fenómenos regulados por el citoesqueleto de actina y algunos estudios han demostrado que cambios en la expresión o el estado de fosforilación de la proteína reguladora de dicho citoesqueleto, Cofilina 1 (CFL-1), se encuentra asociada a un mal pronóstico en diferentes tipos de cáncer.

CFL-1 es un regulador negativo de la polimerización de los filamentos de actina y es inactivada mediante su fosforilación por la proteína cinasa LIMK1. A su vez, LIMK1 posee en su estructura un dominio PDZ, lo cual hace suponer que esta proteína podría ser un blanco de interacción de E6 y que dicha interacción puede regular la dinámica de los filamentos de actina mediante su efecto sobre CFL-1.

Es por ello que el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la oncoproteína E6 del VPH 18 sobre CFL-1 a partir de su posible interacción con la proteína LIMK1. Nuestros resultados mostraron que la expresión de E6 del VPH 18 produce un incremento en los niveles de CFL-1 fosforilada, así como la habilidad de E6 de interactuar y modular los niveles de LIMK1. Diversos estudios son aún necesarios para determinar las consecuencias de la interacción entre la oncoproteína E6 del VPH y la proteína LIMK1 sobre CFL-1.

IV. INTRODUCCIÓN

IV. I Agentes infecciosos causantes de cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de las células con severas implicaciones en salud pública a nivel mundial (Ferlay, *et al.*, 2010). Dentro de los agentes causantes de cáncer existen agentes mutágenos físicos y químicos, así como agentes infecciosos; se estima que los agentes infecciosos, entre ellos bacterias, virus y parásitos, causan cerca del 18% de los casos de cáncer en todo el mundo (Morales-Sánchez y Fuentes-Panán, 2014). De los 12,7 millones de nuevos casos de cáncer estimados en el año 2008, alrededor de 2 millones fueron atribuidos a infecciones. El Virus de la Hepatitis B y C (VHB y VHC), *Helicobacter pylori* y el Virus del Papiloma humano (VPH) en conjunto, fueron los agentes infecciosos responsables de 1,9 millones de casos de cáncer en todo el mundo (de Martel *et al.*, 2012).

Los principales mecanismos por los cuales los agentes infecciosos pueden promover y mantener la formación de tumores se pueden dividir en tres categorías principales (Figura 1): el primer mecanismo es la inducción de inflamación crónica como resultado de una respuesta inmunitaria continua a una infección persistente; en segundo lugar, la oncogénesis a través de la transformación inducida por elementos virales y, el tercer mecanismo es la supresión crónica del sistema inmunológico por el agente infeccioso, como el caso de la inmunodeficiencia (SIDA) causada por la infección del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Dalton-Griffin y Kellam, 2009).

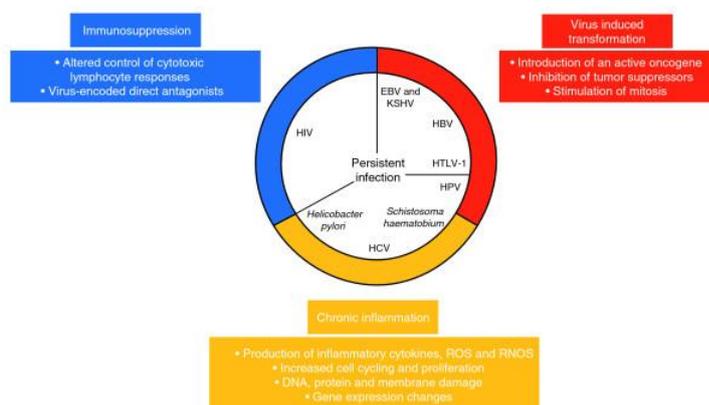


Figura 1. Mecanismos mediante los cuales los agentes infecciosos pueden contribuir a la transformación maligna. Estos pueden ser ampliamente divididos en: inflamación crónica, que impulsa los niveles anormales de proliferación celular (amarillo); la transformación directa de las células infectadas inducida por virus, dando lugar a una supervivencia celular aumentada (rojo); y la inmunosupresión, que permite al patógeno evadir el sistema inmune y persistir (azul) (Tomada de Dalton-Griffin y Kellam, 2009).

IV. ii Virus oncogénicos

Hasta ahora, son varios los virus relacionados de forma consistente con diferentes tipos de cáncer humano (Morales-Sánchez y Fuentes-Pananá, 2014). Los cánceres humanos asociados con la infección viral se resumen en la Tabla 1.

Human Virus	Associated Tumors
EBV	Burkitt's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, immunosuppression-related lymphoma, T and NK cell lymphomas; nasopharyngeal and stomach carcinomas.
KSHV	Primary effusion lymphoma and Kaposi sarcoma
High-risk HPV's	Cervical, head and neck and anogenital tract carcinomas
MCPV	Merkel cell carcinoma
HBV	Hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatocellular carcinoma
HTLV1	Adult T-cell leukemia lymphoma

Tabla 1. Virus humanos y su asociación con cáncer (Tomado de Morales-Sánchez y Fuentes-Pananá, 2014).

El Virus del Papiloma humano (VPH) es uno de los agentes más comunes entre las enfermedades de transmisión sexual (ETS) y se ha observado que la infección persistente con ciertos tipos de VPH es necesaria para el desarrollo de distintos tipos de cáncer, siendo el cáncer cervicouterino (CaCu) el más frecuente (Bodily *et al.*, 2013). El CaCu es la segunda mayor causa de mortalidad femenina por cáncer en todo el mundo y según las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se registran aproximadamente 500.000 nuevos casos cada año, de los cuales 250.000 son decesos (Faridi *et al.*, 2011).

Hoy en día se tiene bien establecido al VPH como un importante carcinógeno humano causante no sólo del cáncer cervical, sino también de una sustancial proporción de otros cánceres anogenitales, así como de cabeza y cuello (zur Hausen, 2009).

IV. iii Virus del Papiloma humano (VPH)

El VPH es un virus pequeño con genoma de DNA perteneciente a la familia Papillomaviridae. Hasta ahora más de 170 tipos de VPH han sido identificados y divididos en cinco géneros: Alfa, Beta, Gamma, Nu y Mu. Dentro del género Alfa, 12 tipos se conocen como VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59) debido a su asociación con el desarrollo de cáncer (Bzhalava *et al.*, 2013). El VPH es un virus no envuelto que presenta una cápside de aproximadamente 55 nm de diámetro formada por 72 capsómeros compuestos de las proteínas estructurales L1 y L2 (Day y Schelhaas, 2014). El virus infecta células basales del epitelio escamoso a las cuales accede mediante micro-abrasiones, iniciando su ciclo productivo (Motoyama *et al.*, 2004). Modelos experimentales sugieren que el ingreso de las partículas virales requiere la interacción de éstas con los proteoglicanos de heparán sulfato presentes en la membrana de las células basales. Los cambios estructurales que sufre la cápside facilitan la transferencia de la partícula a un receptor secundario el cual es necesario para la internalización del virus. Una vez internalizado, el virus es sometido a transporte endosomal asegurando la entrada del DNA viral al núcleo (Doorbar *et al.*, 2012; Day y Schelhaas, 2014). El genoma del VPH es de DNA circular bicatenario de aproximadamente 8000 pares de bases y está dividido en tres regiones: una región larga de control (LCR), la cual no contiene marco de lectura alguno pero posee secuencias que regulan la expresión y replicación del genoma viral; una región temprana (E; *early*) que codifica para las proteínas tempranas encargadas de la transcripción y replicación viral (E1 a E8) y una región tardía (L; *late*) que codifica para las proteínas de la cápside (L1 y L2) (Doorbar *et al.*, 2015). Debido a su capacidad para inducir la proliferación e inmortalización celular, se ha determinado a las proteínas E6 y E7 como oncoproteínas virales (Woodman *et al.*, 2007).

- **Proteínas L1 y L2**

La proteína L1 de aproximadamente 55 kDa es la proteína mayoritaria de la cápside viral. Dado que L1 forma casi toda la superficie exterior del virus, su papel en la fijación inicial a los tejidos o células huésped es fundamental (Buck *et al.*, 2013). La proteína L2 de aproximadamente 50 kDa, juega un papel de gran importancia durante el montaje del virus (Wang y Roden, 2013). La proteína L2 se acumula en

estructuras nucleares conocidas como dominios oncogénicos de la proteína de leucemia pro-monocítica (PML) durante el ensamble del virus y atrae a L1 hacia estos dominios. Se ha sugerido que estos cuerpos PML son el sitio de la replicación del DNA viral y que las proteínas de la cápside se acumulan en este sitio para facilitar el empaquetamiento (López y Lizano, 2006).

- **Proteína E1**

La proteína E1 varía en tamaño, de 600 a 650 aminoácidos dependiendo del tipo de VPH. Esta proteína presenta función de helicasa dependiente de ATP, siendo la única proteína con actividad enzimática y una de las más conservadas dentro de las proteínas codificadas por el VPH. Este alto grado de conservación refleja el rol esencial que presenta E1 en el ciclo de vida viral, específicamente como la helicasa que dirige la fiel replicación del episoma viral en el núcleo de los queratinocitos infectados. Para que este proceso se lleve a cabo, E1 debe reconocer un segmento específico del genoma viral conocido como "origen de replicación" u "ori" formando un complejo di-hexamérico e interactuar con diferentes proteínas necesarias para el ensamble del replisoma (Bergvall *et al.*, 2013).

- **Proteína E2**

E2, de aproximadamente 1100 pb y de 45 kDa, es una proteína de unión a DNA que se une a secuencias específicas alrededor del origen de replicación viral y recluta a la helicasa E1 para promover la replicación del genoma viral. Además de su papel en el inicio de la replicación viral, la proteína E2 regula la transcripción de E6 y E7 mediante impedimento estérico al posicionarse sobre la secuencia promotora de estos genes. En la mayoría de las circunstancias, E2 reprime a este promotor y, por tanto, controla los niveles de proteína E6 y E7 presentes en la célula (King *et al.*, 2010).

- **Proteína E4**

La proteína E4 es de aproximadamente 260 pb, presenta un peso molecular de 10 a 44 kDa. Históricamente, E4 se clasificó como un gen viral temprano debido a que su marco abierto de lectura (ORF) se encuentra en la región temprana del genoma viral entre los genes virales que regulan la entrada en el ciclo celular y el mantenimiento del genoma. Sin embargo, la función precisa de E4 durante las primeras etapas del

ciclo de vida del virus no ha sido totalmente descrita. Se sabe que E4 causa el colapso de los filamentos intermedios de queratina y esto se ha relacionado con la liberación de los viriones durante las etapas tardías del ciclo viral (Doorbar, 2013).

- **Proteína E5**

El gen E5 de aproximadamente 250 pb, codifica para una proteína de 90 aminoácidos con un peso molecular de 14 kDa. Esta proteína es rica en aminoácidos hidrófobos agrupados en uno o más dominios transmembranales. La proteína E5 no posee actividad enzimática intrínseca sino que actúa modulando la actividad de una variedad de proteínas celulares (DiMaio y Petti, 2013). Se ha reportado que E5 puede unirse a la ATPasa vacuolar resultando en una modificación del pH endosomal lo que resulta en una alteración en el reciclaje de diferentes receptores como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Otras actividades atribuidas a E5 incluyen la reducción de los niveles superficiales del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I, la modulación de la vía de las MAP cinasas (MAPK) y la alteración de los niveles de caveolina 1 (Moody y Laimins, 2010).

- **Proteína E7**

Debido a que los virus no codifican sus propios factores de replicación de DNA, diferentes proteínas de síntesis de DNA celular son necesarias para la replicación viral. Sin embargo, se produce un arresto del ciclo celular de los queratinocitos tras su diferenciación y estos factores celulares dejan de estar disponibles para el virus. Para evitar este problema, el VPH provoca el reingreso de la célula al ciclo, permitiendo así la replicación del DNA en células que de otro modo no sería permisivo. La proteína viral responsable de impulsar el ciclo celular y mantener la capacidad de replicación en las células en diferenciación es E7. El gen E7, de aproximadamente 300 a 320 pb, codifica para una proteína de aproximadamente 100 aminoácidos con un peso molecular de 10 kDa. La principal actividad de E7 es la de unirse e inactivar a miembros de la familia pRb, resultando en la liberación de los factores de transcripción E2F para promover la expresión de genes que producen la entrada a la fase S del ciclo celular, tales como ciclina E y A (Bodily *et al.*, 2013).

- **Proteína E6**

La oncoproteína E6 consiste en una proteína de aproximadamente 158 residuos de aminoácidos que posee la capacidad de formar dos dedos de zinc. Las oncoproteínas E6 de los VPH de alto riesgo interactúan con la proteína asociada a E6 (E6AP) la cual es una ubiquitina ligasa de tipo E3, permitiendo el reconocimiento de p53 y subsecuente ubiquitinación, lo cual induce su degradación mediante el sistema de proteasoma 26S (Martínez-Zapien, 2016). Aunque la pérdida de p53 inducida por E6 de los VPH de alto riesgo es un elemento importante de la transformación celular inducida por virus, estudios recientes han identificado una serie de blancos celulares adicionales de E6 que desempeñan un papel importante en el establecimiento de la carcinogénesis viral. Entre los blancos generales de la oncoproteína E6 del VPH se han incluido los siguientes: proteínas implicadas en la regulación de la transcripción y replicación del ADN, tales como p300 / CBP, GPS2, IRF-3, hMcm7, E6TP1 y ADA3; proteínas implicadas en la apoptosis y evasión inmune, tales como BAK, receptor 1 de TNF (TNF R1), FADD y c-Myc; proteínas implicadas en la organización y diferenciación epitelial, tales como paxilina, E6BP/ERC-55, zyxina y fibulina-1; proteínas que participan en la adhesión celular, control de polaridad y proliferación, que contienen un motivo de unión a PDZ como hDLG, hScrib, PKN, MAGI-1, MAGI-2, MAGI-3 o MUPP1; y proteínas implicadas en la reparación del ADN, tales como XRCC1 y 6-O-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) (Yim y Park, 2005).

IV. iv Mecanismo oncogénico del VPH

El mantenimiento de la célula en un estado de síntesis es clave para el ciclo replicativo del VPH, es por ello que el virus produce una serie de modificaciones en la célula que finalmente inducen el proceso carcinogénico (Moody y Laimins, 2010). La inestabilidad genómica generada por las oncoproteínas del VPH es una parte esencial en la transformación celular. La oncoproteína E6 estimula la degradación de la proteína supresora de tumores p53, perturbando así el control del ciclo celular y llevando finalmente a la inhibición de la apoptosis. E6 estimula también la expresión y la actividad de la telomerasa permitiendo la inmortalización de la célula. La oncoproteína E7 interrumpe la interacción entre pRb y E2F resultando en la

liberación de este factor y la transcripción de sus genes blanco, los cuales estimulan la replicación y la división celular (Narisawa-Saito y Kiyono, 2007).

Los VPH de alto riesgo pueden establecer una infección persistente a largo plazo en las células epiteliales, evitando con éxito el reconocimiento y eliminación por parte del sistema inmune. Las proteínas E6 y E7 pueden inhibir la señalización del interferón y de esta forma inhibir la inmunidad innata (Roman y Munger, 2013; Vande Pol y Klingelutz, 2013). Así mismo, la integración del genoma viral al genoma celular representa un evento clave en el desarrollo del cáncer inducido por VPH, ya que se promueve la sobre-expresión de los oncogenes virales E6 y E7, disparando el proceso carcinogénico (Doorbar *et al.*, 2012).

Aunque E6 y E7 proporcionan las principales actividades para la transformación celular por los VPH de alto riesgo, la proteína E5 contribuye también a la progresión tumoral debido a su contribución en la evasión del sistema inmune. La localización de E5 en el retículo endoplasmático sugiere que su actividad está relacionada con el tráfico de proteínas de la membrana citoplásmica a través de este compartimento celular (Moody y Laimins, 2010).

Otro efecto inducido por el VPH es la degradación de proteínas con dominios PDZ, estas proteínas funcionan como proteínas andamio de diversos complejos supramoleculares de la membrana y el citosol, los cuales son de gran importancia para la transducción de señales y el contacto célula-célula, y en cuyos fenómenos se encuentra ampliamente involucrado el citoesqueleto (Banks, *et al.*, 2012).

IV. v Microfilamentos de actina: regulación por Cofilina 1 (CFL-1)

El citoesqueleto es una estructura macromolecular con aspecto de red tridimensional que está compuesta por microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos de actina, cuyas funciones principales son proporcionar soporte a la célula, transporte intracelular, así como la capacidad de cambiar de forma durante el movimiento o la migración celular (Fletcher y Mullis, 2010).

La migración celular es necesaria para muchos procesos biológicos tales como la morfogénesis embrionaria, la vigilancia inmunológica, la reparación y regeneración de tejidos, entre muchos otros. La migración celular es un proceso de múltiples

pasos altamente integrados que se inicia por la protrusión de la membrana celular. Las estructuras protrusivas formadas por células migratorias e invasoras se denominan filopodios, lamelipodios e invadopodios/podosomas, dependiendo de sus características morfológicas, estructurales y funcionales. La formación de estas estructuras es impulsada por la polimerización de los microfilamentos de actina en el borde de la célula regulada tanto espacial como temporalmente (Yamaguchi y Condeelis, 2007).

De esta forma, los cambios en la polimerización de actina (conocidos como dinámica de actina) contribuyen en diversas funciones celulares como la motilidad celular, la morfogénesis, la división, la diferenciación, la apoptosis, la extensión neurítica y la oncogénesis (Bernard, 2007).

La dinámica de actina depende en gran parte de la familia de proteínas conocidas como Factores de Despolimerización de Actina (ADF)/cofilina. Los filamentos de actina crecen preferentemente en un extremo denominado extremo de crecimiento rápido (o extremo barbado) por asociación de moléculas de actina monoméricas (actina G) cargadas con ATP (ATP-G actina) y a su vez, monómeros son disociados en el otro extremo denominado extremo de crecimiento lento (o extremo en punta). Entre los factores ADF/cofilina, Cofilina 1 (CFL-1) ha sido la proteína reguladora predominantemente encontrada en tejido no muscular (Van *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2010), CFL-1 se une tanto a actina G como a actina F (actina filamentosa) y promueve su despolimerización. A su vez, CFL-1 es regulada mediante su fosforilación en el residuo serina-3 a través de la familia de proteínas cinasas que contienen el dominio Lin-11 / Isl-1 / Mec-3 (LIMK), específicamente LIMK1 (Bernard, 2007). Hasta ahora se ha encontrado que en diferentes tipos de cáncer, los niveles de expresión de las proteínas reguladoras de la dinámica de actina son anormales (Sahai, 2005). Además, LIMK1 presenta en su estructura un dominio PDZ (Edwards y Gill, 1999), lo cual la hace un potencial blanco de la oncoproteína E6 en los distintos tipos de cáncer asociados a VPH. La relación entre las oncoproteínas en los cánceres positivos a VPH y la expresión anormal de las proteínas reguladoras de la dinámica de actina, tales como CFL-1 y LIMK1 aún no ha sido del todo determinada.

V. ANTECEDENTES

Diversos estudios han demostrado que niveles de expresión anormales en las proteínas reguladoras de la dinámica de actina se encuentran asociados a una mayor capacidad de invasión en diversos tipos de cáncer, tal es el caso de la sobreexpresión de CFL-1 en el cáncer de próstata, encontrada por Lu y colaboradores en el año 2015, quienes demostraron que la sobreexpresión de esta proteína está asociada a un fenotipo más agresivo en esta neoplasia. También la sobreexpresión del regulador negativo de CFL-1, la proteína LIMK1, ha sido asociada a un alto potencial invasivo en distintos tipos de cáncer entre ellos el cáncer de ovario, encontrado por Chen y colaboradores en el 2014; LIMK1 también se ha encontrado altamente expresada en otros tipos de cánceres humanos (Wang *et al.*, 2006). De esta forma, se ha demostrado que durante el proceso carcinogénico la dinámica de actina juega un papel de gran importancia debido a que el desensamble de los filamentos de esta proteína es crucial para la migración de la célula durante la invasión y metástasis, proceso regulado por CFL-1 y LIMK1. Además, se sabe que la proteína LIMK1 posee un dominio PDZ (Edwards y Gill, 1999).

Se conoce bien, que la oncoproteína E6 regula una amplia gama de procesos celulares debido a su capacidad de reconocer e interactuar con diversas proteínas mediante el motivo LXXLL o los dominios PDZ algunas de las cuales se encuentran implicadas en la polaridad y adhesión celular (Yim y Park, 2005). E6 puede inducir la degradación mediada por ubiquitina, no sólo de p53, sino también aquellas que contienen múltiples dominios PDZ (Ganti *et al.*, 2015). Uno de los estudios base que ha demostrado la unión de la oncoproteína E6 del VPH de alto riesgo tipo 16 a una proteína con dominio PDZ implicada en la adhesión celular, es el realizado por Kiyono y colaboradores en 1997, en el cual se demostró la capacidad de E6 para unirse a la proteína supresora de tumores hDlg, sugiriendo que esta interacción podría ser un importante mecanismo en el desarrollo de cáncer asociado a VPH. En este sentido, otra proteína supresora de tumores y también implicada en la polaridad celular, hScrib, es degradada mediante ubiquitinación por el complejo E6-E6AP, de forma similar a la degradación de la proteína p53, indicando que hScrib se une

directamente a E6 y que la unión es mediada por el dominio PDZ de hScrib y el motivo carboxilo terminal de las oncoproteínas E6 de los VPH de alto riesgo, sugiriendo una gran importancia biológica para estas oncoproteínas virales (Nacagawa *et al.*, 2000). Debido a la capacidad de interacción de la oncoproteína E6 del VPH con proteínas con dominios PDZ, LIMK1 se convierte en uno de sus posibles blancos de interacción con implicaciones en la regulación de Cofilina1.

VI. JUSTIFICACIÓN

La infección persistente por los VPH de alto riesgo ha demostrado ser necesaria para el desarrollo de diversos tipos de cáncer. En el intento por conocer las diferentes estrategias por las cuales el VPH se ha convertido en uno de los agentes infecciosos causantes de cáncer más importantes a lo largo de todo el mundo, se han investigado ya una gran cantidad de mecanismos por los cuales este virus es capaz de regular diversas proteínas celulares favoreciendo el proceso carcinogénico, sin embargo, el papel del VPH sobre moléculas reguladoras de la dinámica del citoesqueleto de actina aún no es del todo claro. Por lo que el conocer el efecto de la oncoproteína E6 del VPH sobre CFL-1 y el posible mecanismo por el cual se lleva a cabo, ayudará en el entendimiento de nuevas interacciones y mecanismos implicados en el proceso carcinogénico inducido por este virus abriendo un abanico de posibilidades para futuras investigaciones.

VII. HIPÓTESIS

- La oncoproteína E6 del Virus del Papiloma humano tipo 18 (VPH18) regula a Cofilina 1 (CFL-1) mediante su interacción con LIMK1.

VIII. OBJETIVOS

VIII. i General

- Determinar el efecto de la oncoproteína E6 del VPH tipo 18 sobre la proteína CFL-1.

VIII. ii Particulares

1. Generar un sistema de expresión lentiviral para el gen E6 del VPH18.
2. Determinar el efecto de la oncoproteína E6 del VPH 18 sobre la fosforilación de CFL-1.
3. Evaluar la interacción de la oncoproteína E6 del VPH 18 con LIMK1, regulador de CFL-1.
4. Determinar el efecto de la oncoproteína E6 del VPH 18 sobre los niveles de LIMK1.

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción y purificación de DNA a partir de células HeLa

Se realizó la extracción de DNA mediante la técnica de extracción fenol-cloroformo a partir de células HeLa (positivas a VPH18). La cantidad obtenida se analizó mediante gel de agarosa y se obtuvo la concentración y pureza mediante espectrometría a 230 nm con el equipo NanoDrop. El material genético obtenido sirvió como templado para la amplificación del gen E6 mediante PCR estándar empleando iniciadores específicos.

Diseño de primers (iniciadores)

Se generaron *primers* específicos utilizando el programa *Pick Primers* (NCBI) que permitieron la amplificación del gen E6 del VPH 18, los *primers* cumplieron con las condiciones mínimas requeridas para cumplir con la amplificación del producto: Tm

entre 50-60 °C, temperatura de alineamiento superior a 60 °C, contenido de GC de 40-60%, longitud de 20-27 nucleótidos. Los *primers* diseñados contaron con secuencias de corte para las enzimas de restricción BamHI y EcoRI las cuales fueron empleadas para dirigir la clonación en el sitio múltiple de clonación del vector: pLVX-EF1-IRES-mCherry (Clontech).

Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó PCR estándar con diferentes temperaturas correspondientes al rango de 65 a 71 °C utilizando un termociclador Axygen Maxygen para la determinación de la temperatura óptima de alineamiento para la amplificación de E6 del VPH 18.

Amplificación del gen E6 del VPH 18 mediante PCR

Se realizó PCR de punto final utilizando la Taq Gold polimerasa (Applied Biosystems) para la amplificación de la secuencia de interés con los *primers* diseñados previamente. De manera general esta reacción incluyó un ciclo de desnaturalización, 30 ciclos de: desnaturalización, alineamiento y extensión, así como una extensión final. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa y buffer TBE (Tris-Boratos-EDTA) y se purificaron empleando el High pure PCR product purification kit (Roche), para ello se empleó agarosa de bajo punto de fusión. Las imágenes fueron obtenidas en transluminador de UV MultiDoc-It Digital Imaging System y analizadas mediante el Software de análisis de imagen Launch Doc It.

Clonación del gen E6 del VPH 18

Con el fin de contar con un sistema de expresión de la proteína E6 del VPH 18, se realizó la digestión doble del producto de PCR previamente purificado y del vector pLVX-EF1-IRES-mCherry (Clontech) utilizando las enzimas de restricción BamHI y EcoRI y posteriormente se purificaron con el High pure PCR product purification kit (Roche). Los fragmentos purificados fueron ligados al vector pLVX-EF1-IRES-mCherry (Clontech) empleando la DNA ligasa T4 (Invitrogen). Posteriormente, se

realizó la transformación de *Escherichia coli* cepa DH5 α para analizar la eficiencia de la ligación y seleccionar clonas para analizar la presencia del gen insertado. Bacterias *E. coli* DH5 α competentes fueron generadas utilizando soluciones de cloruro de calcio y transformadas con los plásmidos generados mediante choque térmico.

Selección de bacterias

Las bacterias transformantes fueron seleccionadas mediante su crecimiento en placas de agar LB (Luria Bertani) con ampicilina (50 μ g/mL concentración final) como antibiótico de selección. Se seleccionaron clonas transformantes y se realizó minipreparación para la obtención de suficiente cantidad de DNA utilizando el Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit. Se verificó la presencia del plásmido mediante amplificación del inserto por PCR, digestión doble con las enzimas de restricción antes mencionadas y electroforesis en geles de agarosa.

Para verificar la identidad de la secuencia clonada, el DNA obtenido de la minipreparación fue enviado a secuenciación al servicio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los resultados fueron analizados posteriormente mediante la plataforma del NCBI Blast.

Generación de vectores lentivirales

Con la finalidad de inducir la expresión de la proteína E6 del VPH 18, el plásmido *pLVX-EF1-IRES-mCherry-E6-VPH18*, fue co-transfectado con los plásmidos pPAX-2 y pMD2 en células empaquetadoras HEK-293T mediante la técnica de lipofección (Lipofectamina 2000, Invitrogen). 48 y 72 hrs postransfección se colectó el medio y las partículas virales fueron purificadas empleando polietilenglicol y analizadas bajo el microscopio electrónico de transmisión en la Unidad de Patología del Instituto Nacional de Cancerología.

Infección de células HaCat

Células HaCat (queratinocitos humanos inmortalizados) fueron infectadas con los vectores lentivirales producidos anteriormente para evaluar los efectos de E6 del VPH 18 sobre los niveles de expresión y localización de CFL-1 y su regulador negativo LIMK1. Seis días post-infección se realizó la cosecha de las células y se obtuvo un lisado celular empleando buffer RIPA.

Western blot

Cantidades iguales de proteína fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) para posteriormente transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. Para la detección de las proteínas se emplearon los anticuerpos anti-pCFL-1, anti-Dlg, anti-p53 (todos Santa Cruz), anti-LIMK1 (Cell signalling) y anti-GAPDH (Santa Cruz) el cual fue empleado como control de carga. Una vez incubados los anticuerpos antes mencionados se procedió a incubar las membranas con anticuerpos secundarios acoplados a HRP (peroxidasa de rábano). La señal fue revelada utilizando los reactivos Immobilon Western (Chemiluminiscent HRP Substrate Millipore) mediante autorradiografía.

La intensidad de las bandas fue cuantificada y graficada con el uso del programa Prism Graph Pad ver 6.0. Posteriormente se realizaron los correspondientes análisis para determinar el efecto de E6 sobre CFL-1 y el posible mecanismo por el cual está siendo regulada.

Ensayos de Pull down

Purificación de proteínas de fusión: La producción de proteínas de fusión GST-VPH18E6, GST-VPH16E6 y GST sola fue inducida en bacterias *E. coli* DH5 α que contienen los plásmidos GST-VPH18E6, GST-VPH16E6 y GST empleando IPTG (1mM) como agente inductor. Posteriormente las bacterias fueron centrifugadas y lisadas empleando PBS/1% tritón. La fracción soluble, que contiene las proteínas de fusión, se obtuvo mediante centrifugación y fue incubada con perlas de glutatión-agarosa (Sigma). Las perlas fueron lavadas tres veces con PBS/1% tritón y analizadas mediante corrimiento electroforético y tinción con azul de Comassie.

Generación del lisado celular: Células HaCat en confluencia del 75% (en caja T75) fueron lisadas utilizando el buffer E1A, adicionalmente se añadieron inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail, Sigma) (1:100), después de la lisis las proteínas solubles e insolubles fueron separadas mediante centrifugación. La porción correspondiente a las proteínas solubles fue incubada con cantidades equivalentes de perlas acopladas a las proteínas GST-VP18E6, GST-VP16E6 y GST en agitación a 4°C durante una noche. Después de la incubación se procedió a lavar las proteínas unidas con buffer E1A, finalizando con la adición de buffer de carga para su posterior análisis mediante Western blot siguiendo el procedimiento ya mencionado.

Silenciamiento del gen E6 en células HeLa

Células HeLa (derivadas de cáncer de cérvix positivas a VPH18) fueron transfectadas mediante la técnica de lipofección utilizando RNAiMax Transfection Reagent (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, con los siRNAs para luciferasa, E6 y E6/E7. Las células fueron incubadas durante 72 hrs, término al cual se obtuvo un lisado celular empleando buffer RIPA para el análisis de las proteínas mediante Western blot o bien, las células fueron fijadas y procesadas para el análisis de inmunofluorescencia.

Análisis de inmunofluorescencia

Células HeLa transfectadas con los siRNA's indicados fueron fijadas utilizando medio DMEM F12 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB) y 4% de paraformaldehído (PFA). Las células fueron permeabilizadas con PBS/0.1% tritón y se utilizó PBS como reactivo de lavado. Se emplearon los anticuerpos primarios anti-p53 y anti-LIMK1 y sus correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a los fluoróforos Alexa 488 (verde) y Alexa 555 (rojo), según el caso. Se utilizó faloidina para la observación del citoesqueleto y DAPI para teñir el núcleo celular. Las células fueron montadas y observadas al microscopio de fluorescencia EVOS FL (Thermo Fisher Scientific) bajo el objetivo 40X.

X. RESULTADOS

Amplificación de E6 del VPH18

Se obtuvo la amplificación del gen E6 del VPH18 mediante PCR utilizando DNA de células HeLa como templado. La figura 2 muestra el amplificado del gen E6 observado en electroforesis en gel de agarosa con su correspondiente control negativo el cual no incluyó DNA. Una vez verificado el producto de PCR se procedió a purificarlo y se sometió a digestión enzimática con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI (Invitrogen) para su posterior clonación en el vector pLVX-EF1-IRES-mCherry.

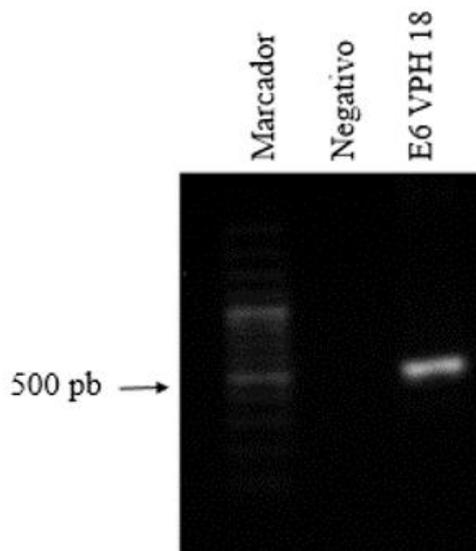


Figura 2. Amplificación de E6. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la amplificación del gen E6 del VPH 18 mediante PCR, a partir de DNA de células HeLa. El peso molecular del gen es de 474 pares de bases (pb).

Selección de clones

Se generaron clones transformantes las cuales fueron seleccionadas mediante crecimiento en placas de agar LB con ampicilina (fig. 3) de las cuales se extrajo DNA para analizar la presencia del inserto.

E6 VPH 18

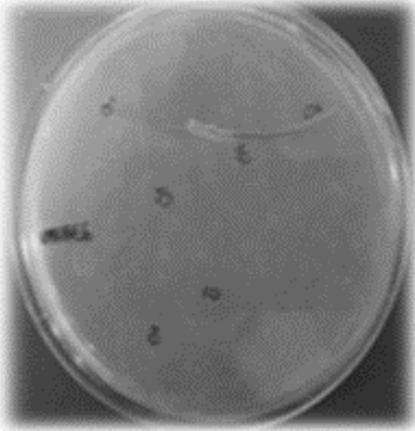


Figura 3. Crecimiento y selección de clonas transformantes. Bacterias transformadas fueron sembradas en agar LB con ampicilina como antibiótico de selección. Se aislaron y crecieron clonas transformantes para extraer DNA plasmídico y analizar la presencia del plásmido pLVX-EF1-IRES-mCherry-E6-VPH18 mediante PCR y doble digestión.

Digestión doble del DNA extraído de clonas transformantes

La presencia del inserto en las clonas seleccionadas se comprobó mediante la digestión doble del DNA extraído con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI (Invitrogen). En la figura 4 se observa una banda de aproximadamente 500 pb que corresponde a la secuencia de E6, como control negativo se empleó el plásmido pLVX-EF1-IRES-mCherry-E6-VPH18 sin digestión.

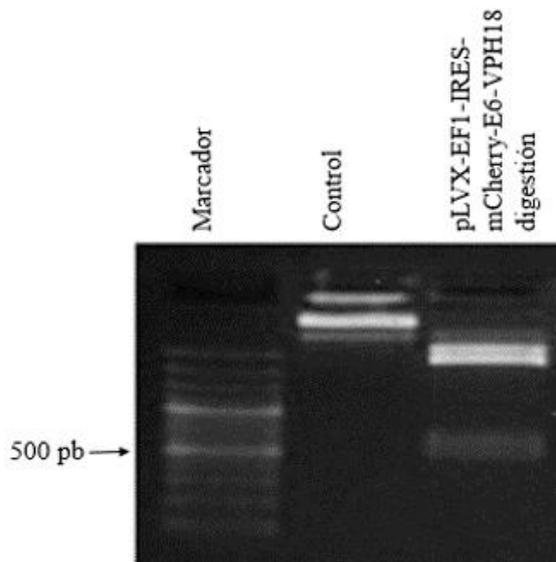


Figura 4. Presencia del inserto en clonas transformantes. Electroforesis en gel de agarosa que muestra el producto de la digestión doble del DNA extraído de clonas transformantes con pLVX-EF1-IRES-mCherry-E6-VPH18, el plásmido sin digestión fue utilizado como control negativo.

Análisis de secuenciación

Una vez comprobada la liberación del inserto se procedió a evaluar la secuencia del mismo para detectar posibles mutaciones. El análisis de la secuenciación se realizó en la plataforma NCBI Blast indicando una identidad del 99% de las secuencias clonadas correspondientes al gen E6 del VPH 18 (figura 5). La secuencia obtenida fue traducida y comparada con la referencia encontrando un 100% de homología.

Human papillomavirus type 18 strain 18CNTZ32 E6 (E6), E7 (E7), and L1 (L1) genes, complete cds
 Sequence ID: [gij1195489038|KY457836.1](#) Length: 2502 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 441		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
791 bits(876)	0.0	440/441(99%)	0/441(0%)	Plus/Minus	
Query	10	CTGTCGTGCTCGGTTGCAGCACGAATGGCACTGGCCTCTATAGTGCCCAGCTATGTTGTG			69
Sbjct	441	CTGTCGTGCTCGGTTGCAGCACGAATGGCACTGGCCTCTATAGTGCCCAGCTATGTTGTG			382
Query	70	AAATCGTCGTTTTTCATTAAGGTGTCTAAGTTTTCTGCCGGATTCAACGGTTTCTGGCA			129
Sbjct	381	AAATCGTCGTTTTTCATTAAGGTGTCTAAGTTTTCTGCTGGATTCAACGGTTTCTGGCA			322
Query	130	CCGCAGGCACCTTATTAATAAATTTGTATAACCCAGTGTAGTTAGTTTTCCAATGTGTC			189
Sbjct	321	CCGCAGGCACCTTATTAATAAATTTGTATAACCCAGTGTAGTTAGTTTTCCAATGTGTC			262
Query	190	TCCATACACAGAGTCTGAATAATGTCTTAATTCTCTAATTCTAGAATAAAAAATCTATACA			249
Sbjct	261	TCCATACACAGAGTCTGAATAATGTCTTAATTCTCTAATTCTAGAATAAAAAATCTATACA			202
Query	250	TTTATGGCATGCAGCATGCGGTATACTGTCTCTATACACCACAAATAAATCTTTAAATGC			309
Sbjct	201	TTTATGGCATGCAGCATGCGGTATACTGTCTCTATACACCACAAATAAATCTTTAAATGC			142
Query	310	AAATTCAAATACCTCTGTAAGTTCCAATACTGTCTTGCAATATACACAGGTTATTTCTAT			369
Sbjct	141	AAATTCAAATACCTCTGTAAGTTCCAATACTGTCTTGCAATATACACAGGTTATTTCTAT			82
Query	370	GTCTTGCAGTGAAGTGTTCAGTTCCGTGCACAGATCAGGTAGCTTGTAGGGTCGCCGTGT			429
Sbjct	81	GTCTTGCAGTGAAGTGTTCAGTTCCGTGCACAGATCAGGTAGCTTGTAGGGTCGCCGTGT			22
Query	430	TGGATCCTCAAAGCGGCCAT	450		
Sbjct	21	TGGATCCTCAAAGCGGCCAT	1		

Figura 5. Análisis de secuenciación. El análisis de secuenciación del DNA extraído de clonas transformantes mostró una identidad del 99% de la secuencia clonada con el gen E6 del VPH 18.

Análisis de partículas virales mediante microscopía electrónica

El plásmido pLVX-EF1-IRES-mCherry-E6-VP18 fue co-transfectado en células HEK-293T con el fin de obtener vectores lentivirales, los cuales fueron purificados y analizados bajo el microscopio electrónico de transmisión para verificar la

producción de estas partículas virales. Las imágenes obtenidas confirmaron la presencia de partículas virales en las muestras purificadas (figura 6).

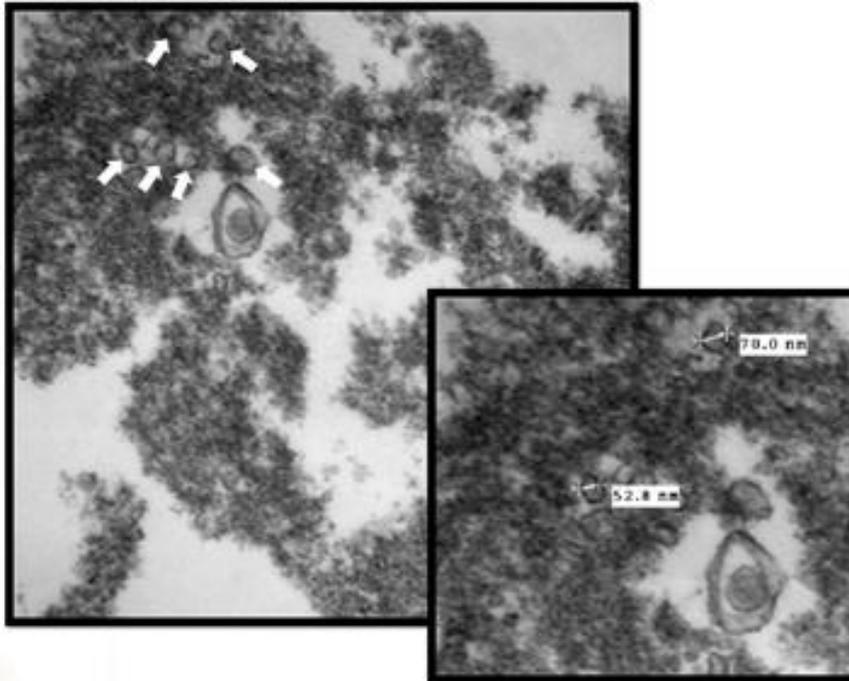


Figura 6. Vectores lentivirales. Fotografía obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión de las partículas virales. Los lentivirus generados presentan un diámetro de entre 50 y 100 nm.

La oncoproteína E6 de VPH18 incrementa los niveles de p-CFL-1

Queratinocitos inmortalizados fueron infectados con los vectores lentivirales producidos para evaluar el efecto de la oncoproteína E6 del VPH 18 sobre los niveles de expresión de blancos celulares conocidos y sobre la proteína CFL-1 en su estado fosforilado (p-CFL-1). Los ensayos de Western blot mostraron una disminución en los niveles de la proteína Dlg, así como un aumento en los niveles de p-CFL-1 (figura 7).

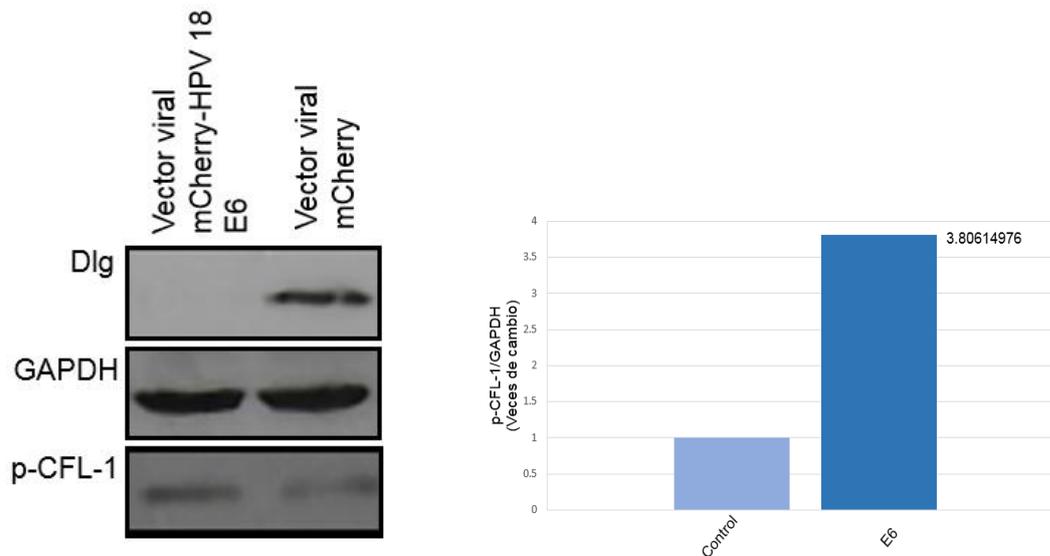


Figura 7. La expresión de E6 del VPH 18 produce un incremento en los niveles de p-CFL-1. Ensayos de Western blot a partir de células HaCat infectadas con vectores lentivirales. Se observa la disminución de los niveles de la proteína blanco de E6 del VPH 18: Dlg. Los niveles de p-CFL-1 fueron incrementados en presencia de E6. Se utilizó GAPDH como control de carga.

E6 de VPH 18 interactúa con LIMK1 *in vitro*

La oncoproteína E6 de los VPH de alto riesgo posee la capacidad de interactuar con diversas proteínas celulares regulando sus funciones. El regulador de la vía de CFL-1 en la polimerización del citoesqueleto de actina, LIMK1, posee un dominio PDZ por lo que nos preguntamos si E6 es capaz de interactuar con LIMK1 y de alguna manera regular el estado de fosforilación de CFL-1.

Para contestar a esta interrogante, se realizaron ensayos de interacción *in vitro* empleando proteínas E6 fusionadas a GST. Los ensayos de *Pull down* muestran la unión de E6 del VPH 16 y 18 a la proteína reguladora de CFL-1: LIMK1 (figura 8).

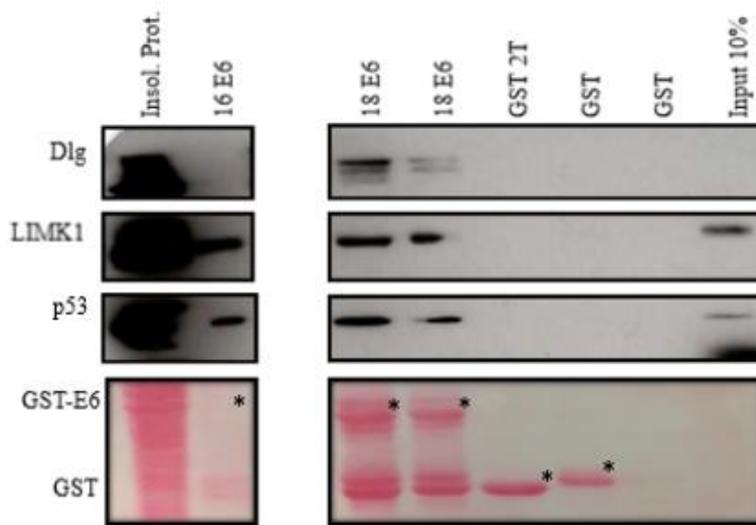


Figura 8. E6 interactúa con LIMK1. Proteínas E6 fusionadas a GST y GST sola, fueron incubadas con un lisado de la línea celular HaCat, después de varios lavados los complejos formados fueron analizados mediante western blot utilizando anticuerpos específicos. E6 de los VPH 16 y 18 fueron capaces de interactuar con LIMK1. P53 y Dlg fueron empleadas como control positivo de unión a E6. Se empleó GST como control negativo.

El silenciamiento del gen E6 en células HeLa permite la recuperación de LIMK1

Las células HeLa poseen integrado el genoma de VPH 18 y continuamente expresan los oncogenes E6 y E7. Mediante ensayos de silenciamiento usando siRNAs, se evaluaron los niveles de expresión de LIMK1 total mediante Western blot y análisis de inmunofluorescencia. El silenciamiento de luciferasa fue empleado como control negativo. Los resultados del Western blot en la figura 9, muestran un incremento en los niveles de LIMK1 al igual que en los niveles de p53 y Dlg (empleados como controles positivos) al ser silenciado E6. Debido a que la expresión de E6 está ligada a la expresión de E7 se empleó un siRNA que permitiera el abatimiento solo de E6 (Manzo-Merino *et al.*, 2014, Facciuto *et al.*, 2014). Los resultados fueron similares a aquellos observados cuando se silencia E6 y E7.

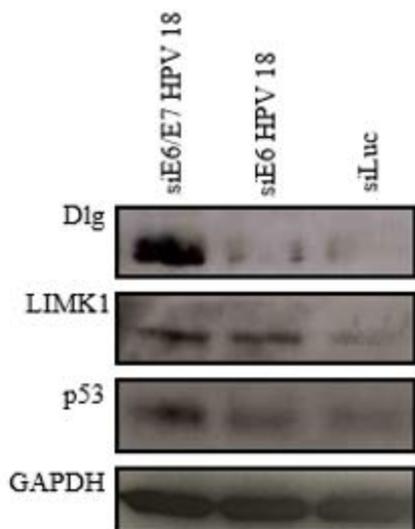


Figura 9. E6 modula los niveles de expresión de LIMK1. Ensayo de Western blot a partir de silenciamientos en células HeLa muestran un incremento en los niveles de p53 y Dlg (controles positivos) y LIMK1 al ser silenciado tanto E6 como E7, así como únicamente E6. El silenciamiento de luciferasa fue empleado como control negativo. Se utilizó GAPDH como control de carga.

El análisis de inmunofluorescencia (figura 10) muestra un incremento en los niveles de LIMK1 en la región nuclear de las células HeLa que exhiben señal para p53 (empleado como control). Los resultados en el silenciamiento de E6 fueron similares a los observados cuando se silencía E6 y E7.

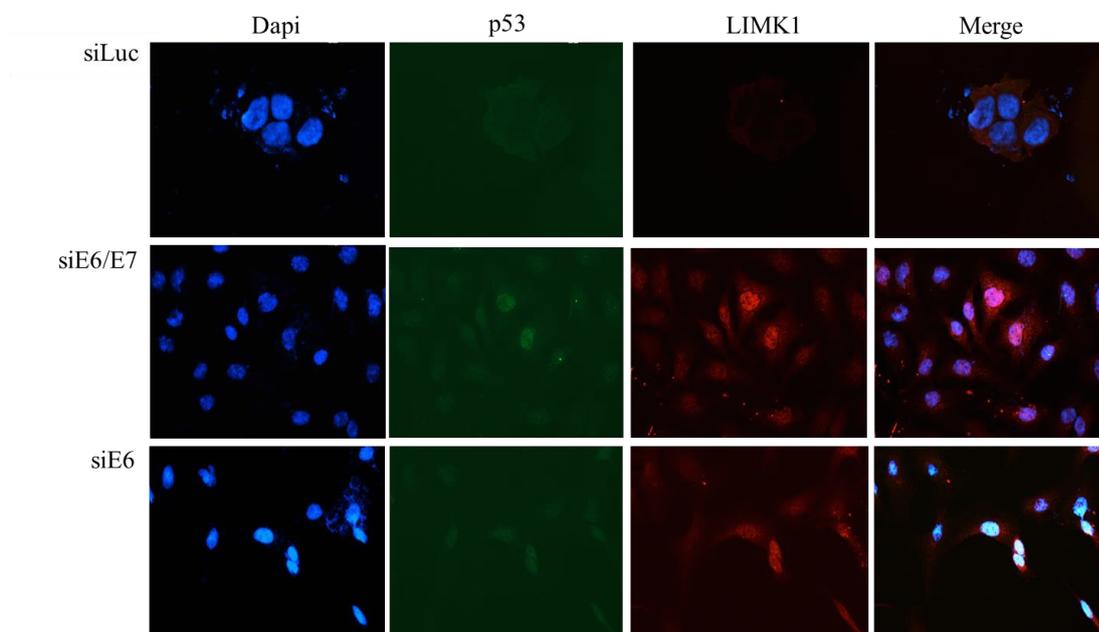


Figura 10. E6 favorece la translocación de LIMK1 al núcleo celular. Análisis de inmunofluorescencia a partir de silenciamientos en células HeLa muestran un incremento en los niveles de p53 (control) y LIMK1 en el núcleo celular al ser silenciado tanto E6 como E7, así como únicamente E6. El silenciamiento de luciferasa fue empleado como control negativo.

XI. DISCUSIÓN

Debido a las diferencias encontradas en la expresión de proteínas reguladoras de la dinámica de actina en diferentes tipos de cáncer y dado que no existía aún una relación entre las oncoproteínas del VPH, uno de los principales agentes infecciosos causantes de cáncer, y estas proteínas reguladoras, resultó de gran interés determinar el efecto inducido por la infección por VPH sobre una de las principales proteínas reguladoras de la dinámica de actina, CFL-1. Los resultados de este estudio muestran un incremento en los niveles de p-CFL-1 cuando se expresa la oncoproteína E6 en células HaCat, determinando así la participación de esta proteína en el incremento de la forma inactiva de CFL-1 e indicando, un efecto de la oncoproteína E6 en la regulación de la polimerización de los microfilamentos de actina. Diversos estudios sobre la expresión de los reguladores de la dinámica de actina en diferentes tipos de cáncer han mostrado un incremento en la forma fosforilada de CFL-1 debida a la sobreexpresión de la proteína cinasa LIMK1, siendo asociado a un fenotipo altamente agresivo debido al potencial invasivo que adquiere la célula al inducirse la polimerización de los monómeros de actina y generando la estabilización de los microfilamentos (Yoshioka *et al.*, 2003).

La inactivación de CFL-1 ha mostrado un aumento en el ancho de los microfilamentos de actina que dan lugar a la formación de lamelipodios, estructuras de protrusión importantes durante la migración celular, también se ha encontrado una reducción de los mismos en células con una alta actividad de CFL-1 (Ohashi *et al.*, 2011). De esta forma, el aumento en los niveles de fosforilación de CFL-1 puede ser uno de los principales factores involucrados en la capacidad de invasión y metástasis en diferentes tipos de cáncer asociados al VPH.

Por otra parte, debido a la presencia del dominio PDZ en la estructura de LIMK1, y a la capacidad de la oncoproteína E6 del VPH para interactuar con estos dominios, se cuestionó la existencia de una interacción entre la proteína cinasa LIMK1 y la oncoproteína viral. En este estudio se demostró que E6 del VPH tipo 16 y 18, son capaces de interactuar con LIMK1. La interacción de la oncoproteína E6 del VPH, específicamente de los tipos virales de alto riesgo 16 y 18, con proteínas con dominios PDZ ya ha sido demostrada (Kiyono, *et al.*, 1997; Nakagawa *et al.*, 2000). Se ha demostrado también que existen diferencias en la afinidad de la oncoproteína

E6 de diferentes tipos virales a diferentes proteínas aun existiendo un dominio PDZ en todas ellas (Kranjec y Banks, 2011). De esta forma, a pesar de demostrar una interacción entre la oncoproteína E6 del VPH16 así como del VPH18, con la proteína LIMK1, son necesarios más estudios para demostrar si existe alguna diferencia en la afinidad de la oncoproteína E6 de los dos tipos virales a LIMK1 y así poder explicar el papel específico de esta interacción en el potencial invasivo y metastásico de los cánceres asociados tanto al VPH16 como al VPH18.

La recuperación en los niveles de expresión de LIMK1 total, al ser silenciado el gen E6 en un modelo celular VPH18 positivo, hace suponer la degradación de la proteína LIMK1 por la oncoproteína E6. El mecanismo por el cual se encuentra mediada esta degradación no puede ser explicada hasta realizar ensayos específicos, dado que diversos estudios han demostrado diferencias sobre el mecanismo por el cual E6 puede reducir la expresión de proteínas con dominio PDZ, varios han encontrado dependencia de E6AP (Handa *et al.*, 2007) y otros, la degradación no dependiente de ubiquitina ni proteasoma (Grm y Banks, 2004).

Hasta ahora puede parecer contradictorio el hecho de encontrar un incremento en los niveles de p-CFL-1 al expresarse E6, aun cuando la proteína reguladora de dicha fosforilación, LIMK1, se encuentra disminuida; el mecanismo preciso por el cual la oncoproteína E6 se encuentra regulando a CFL-1 a través de la interacción con LIMK1 aún debe ser descrito de forma más detallada. Sin embargo, uno de los mecanismos que podemos proponer a partir de los resultados obtenidos, es que E6 puede producir la estabilización de LIMK1 de una forma similar a la proteína Hsp90. Hsp90 es una proteína chaperona que facilita la homodimerización de LIMK1 generando su transfosforilación y de este modo estabiliza y produce un incremento en su actividad (Li *et al.*, 2006). Además, se ha determinado que algunas proteínas con dominio PDZ que son reconocidas por E6 no son degradadas, sino que E6 es capaz de modular sus funciones en una forma dependiente del dominio PDZ (Ganti *et al.*, 2016). De esta forma LIMK1 puede generar en determinado momento, un incremento en los niveles de CFL-1 inactiva, para posteriormente ser degradada; sin embargo, más estudios son necesarios para precisar el mecanismo.

En este estudio no se demuestra un incremento en los niveles de expresión de LIMK1 en células de cáncer de cérvix en comparación con células normales, sin

embargo, se demuestra que el silenciamiento del gen E6 en células de cáncer de cérvix (HeLa) produce una recuperación en los niveles de LIMK1, específicamente en la zona nuclear, lo que nos hace suponer un rol específico de E6 sobre la regulación de LIMK1 en esta región. Varias preguntas se mantienen abiertas respecto a la capacidad de LIMK1 para promover la progresión del cáncer. A este respecto, una de las principales preguntas es si la localización subcelular (citoplasmática o nuclear) de LIMK1 afecta su habilidad para promover el fenotipo transformante. Se ha demostrado que en células de cáncer de mama, los niveles de LIMK1 incrementan tanto en el citoplasma como el núcleo, comparando con la expresión de esta proteína en células normales (McConnell, *et al.*, 2011). Conocer el papel específico de E6 sobre la regulación de LIMK1 tanto en el núcleo como en el citoplasma, además del momento específico en que se lleva a cabo dicho efecto puede ayudarnos a comprender no sólo nuevas implicaciones de la oncoproteína E6 en el proceso de invasión y metástasis en cánceres asociados al VPH, sino también nuevas interacciones que pueden encontrarse involucradas en otros procesos tales como la proliferación celular.

XII. CONCLUSIONES

- La oncoproteína E6 del VPH18 incrementa los niveles de p-CFL-1
- Las oncoproteínas E6 del VPH16 y 18 interactúan con LIMK1 *in vitro*
- La oncoproteína E6 del VPH18 modula los niveles de LIMK1 en células HeLa

XIII. FUTURAS DIRECCIONES

Ensayos sobre polaridad y migración celular son necesarios para determinar el efecto específico del incremento de los niveles de p-CFL-1 al expresarse la oncoproteína E6 del VPH, así como diversos ensayos para confirmar la interacción de E6 y LIMK1 a través del dominio PDZ. Ensayos de inhibición de proteasoma son también necesarios para confirmar la degradación de la proteína LIMK1.

XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Bergvall, M., Melendy, T. y Archambault, J. **2013**. The E1 proteins. *Virology*. 445: 35–56.
- Bernard, O. **2007**. Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol*. 39(6):1071–1076.
- Bodily, M. J., Hennigan, C., Wrobel, A. G. y Rodriguez, M. C. **2013**. Regulation of the human papillomavirus type 16 late promoter by E7 and the cell cycle. *Virology*. 443: 11–19.
- Buck, C., Day, P. y Trus, B. **2013**. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*. 445 (1-2): 169-174.
- Bzhalava, D., Guan, P., Franceschi, S., Dillner, J. y Clifford, G. **2013**. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology*. 445: 224-231.
- Chen, P. Mengjun, Z., Zhao, Y. y Fang, X. **2014**. Upregulation of Limk1 caused by microRNA-138 loss aggravates the metastasis of ovarian cancer by activation of Limk1/cofilin signaling. *Oncology reports*. 32: 2070-2076.
- Dalton-Griffin, L. y Kellam, P. **2009**. Infectious causes of cancer and their detection. *J. Biol.* 8 (7): 67.
- Day, P.M y Schelhaas, M. **2014**. Concepts of papillomavirus entry into host cells. *Current Opinion in Virology*. 4: 24-31.
- de Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D. y Plummer, M. **2012**. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol*. 7: 607-615.
- DiMaio, D. y Petty, L. **2013**. The E5 proteins. *Virology*. 445: 99-114
- Doorbar, J. **2013**. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*. 445: 80-98.
- Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C. y Murakami, I. **2015**. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol*. 25: 2–23
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, G. I., Stoler, M., Broker, R. T., y Stanley, A. M. **2012**. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*. 30S: F55– F70.

- Edwards, D. y Gill, G. **1999**. Structural features of LIM kinase that control effects on the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.*, 274: 11352–11361.
- Faridi, R., Zahra, A. Khan, K. e Idrees, M. **2011**. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Viol J.* 8:269.
- Facciuto, F., Bugnon, M., Marziali, F., Massimi, P., Banks, L., Cavatorta, A. y Gardiol, D. **2014**. Human papillomavirus (HPV)-18 E6 oncoprotein interferes with the epithelial cell polarity Par3 protein. *Mol Oncol.* 8(3):533-43.
- Ferlay, J., Shin, H., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. y Parkin, D. **2010**. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J Cancer.* 127: 2893–2917.
- Fletcher, D. y Mullins, D. **2010**. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature.* 463: 485-492.
- Ganti, K., Broniarczyk, J., Manoubi, W., Massimi, P., Mittal, S., Pim, D., Szalmas, A., Thatte, J., Thomas, M., Tomaic, V. y Banks, L. **2015**. The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to Malignancy. *Viruses.* 7: 3530-3551.
- Ganti, K., Massimi, P., Manzo-Merino, J., Tomaić, V., Pim, D., Playford, M., Lizano, M., Roberts, S., Kranjec, C., Doorbar, J. y Banks, L. **2016**. Interaction of the Human Papillomavirus E6 Oncoprotein with Sorting Nexin 27 Modulates Endocytic Cargo Transport Pathways. *PLoS Pathog.* 12(9): 1-22.
- Grm, H. y Banks, L. **2004**. Degradation of hDlg and MAGIs by human papillomavirus E6 is E6-AP-independent. *J.Gen Virol.* 85: 2815–2819.
- Handa, K., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Ohno, S., Fujita, M. y Kiyono, T. **2007**. E6AP-dependent Degradation of DLG4/PSD95 by High-Risk Human Papillomavirus Type 18 E6 Protein. *J. Virol.* 81: 1379–1389.
- King, E. L., Fisk, C. J., Dornan, S. E., Donaldson, M. M., Melendy, T. y Morgan, M. I. **2010**. Human papillomavirus E1 and E2 mediated DNA replication is not arrested by DNA damage signalling. *Virology.* 406: 95–102.
- Kiyono, T., Hiraiwa, A., Fujita, M., Hayashi, Y., Akiyama, T y Ishibashi, M. **1997**. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 11612–11616.

- Kranjec, C. y Banks, L. **2011**. A Systematic Analysis of Human Papillomavirus (HPV) E6 PDZ Substrates Identifies MAGI-1 as a Major Target of HPV Type 16 (HPV-16) and HPV-18 Whose Loss Accompanies Disruption of Tight Junctions. *Journal of Virology*. 85 (4): 1757-1764.
- Li, R., Soosairajah, J., Harari, D., Citri, A., Price, J., Ng, H., Morton, C., Parker, M., Yarden, Y. y Bernard, O. **2006**. Hsp90 increases LIM kinase activity by promoting its homo-dimerization. *FASEB J*. 20(8):1218-1220
- Lin, M., Galletta, B., Sept, D. y Cooper, J. **2010**. Overlapping and distinct functions for cofilin, coronin and Aip1 in actin dynamics in vivo. *J Cell Sci*. 123(8): 1329–1342.
- López, A. y Lizano, M. **2006**. Cáncer Cervicouterino y Virus del Papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*. 1: 31-55.
- Lu, L., Fu, N., Luo, X., Li, X., y Li, X. **2015**. Overexpression of cofilin 1 in prostate cancer and the corresponding clinical implications. *Oncology Letters*, 9: 2757-2761.
- Manzo-Merino, J., Miranda, T., Fuentes-Gonzalez, A. M., Lizano, M. y Banks, L. **2013**. HPV E6 oncoprotein as a potential therapeutic target in HPV related cancers. *Expert Opin. Ther. Targets*. 17(11): 1-12.
- Martinez-Zapien, D., Ruiz, F., Poirson, J., Mitschler, A., Ramirez, J., Forster, A., Cousido-Siah, A., Masson, M., Vande Pol, S., Podjarny, A., Travé, G. y Zanier, K. **2016**. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature*. 529: 541-545.
- McConnell, B., Koto, K. y Gutierrez-Hartmann. **2011**. Nuclear and cytoplasmic LIMK1 enhances human breast cancer progression. *Mol Cancer*. 10-75: 1-13
- Moody, C. y Laimns, L. **2010**. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews cancer*. 10: 550-560.
- Morales-Sánchez, A. y Fuentes-Pananá, E. **2014**. Human Viruses and Cancer. *Viruses*. 6: 4047- 4079.
- Motoyama, S., Ladines-Llave, C., Villanueva, S. y Maruo, T. **2004**. The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. *J. Med. Sci*. 50 (1): 9-19.

- Nakagawa, S. y Huibregtse, J. **2000**. Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol.* 20 (21):8244-8253.
- Narisawa-Saito, M. y Kiyono, T. **2007**. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 98 (10): 1505-1511.
- Pim, D., Bergant, M., Boon, S., Ganti, K., Kranjec, C., Massimi, P., Subbaiah, V., Thomas, M., Tomaic, V. y Banks, L. **2012**. Human papillomaviruses and the specificity of PDZ domain targeting. *FEBS Journal.* 279: 3530-3537.
- Roman, A. y Munger, K. **2013**. The papillomavirus E7 proteins. *Virology.* 445:138–168.
- Sahai, E. **2005**. Mechanisms of cancer cell invasion, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15: 87–96.
- Van, M., Huyck, L., Leyman, S., Dhaese, S., Vandekerkhove, J. y Ampe, C. **2008**. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *European Journal of Cell Biology* 87: 649–667.
- Vande Pol, S. y Klingelutz, A. **2013**. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology.* 445:115–137.
- Wang, W., Mouneimne, G., Sidani, M., Wyckoff, J., Chen, X., Makris, A., Gorwami, S., Bresnick, A. y Condeelis, J. **2006**. The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation and metastasis of mammary tumors. *J Cell Biol.* 173:395–404.
- Wang, J. y Roden, R. **2013**. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology.* 445 (1-2): 175-186.
- Woodman, C., Collins, S. y Young, L. **2007**. The natural history of cervical hpv infection: Unresolved issues. *Nat. Rev. Cancer.* 7: 11-22.
- Yamaguchi, H. y Coondelis, J. **2007**. *Biochimica et Biophysica Acta.* Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion.1773: 642-652.
- Yim, E. y Park, J. **2005**. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association.* 37 (6): 319-324.

- Yoshioka, K., Foletta, V., Bernard, O. e Itoh, K. **2003**. A role for LIMK in cancer invasion. PNAS. 12 (100): 7247-7252.
- zur Hausen, **2009**. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. Virology. 384: 260–265.

XV. ANEXOS

Anexo 1: Soluciones y medios de cultivo

1.1 Medio LB

Bacto-Triptona 10g
Extracto de levadura 5g
NaCl 10g
H₂O aforar a 1L

1.2 Agar LB con Ampicilina

Bacto-Triptona 10g
Extracto de levadura 5g
NaCl 10g
Agar bacteriológico 1.5% p/v
Ampicilina 100 µg/mL
H₂O destilada aforar a 1L

1.3 Geles de acrilamida al 12%

<i>Reactivo</i>	<i>Gel concentrador</i>	<i>Gel separador</i>
Acrilamida 30%/ N,N'-biscarilamida	400 µL	4 mL
Tris-HCl 1.5M pH 6.8	320 µL	- -
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	- -	2.8 mL
SDS 10% p/v	25 µL	100 µL
Persulfato de amonio 10%	25 µL	66 µL
N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)	2 µL	6 µL

1.4 Buffer de corrida 1x

Tris base 3.03 g
Glicina 14.42 g
SDS 1.0 g
H₂O destilada aforar a 1L

1.5 Buffer de transferencia

Tris-base 3.03 g
Glicina 14.42 g
SDS 1.0 g
Metanol 25%
H₂O destilada aforar a 1L

1.6 TBS-T 1x

Tris base 2.42 g
NaCl 8.0 g
Tween-20 1.0 %