



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL
PROCESAMIENTO A NIVEL CELULAR QUE
SUFRE LA PROTEÍNA E7 DE PAPILOMAVIRUS
HUMANO TIPO 16.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

HUMBERTO VALDOVINOS TORRES

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA DE LOURDES GUTIÉRREZ XICOTENCATL

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2008



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.

Agradezco cumplidamente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM; Institución de importancia relevante para el desarrollo de nuestro país y que siempre tiene sus puertas abiertas a todo aquel que quiera obtener más conocimiento.

Agradezco el apoyo económico concedido para la realización de este proyecto al Instituto Nacional de Salud Pública y al CONACYT-SEP (proyecto No 49574-24483-M)

Agradezco sinceramente a mi Comité Tutoral, constituido por el Dr. Luis Padilla Noriega, † Dra. Angelina Quintero Ruiz y Dra. María de Lourdes Mora García, por todas sus observaciones y sugerencias durante los Tutorales, que fueron siempre oportunas y que contribuyeron enormemente en mi formación y en la realización de este trabajo.

Agradezco sinceramente:

A la Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl, por todo su apoyo y por haberme aceptado como su estudiante de Doctorado.

Al Jurado de examen por su amable atención y sus acertados comentarios.

A la Secretario Técnico del Posgrado en Ciencias Biológicas Lic. Lilia Espinoza y personal de servicios escolares (Juan José, Ernesto y Erika) por todo el apoyo y orientación que me brindaron durante la realización de mis trámites durante todo el tiempo que estuve en el Posgrado.

A mi esposa, por su comprensión y apoyo en los tiempos más difíciles.

A mis hijos, por haberme dado el tiempo que era de ellos.

A mis padres, Nicolás Valdovinos Salazar y Luisa Torres Hernández, por haberme enseñado que las cosas se disfrutan más cuando se consiguen con trabajo y honestidad.

A mis compañeros del laboratorio: Adolfo, Minerva, Tanya y Ana María, por su compañía y amistad en aquellos días de trabajo a veces muy agobiantes y estresantes.

Al M en C Ángel T. Tello, por su amistad y sus consejos sobre las técnicas de electroforesis.

A mis profesores del Posgrado, y a todos aquellos que de alguna manera contribuyeron para poder culminar toda esta tarea (que no fue nada fácil) iniciada en enero del año 2002.

Índice

	<i>Página</i>
Resumen _____	5
Summary _____	7
I.- Antecedentes _____	9
1. Epidemiología _____	9
2. Tipos de HPV _____	10
3. Factores de riesgo asociados al desarrollo del cáncer	
Cérvico-uterino _____	12
4. Biología del cáncer _____	14
5. Estructura y función de las proteínas de HPV _____	15
5.1 <i>Región larga de control (LCR)</i> _____	16
5.2 <i>Genes de expresión temprana</i> _____	17
5.3 <i>Genes de Expresión tardía</i> _____	26
II. Justificación _____	28
III. Hipótesis _____	31
IV. Objetivos _____	32
1. Objetivo general _____	32
2. Objetivos particulares _____	32
V. Metodología _____	33
1. Cultivos celulares _____	33
2. Preparación de células competentes y transformación de bacterias	
con el plásmido CII-E7 y pCO5-CII-E7 _____	33
3. Expresión y purificación de la proteína recombinante CII-E7 y	
MS2-E7 _____	34
4. Producción de anticuerpos policlonales anti-E7 _____	35
5. Producción de anticuerpos monoclonales anti-E7 _____	36
5.1 Generación de hibridomas _____	37

5.2 Expansión y clonación de los hibridomas positivos para anticuerpos anti-E7 _____	38
5.3 Producción de los anticuerpos monoclonales anti-E7 de HPV-16 _____	38
5.4 Obtención de líquido de ascitis _____	39
5.5 Purificación de anticuerpos por columna de proteína G _____	39
5.6 Otros anticuerpos _____	40
6.- Técnica de ELISA _____	40
7.- Detección de E7 por inmunoprecipitación _____	41
8 - Ensayo de Western blot _____	43
9.- Ensayo de pulso y caza _____	43
10.- Técnica de isoelectroenfoque y gel 2D _____	44
11.- Marcaje de proteínas de síntesis <i>de novo</i> con ortofosfato [³² P] _____	45
12.- Inmunofluorescencia de E7 en células _____	46
13.- Transfección transitoria de células Cos-7 con E7 de HPV-16 _____	46
VI. Resultados _____	48
1.- Obtención de clonas que sintetizan la proteína E7 recombinante ___	48
2.- Producción a gran escala de la proteína E7 de HPV 16 recombinante _____	49
3.- Inmunoprecipitación de E7 de HPV 16 con diferentes anticuerpos anti-E7 _____	50
4.- Identificación de las isoformas de E7 mediante Western blot _____	51
5.- Procesamiento de la proteína E7 de HPV 16 en el contexto celular _____	53
6.- Identificación de isoformas de E7 fosforiladas _____	55
7.- Características físicoquímicas de las isoformas de E7 _____	56
8.- Detección de la distribución de E7 por inmunofluorescencia _____	58
9.- Determinación de la cinética de expresión de E7 en células Cos-E7 transfectadas con pcDNA-E7 _____	63

VII. Discusión _____	67
VIII. Conclusiones _____	74
IX. Perspectivas que se derivan a partir de éste trabajo _____	76
X. Bibliografía _____	79
Anexo 1 (Artículo publicado) _____	90

Palabras clave: Isoformas E7 HPV-16

Resumen

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es una enfermedad muy común entre la población femenina de países subdesarrollados. Esta enfermedad se asocia con la infección del virus del papiloma humano (HPV), ya que aproximadamente el 99 % de los tumores analizados presentan secuencias de DNA de estos tipos de virus. Se conocen alrededor de 200 tipos de HPV, entre los cuales los tipos 16 y 18 de alto riesgo son los más comunes en lesiones malignas. La proteína E7 es la principal proteína oncogénica viral que se localiza en núcleo y/o citoplasma, y de acuerdo a su secuencia de aminoácidos posee un peso molecular de 11 kDa, sin embargo, diferentes reportes mencionan que su movilidad electroforética varía entre 14 y 21 kDa. Este comportamiento electroforético anómalo se le atribuye a la característica ácida de sus aminoácidos y a la fosforilación de sus residuos 31 y 32 por la casein cinasa II (CKII). En cuanto a su actividad E7 induce la proliferación celular cuando interactúa con diferentes proteínas que regulan el control del ciclo celular (pRb, p107, p130) o con proteínas del factor transcripcional AP-1 (C-Jun, Jun B, Jun-D y C-fos), entre otras. E7 es una proteína oncogénica importante, de la cual no se sabe con certeza su peso molecular, cuales son las características bioquímicas que le permiten interactuar con diversas proteínas y de qué depende que permanezca en uno o ambos compartimientos subcelulares. De acuerdo a lo anterior, es posible que la proteína E7 sufra alguna modificación postraduccional (diferentes de la fosforilación) que le confiera cambios en su peso molecular y le permitan localizarse en diferentes compartimientos celulares e interactuar con diversas proteínas. Por lo que, el objetivo de nuestro trabajo fue identificar la presencia de isoformas de E7 de HPV-16 en células CaSki durante su procesamiento celular. Para ello, se utilizaron diferentes anticuerpos anti-E7 policlonales y monoclonales con diversas técnicas de detección. Los resultados mostraron que E7 es sintetizada como una proteína de 17 kDa y después es procesada a otra banda de 16 kDa. Sin embargo, las muestras inmunoprecipitadas y separadas en geles-2D mostraron la existencia de tres posibles isoformas de E7 con un peso

molecular de 16, 17 y 17.5 kDa con punto isoeléctrico (pI) de 6.96, 6.18 y 4.68, respectivamente, y solo la de 17.5 kDa se encuentra fosforilada. Los ensayos de inmunofluorescencia en células CaSki mostraron que además de la localización nuclear, la proteína E7 se encontró en retículo endoplásmico (RE) y Golgi. Todo este conjunto de resultados sugieren que durante el tránsito de la proteína E7 por RE y Golgi puede sufrir alguna modificación postraducciona que cambie su peso molecular y su pI. Estas modificaciones también pueden propiciar un cambio conformacional que permita la exposición de diferentes epitopos que pueden ser reconocidos por diferentes anticuerpos, motivo por el cual los anticuerpos reconocen una u otra isoforma de E7. Por lo que la presencia de epitopos distintos (como resultado de alguna modificación postraducciona) en E7 se asocian con una distribución en diferente compartimiento subcelular, con diferentes pesos moleculares y posiblemente con una función diferente pero asociada de manera importante al desarrollo del cáncer cérvico-uterino.

Summary

Cervical cancer (CC) is a very common disease between female populations from developing countries. This disease is associated to human papillomavirus (HPV) infection, since approximately 99% of the analyzed tumors present HPV DNA sequences. Around 200 types of HPV have been identified, among which, the high risk types 16 and 18 are the most common in malignant lesions. The E7 protein is the main viral oncogenic protein localizes in nucleus and/or cytoplasm with an apparent molecular weight of 11 kDa, according to its amino acids sequence. However, different groups have reported different molecular weight that varies from 14 to 21 kDa based on its electrophoretic mobility. This anomalous electrophoretic behavior is attributed to the acidic properties of some of its amino acid residues and to the phosphorylation of residues 31 and 32 carried out by casein kinase II (CKII). Regarding to the E7 activity, this protein induces cellular proliferation when interacts with proteins that regulate cell cycle (pRb, p107, p130), or with proteins of the transcripcional factor AP-1 (C-Jun, Jun B, Jun-D and C-Fos) among others. The E7 is an important oncogenic protein, from which it is not clear why different molecular weights are observed, and which biochemical characteristics are important for E7 to remain in one or two subcellular compartments to be able to interact with diverse proteins. According with this, it is possible that the E7 protein undergoes a posttranslational modification (different from phosphorylation) that confers changes in the molecular weight and allows it to be located in different cellular compartments and to interact with different proteins. Therefore, the aim of our research was to identify the presence of E7 protein isoforms from HPV-16 in CaSki cells during cellular processing. To achieve this, different monoclonal and polyclonal anti-E7 antibodies were used in different protein detection methodologies. The results showed that E7 is synthesized as a protein of 17 kDa and later is processed to another band of 16 kDa. However, when E7 protein was immunoprecipitated from cell lysates and separated in 2D-gels, the results showed the presence of three E7 bands with molecular weights of 16, 17 and 17,5 kDa

and iso-electric point (pI) of 6.96, 6.18 and 4.68, respectively. It was also observed that only the 17.5 kDa isoform was phosphorylated. The immunofluorescence assays performed in CaSki cells showed that besides the nuclear localization of E7, this was also identified in endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus. Taking together these results suggest that E7 protein can undergo a posttranslational modification during the transit through ER and Golgi that changes its molecular weight and its pI. These modifications also can cause a conformational change that allows the exhibition of different epitopes that can be recognized by different antibodies, reason why they recognize different isoforms of E7. Finally, the presences of different epitopes in E7 (as a result of posttranslational modifications) is associated with a distribution in different subcellular compartments, with different molecular weights and possibly associate with a different function, all of them important for the development of cervical cancer.

Antecedentes

1.1 Epidemiología

Durante los últimos 10 años la tasa de mortalidad en mujeres producida por el cáncer cérvico-uterino (CaCU) se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. Dicha enfermedad puede ser detectada y curable durante las primeras etapas de su desarrollo. Sin embargo, los métodos implementados para detectar y controlar a esta enfermedad no han sido suficientes, ni eficientes, por lo que el número de muertes en todo el mundo se ha incrementado considerablemente, siendo los países en vías de desarrollo los más afectados (Walboomers et al., 1999, Sankaranarayanan et al., 2001).

El CaCU se encuentra asociado a la presencia del virus del papiloma humano (HPV) y se le ha determinado como uno de los principales agentes causales de dicha enfermedad. En el año 2005 se estimaron 260, 000 muertes por cáncer cérvico-uterino en todo el mundo, de las cuales el 80 % correspondieron a los países en vías de desarrollo. Con base en estudios epidemiológicos (Tabla 1) se determinó que el HPV produjo el 99.7% de los casos de CaCU, el 40% de los cánceres en genitales externos (vulva, vagina y pene), al menos el 12% de cáncer orofaríngeo y el 3% de los casos de cáncer oral (WHO, 2007).

Durante la década pasada (1990-2000), en México se reportaron 48,761 defunciones a causa de esta enfermedad, lo cual da como resultado una muerte cada 12 horas. Por otra parte, el comportamiento observado en la incidencia a

nivel mundial también se muestra a nivel país, en donde se identifica la presencia de una mayor mortandad asociada a la pobreza de las zonas más marginadas, en donde el acceso a los servicios de salud es limitado, en comparación con áreas económicamente más desarrolladas (Palacios et al., 2003). Estos estudios demuestran en forma general, que la población de las zonas marginadas son las más vulnerables debido a que los servicios médicos son escasos o inexistentes.

Tabla 1. Número de casos de cáncer asociados a la infección por HPV durante 2002 en países desarrollados y subdesarrollados.

Sitio del cáncer	% de casos atribuibles a HPV	Países desarrollados		Países subdesarrollados	
		No total de casos de Cáncer	No de casos atribuibles a HPV	No total de casos de cáncer	No de casos atribuibles a HPV
Cérvix	100	83,400	83,400	409,400	409,400
Pene	40	5,200	2,100	21,100	8,400
Vulva, vagina	40	18,300	7,300	21,700	8,700
Ano	90	14,500	13,100	15,900	14,300
Boca	≥3	91,200	2,700	183,100	5,500
Orofaringe	≥12	24,400	2,900	27,700	3,300
Total		237,000	111,500	678,900	449,600

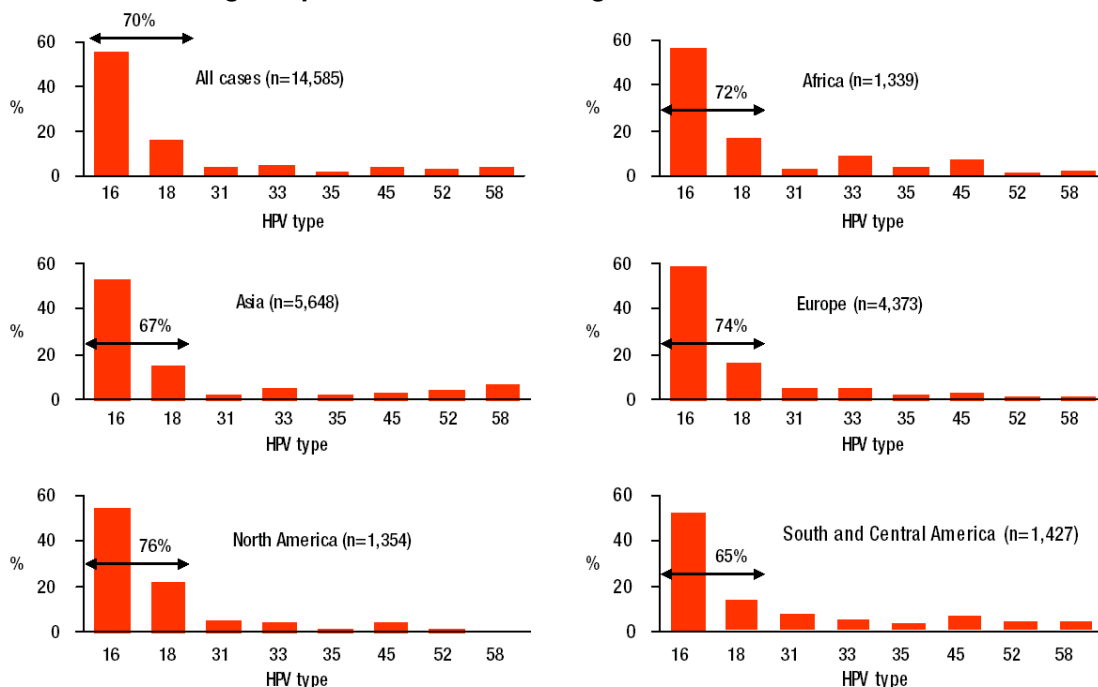
Tomado de Parkin & Bray (2006).

1.2 Tipos de HPV

En lo concerniente a la historia natural del cáncer, el virus entra al organismo a través de una pequeña lesión del tracto genital y en la mayoría de

las veces las infecciones son asintomáticas, pero en ocasiones aparecen lesiones que podrían avanzar a un proceso canceroso dependiendo del tipo viral presente. Los HPV infectan células de la mucosa o piel y en la actualidad se conocen más de 200 tipos virales que han sido enumerados de acuerdo a como han sido identificados, de los cuales más de 30 pueden producir cáncer. Los diferentes tipos de HPV se clasifican en dos grupos: de bajo riesgo, como los tipos 6 y 11 que son los más comunes en lesiones benignas, y de alto riesgo, como los tipos 16 y 18 que se encuentran en lesiones malignas. Recientemente se ha observado la presencia de otros 6 tipos de HPV de alto riesgo (31, 33, 35, 45, 52 y 58) que pueden producir individualmente un 5% del CaCU y se encuentran heterogéneamente distribuidos en todas partes del mundo (Fig. 1).

Figura 1. Distribución por región y porcentaje de casos con cáncer cervical atribuidos a los genotipos de HPV de alto riesgo.



Tomado de Smith et al., (2007).

Mundialmente los HPV's tipo 16 y 18 ocasionan el 70% del CaCU y en ocasiones se puede encontrar presente más de un tipo viral en una sola lesión. Las infecciones y pequeñas lesiones producidas por cualquiera de estos tipos virales pueden ser controladas y eliminadas por el organismo, pero la persistencia de la infección asociada a otros factores de riesgo (que a continuación se mencionan) pueden ocasionar la integración del DNA viral al genoma celular y el desarrollo de un proceso canceroso.

1.3 Factores de riesgo asociados al desarrollo del cáncer cérvico-uterino

Dentro de los factores que favorecen el desarrollo del cáncer se encuentran el inicio temprano de la actividad sexual, la depresión del sistema inmune, la edad temprana del primer parto, la multiparidad, el fumar tabaco, el uso prolongado de anticonceptivos y la coinfección con otros agentes infecciosos transmitidos sexualmente. Las infecciones por HPV pueden ser adquiridas por hombres y mujeres en algún momento en sus vidas y un pequeño porcentaje puede desarrollar cáncer.

Estos virus son altamente transmisibles y el riesgo de una infección se incrementa con el inicio de la actividad sexual. Aunque esta es una enfermedad de transmisión sexual, se ha demostrado que con el simple contacto piel con piel de los genitales (por ejemplo, pene-vulva), sin haber penetración, se puede transmitir este virus. Además, el número de parejas sexuales de una persona incrementa considerablemente el riesgo y la persistencia de la infección por un mayor periodo (Castellsagué y Muñoz 2003).

La infección puede ser controlada por el sistema inmune, sin embargo, si la respuesta inmune es ineficiente pueden presentarse lesiones precancerosas y cancerosas. Por tal motivo, los individuos inmunocomprometidos ya sea por el efecto de algún fármaco (por ejemplo, pacientes con transplante de órganos) o infectados por el virus del SIDA, entre otras causas, son más susceptibles a desarrollar esta enfermedad. Por otra parte, los cambios inmunológicos y fisiológicos que se presentan en el epitelio cervical durante el embarazo es un factor que incrementa el riesgo de contraer una infección por HPV y su progresión a CaCU (Armbruster et al., 2000).

Algunos estudios epidemiológicos demuestran que el uso de anti-conceptivos orales por más de 5 años se asocia significativamente a neoplasia cervical y puede incrementar cuatro veces más el desarrollo de cáncer invasivo y triplicar el carcinoma *in situ* (Castellsagué y Muñoz 2003). El efecto del tabaco ha sido muy bien analizado en diferentes estudios de casos y controles en donde se ha observado una asociación significativa con CaCU. Por otra parte, el hecho de haber detectado residuos carcinogénicos específicos del tabaco en el moco cervical de fumadoras refuerza más la hipótesis de una relación sinérgica entre fumar tabaco y el desarrollo de lesiones de alto grado en tejido intraepitelial escamoso y CaCU (Prokopczyk et al., 1997).

La presencia de HPV en tejido intraepitelial cervical es muy importante para el desarrollo de CaCU, sin embargo, el papel de otros agentes infecciosos transmitidos sexualmente tienen una participación muy importante. Diversos

estudios epidemiológicos señalan que una co-infección de HPV y *Chlamidya trachomatis* o virus herpes favorecen la presencia de lesiones en el epitelio cervical que pueden evolucionar a un cáncer cervical en comparación con mujeres con un solo tipo de infección (Chan et al., 2001, Wallin et al., 2002).

1.4 Biología del papilomavirus humano

El DNA de estos virus se divide en una región temprana, una región tardía y una región larga de control. La región temprana contiene los genes que codifican para las proteínas E1 y E2 que están implicadas en los procesos de regulación de la transcripción y replicación viral (Masterson et al., 1998, Bouvard et al., 1994), el gen *E4* que expresa una proteína involucrada en el proceso de transcripción y rompimiento del citoesqueleto celular para la liberación de las partículas virales (Doorbar et al., 1997), el gen *E5* cuyo producto incrementa la vida media del receptor al factor de crecimiento epidermal (EGF-R) para inducir el crecimiento celular (Pin et al., 1992), y los genes *E6* y *E7* que codifican para dos proteínas oncogénicas que interactúan con proteínas involucradas en el control de la replicación y transcripción del DNA celular. La región tardía codifica para las proteínas L1 y L2 que conforman la estructura de la cápside viral. La región larga de control (LCR) contiene el sitio de inicio de la transcripción y los elementos necesarios para la replicación viral (Meyers et al., 1992).

Durante la fase temprana de la infección se expresan todos los genes del virus para producir partículas virales infectivas llegando a producir pequeñas lesiones que al paso del tiempo desaparecen y la infección es eliminada por el

organismo. Durante las infecciones productivas los virus recién formados salen al espacio extracelular y se activa la respuesta humoral, lo cual se ha aprovechado para intentar desarrollar vacunas profilácticas para proteger al hospedero contra la infección del HPV. Estas vacunas se enfocan hacia la producción de anticuerpos secretorios IgA contra antígenos de la cápside viral (L1, L2) (Cosette 1997). Sin embargo, algunas infecciones no son eliminadas y bajo ciertas circunstancias aún no determinadas, el gen *E2* (que también actúa como un regulador negativo de la expresión de las proteínas E6 y E7) se rompe y el DNA viral se integra al genoma celular del hospedero, propiciando la sobreexpresión de estas proteínas e iniciando así el proceso de transformación celular y el desarrollo de una lesión que puede progresar a un cáncer invasivo (Baker et al., 1987, Schwars et al., 1985). En las infecciones no productivas como las neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado (NIC) y en el cáncer invasor, se producen solamente proteínas tempranas del virus, (y no proteínas tardías (L1, L2), de tal manera que al no expresarse las proteínas de la cápside en el espacio extracelular no hay una respuesta del sistema inmune humoral (Berumen et al., 1997).

1.5 Estructura y función de las proteínas de HPV

Los virus del papiloma tienen una cápside icosaédrica compuesta de 72 cápsomeros. El DNA es de doble cadena y consta de aproximadamente 8000 pares de bases; la información genética se encuentra codificada en una sola hebra y la transcripción se da en una sola dirección (Fig. 2). Como se mencionó

elementos de regulación comunes entre ellos y funcionalmente se divide en dos dominios principales, Re2 y CE. El dominio Re2, es regulado por la proteína viral E2 y contiene una caja TATA funcional para la replicación del DNA viral y un promotor temprano del cual se transcriben los genes *E6* y *E7*. El dominio CE contiene un potenciador de la transcripción (enhancer) (Gius et al., 1988), el cual se activa por factores transcripcionales de la célula (Chong et al., 1991).

1.5.2 Genes de expresión temprana

El gen *E1* posee el marco de lectura más grande del genoma viral y está relativamente bien conservado entre los diferentes papilomavirus, expresa una proteína de 600-650 aminoácidos con un peso molecular aparente de 68 a 85 kDa. La proteína E1 está involucrada en la replicación viral y tiene similitud con algunas regiones del antígeno T largo de SV40, el cual es esencial para la replicación de estos virus. E1 posee actividad de DNA-helicasa (Yang et al., 1991) y contiene una secuencia de aminoácidos (aa. 432-583) en la región C-terminal con la que se une a la proteína E2, dicha interacción propicia la unión de ambas proteínas al origen de replicación viral. Estudios *in vitro* demuestran que E1 interactúa con la proteína Ini-hSNF5, la cual es un componente del complejo SWI-SNF que facilita el proceso de transcripción y remodelación de la cromatina (Lee et al., 1999).

El gen *E2* de todos los papilomavirus codifica dos o más proteínas E2 como resultado de promotores alternativos, tiene un peso molecular aproximado de 43 a 48 kDa y es capaz de activar la transcripción a través de los elementos

de respuesta a E2 localizados en el genoma viral. Esta proteína contiene dos dominios relativamente conservados entre los papilomavirus, uno de ellos consta de una secuencia de unión al DNA y dimerización localizado en la región C-terminal, el otro dominio actúa como *trans*-activador y se localiza a la mitad de la región amino-terminal. La proteína E2 se une a los sitios adyacentes de la caja TATA del promotor *p97* de HPV-16 y *p105* de HPV-18 y reprime la expresión basal de los genes *E6* y *E7*, lo cual sucede cuando las partículas virales se están produciendo (Bouvard et al., 1994). Sin embargo, cuando el genoma viral se integra al DNA celular el gen *E2* puede perderse, propiciando un aumento en los niveles de expresión de las proteínas oncogénicas *E6* y *E7* (Jeon et al., 1995). Estudios sobre la proteína E2 de papiloma virus bovino (BPV) han demostrado que se puede fosforilar en los residuos de serina 298 y 301 (Lehman et al., 1997, McBride et al., 1989). La fosforilación de la serina 301 inhibe la replicación viral, sin embargo, cuando se muta por una alanina el virus se replica en mayor cantidad (Mcbride et al., 1991). Cuando estos aminoácidos se mutan simultáneamente con otro aminoácido de menor fosforilación (aa. 235) se bloquea el proceso de transformación (Lehman, et al., 1997). Estos sitios de fosforilación al parecer son clave en el funcionamiento de E2, sin embargo, estos sitios de fosforilación no se encuentran en proteínas E2 de otros papilomavirus. E2 de HPV-16 es una proteína que también es fosforilada aunque no se conoce exactamente en qué sitios (Sanders et al., 1995).

Por lo general, el gen *E4* no está altamente conservado entre los diferentes papilomavirus y su marco de lectura se encuentra sobrelapado en el

interior del gen *E1* y *E2*. Es una proteína pequeña de aproximadamente 100 aminoácidos y se distribuye en núcleo y citoplasma. Inicialmente su expresión se presenta en las capas diferenciadas del epitelio durante la replicación viral vegetativa y no coincide con la expresión de las proteínas de la cápside (Doorbar et al., 1997). La proteína *E4* se asocia a la queratina del citoesqueleto e induce el colapso de la red de citoqueratina, y se considera que esta actividad ayuda a las partículas virales a salir del interior de la célula (Doorbar et al., 1991). A nivel nuclear *E4* de HPV16 induce el arresto en G2, lo cual no es compatible con la proliferación celular, de tal manera que esta podría ser una causa por la que no se expresa en lesiones intraepiteliales de alto grado (Davy et al., 2002).

El marco de lectura del gen *E5* codifica para una proteína hidrofóbica de 83 aminoácidos que regularmente se encuentra en aparato de Golgi y en membrana plasmática (Yang et al., 2003). El marco de lectura para la proteína *E5* esta frecuentemente deletado en células de carcinoma cervical (Schwarz et al., 1985), esto indica la ausencia de un papel esencial de este gen en el mantenimiento del fenotipo maligno de las células. La oncoproteína *E5* está presente en las primeras etapas de la infección y puede cumplir una función en la expansión temprana de algunas células infectadas. La función de *E5* se estudió inicialmente en células infectadas con BPV y se encontró que forma complejos con el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF-R), con el receptor del factor de crecimiento β derivado de plaquetas (PDGF- β) y con el receptor del factor 1 estimulador de colonias (zur Hausen et al., 2000). *E5* también interactúa con la subunidad de 16 kDa de la ATPasa protónica

inhibiendo la acidificación de los endosomas y aumentando la vida media del EGF-R (Conrad et al., 1993; Straight et al., 1995). Por otra parte, la expresión transitoria de E5 de HPV-11 y 16 en células de ratón o queratinocitos de humano inmortalizados promueven la reducción en los niveles de p21^{cip1} e induce la expresión de c-Jun (Tsao et al., 1996).

El gen E6 se encuentra más o menos conservado entre los diferentes papilomavirus y codifica para una proteína de 151 aminoácidos. La proteína E6 se ha encontrado en membranas no nucleares y en la matriz nuclear. Estructuralmente cuenta con dos dedos de zinc debido a que contiene 4 motivos Cys-X-X-Cys, lo cual le permite unirse al DNA (Münger, et al., 2001). La proteína E6 se une a la proteína supresora de tumores p53 y ésta a su vez es degradada por la vía de ubiquitinación, evitando así la reparación del DNA y permitiendo que el ciclo celular prosiga a la fase S (Tommasino et al., 1995). Sin embargo, la degradación de p53 no es suficiente para la inmortalización (Crook et al., 1991), algunas mutaciones realizadas en E6 no impiden que se una a p53, pero si pierde su capacidad para conducirla a la degradación (Crook et al., 1991; Dalal et al., 1996). Trabajos más recientes demuestran que E6 es capaz de activar o reprimir varios promotores específicos virales independientemente de su unión a p53 (Kinoshita et al., 1997). E6 también puede *trans*-activar el promotor *c-myc*, lo cual podría prevenir la apoptosis y así asegurar el mantenimiento de la infección viral (Gross-Mesilaty et al., 1998). Además la presencia de E6 permite la integración de DNA extraño al genoma de la célula hospedera, lo cual puede contribuir también al proceso de transformación celular (Kesis et al., 1996).

La secuencia del oncogén *E7* se mantiene muy conservada entre los diferentes tipos de HPVs y codifica para una fosfoproteína de 98 aminoácidos. Sin embargo, a pesar de que se predice un peso molecular de 11 kDa, la proteína *E7* muestra una movilidad electroforética de entre 14-21 kDa (Smotkin y Wettstein, 1987; Gage et al., 1990; Sato et al., 1990; Grenfield et al., 1991; Kanda et al., 1991; Selbey et al., 1994). En algunos estudios se ha sugerido que este cambio electroforético puede deberse a la secuencia aminoacídica inmediata a la región amino-terminal (Armstrong et al., 1993, Mürnger et al., 1993). La proteína *E7* es muy similar entre los diferentes tipos de HPV y se pueden distinguir 3 regiones conservadas, denominadas CR1, CR2 y CR3 en homología con las proteínas E1A de Adenovirus y al antígeno T largo de SV40 (Barbosa et al., 1990) (Fig. 3).

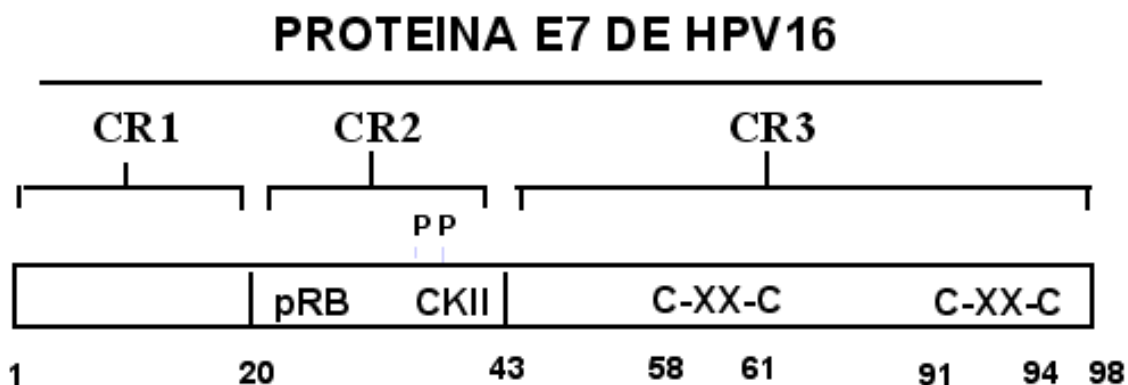


Figura 3. Estructura de la proteína *E7* y función de sus 3 regiones. Región CR1 (aa. 1-20); Importante en transformación celular y síntesis de DNA. Región CR2 (aa. 21-43); Sitio de unión a pRb (aa21-26), fosforilación por CKII en aa 31 y 32, unión al complejo E2F-ciclina A. Región CR3 (aa. 44-98); importante en la estabilidad de *E7*, sitio de unión a Zn, DNA, TBP y a los factores de transcripción de la familia AP1.

La porción amino-terminal de E7 contiene las regiones CR1 (aa. 1-20) y CR2 (aa. 21-40). Mutaciones y deleciones en dichas secuencias han demostrado ser críticas para las funciones de transformación celular, cooperación con el oncogén *ras* e inducción de síntesis de DNA. En relación a la región CR3 del carboxilo-terminal (aa. 41-98) existen dos motivos Cys-X-X-Cys, separados por 29 aminoácidos. Las proteínas E7 de HPV 16 y 18 se unen a Zn^{+2} mediante estos motivos, sin embargo, el dedo de zinc formado por esta proteína es diferente a los encontrados en otras proteínas que se unen a DNA ó RNA y que están involucradas en el control transcripcional. Estos motivos de cisteína tienen un papel estructural y funcional, siendo críticos para la estabilidad de la proteína *in vivo*. Así mismo, se ha observado que ambos motivos son necesarios para la formación de complejos oligoméricos, aunque también algunas secuencias de la región amino-terminal pueden contribuir a esta función (Clemmens et al., 1995).

La proteína E7 presenta en su región amino-terminal sitios de fosforilación por casein cinasa II (CKII) en al menos dos residuos de serina (aa 32/33 de HPV 16) (Smotkin et al., 1987) y se ha demostrado la importancia de esta modificación en la función de dicha proteína.

Las proteínas E7 de los HPVs de alto y bajo riesgo presentan diferencias en varias de sus propiedades bioquímicas y biológicas. Las proteínas E7 de HPVs de bajo riesgo se unen a pRb con menor afinidad y no transforman células eficientemente. En general, la actividad transformante de E7 se ve prácticamente limitada a las proteínas codificadas por los HPVs de alto riesgo. E7 es la

principal proteína oncogénica capaz de transformar células NIH-3T3 y fibroblastos de embrión de rata (Münger et al., 2001). Desde un punto de vista molecular, E7 interactúa con diferentes proteínas involucradas en el control del ciclo celular entre las que se encuentra la proteína pRb.

Al igual que la proteína E1A de adenovirus, E7 contiene un sitio LXCXE localizado en la región CR2 (aa. 21 al 26) que le permite unirse con alta afinidad a la proteína supresora de tumor (pRb) en la fase G1 y las proteínas de la “caja” p107 y p130 en las fase S y G0, respectivamente (Lee et al., 1998). En condiciones normales, la proteína pRb reprime al factor de transcripción E2F e inhibe el ciclo celular en la fase G1, sin embargo, la interacción de E7 con la proteína pRb deja libre al factor E2F lo que permite el avance del ciclo celular desde la fase G1 a la fase S. De manera muy similar E7 también interactúa con las proteínas p107 y p130, liberando a los distintos miembros de la familia E2F impidiendo el arresto del ciclo celular (Fiedler et al., 2006). Posteriormente, las proteínas pRb, p107 y p130 son marcados por E7 para su degradación a través de la vía del proteosoma (Boyer et al., 1996, González et al., 2001) (Fig. 4).

Contrariamente a lo que sucede con E7, la proteína E1A de adenovirus que también se asocia a pRb no induce su proteólisis, sino que le ocasiona modificaciones postraduccionales como la acetilación (Chan et al., 2001) y fosforilación (Wang et al., 1991; Kleinberger et al., 1991) para bloquear su interacción con E2F y otros factores celulares como las cinasas dependientes de ciclina (CDKs) (Mal et al., 1996; 2000).

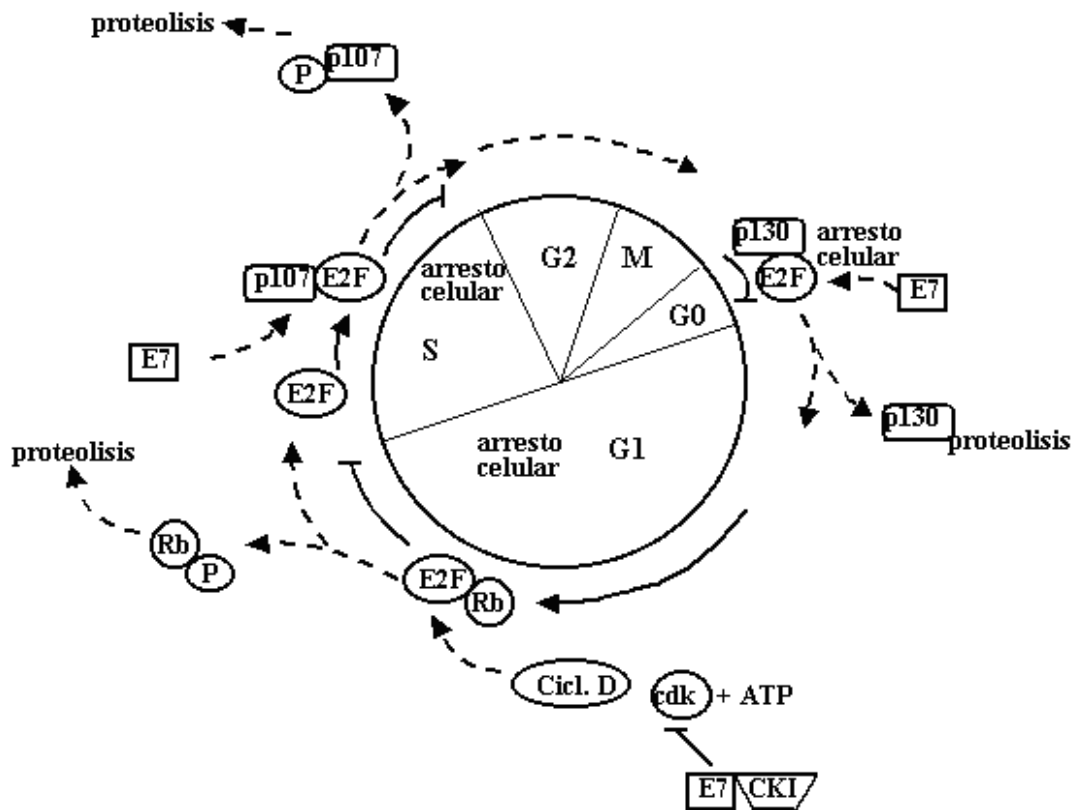


Figura 4. Mecanismo de arresto celular por pRb, p107 y p130 (flechas continuas) en las fases G1, S y G0 en condiciones normales. La interacción de E7 con estas proteínas inhibe el arresto celular y promueve su degradación a través de la vía del proteosoma (flechas discontinuas).

Algunos trabajos realizados *in vivo* e *in vitro* demuestran que E7 también puede formar un complejo con la proteína que se une a la caja TATA (TBP) y esta actividad se incrementa cuando E7 es fosforilada por la proteína CKII (Massimi et al., 1996). Así mismo, E7 contiene dos dominios Cys-X-X-Cys en la región CR3 del carboxilo-terminal (aa. 41-98) que forman un dedo de zinc, mediante el cual interactúa con los factores de transcripción de la familia AP1 (c-Jun, JunB, JunD y c-Fos), lo que contribuye de forma significativa en el proceso de transformación (Antinore et al., 1996). Al estar fosforilada, E7 también se

asocia con la cinasa de la histona H1, lo cual parece contribuir a la actividad transformante de E7 en la fase G₂/M del ciclo celular, lo que hace suponer que E7 puede interactuar con otras proteínas en estadios más avanzados del ciclo celular (Davies et al., 1993). Otros estudios demuestran que E7 de HPV 16 tiene la capacidad de inactivar a p27^{kip1} a través del dominio CR3, esta función permite que p27^{kip1} no pueda inducir el arresto en la fase G1 a través de reprimir la actividad cinasa de cdk2 sobre el complejo ciclina E/cdk2 (Zerfass-Thome et al., 1996). También se ha demostrado que E7 puede alterar los niveles de expresión de p16^{INK4A} y p21^{Cip1/WAF1} en células que expresan dicha proteína, lo cual, contribuye a la inhibición del arresto del ciclo celular (Funk et al., 1997; Bruce et al., 2000).

Por otra parte, estudios enfocados a determinar el papel de E7 en el citoplasma han demostrado que E7 induce la actividad de la enzima α -glucosidasa para degradar la glucosa intracelular, lo cual podría ser el mecanismo con el que se obtiene energía para el crecimiento y la división celular (Zwerschke et al., 2000). Como se ha mencionado anteriormente, E7 coopera con el oncogén *ras* en el proceso de transformación y se ha observado que células de riñón de ratón transfectadas con *ras* incrementan la producción de lactato a partir de la degradación de la glucosa, glutamina, serina y piruvato extracelular (Mazurek et al., 2001).

Hasta el momento no se conocen diferentes formas de splicing alternativo para E7 a partir del promotor *P97*, sin embargo, otros estudios han demostrado

la presencia de diferentes transcritos que pueden dar origen a diferentes isoformas de E2, E4 y E6 (Doorbar et al., 1990, Sherman and Alloul 1992, Sherman et al., 1992, Vaeteewoottacharn et al., 2005, Schwartz 2008). Por otro lado, se ha detectado la presencia de transcritos tardíos en células diferenciadas que pueden codificar nuevas proteínas (E6-E7, E6-E4, E1-E4 y E1-E2) y se han descubierto nuevos promotores que pueden dar origen a la formación de otras proteínas (Milligan et al., 2007). Estos nuevos promotores aún no han sido caracterizados totalmente, de manera que posiblemente ellos podrían dar origen a otras isoformas de E7 con diferentes características que no han sido identificadas.

Como se puede observar, la mayoría de las proteínas con las que interactúa E7 participan en el metabolismo y control del ciclo celular, de tal manera que esta interacción es un factor crítico en el proceso de la transformación celular.

1.5.3 Genes de Expresión tardía

Los genes *L1* y *L2* se expresan a partir del promotor tardío y codifican para dos proteínas que conforman la cápside. La proteína L1 forma el 80 % de la proteína viral y posee un peso molecular de 55 kDa. El marco de lectura para L2 se traslapa con el gen que codifica para E5 y con el gen L1, codifica una proteína que está presente en menor cantidad en la cápside y posee un peso molecular de 70 kDa. Ambas proteínas se expresan solamente en infecciones productivas de células infectadas (Meyers et al., 1992). La posición, el tamaño y

función de los marcos de lectura para estas proteínas se encuentran bien conservados entre algunos tipos de HPVs. La presencia de anticuerpos contra los antígenos de estas proteínas son particularmente importantes en el diagnóstico de una infección temprana por algún tipo de HPV (Banks et al., 1987) y han sido motivo de estudio para el desarrollo de vacunas profilácticas.

II. Justificación

De acuerdo a la secuencia de aminoácidos y al comportamiento electroforético irregular de E7, se ha sugerido que la diferencia en peso molecular de ésta se relaciona con la carga negativa de la región amino-terminal de la misma. En experimentos de "pulso y caza" realizados por Smotkin y Wettstein con HPV6 (1987) no se detectaron cambios en la movilidad de la proteína, sugiriendo que no hay otras modificaciones. Sin embargo, en otros estudios se reportó la presencia de dos especies de la proteína E7 de HPV-6 (Gage et al., 1990), lo cual se contrapone con lo reportado por Smotkin y Wettstein. La aparición de E7 de HPV16 con diferentes pesos moleculares ya ha sido reportada anteriormente (Sato et al., 1990; Grenfield et al., 1991), así como para E7 de HPV 18 (Selbey et al., 1994), sin embargo, no se ha explicado su origen, ni su significado biológico. Distintas especies fosforiladas de E7 de HPV18 han sido reportadas y el tratamiento de éstas con fosfatasa alcalina sugiere la existencia de otras modificaciones postraduccionales de la proteína además de la fosforilación (Selbey et al., 1994). Por otra parte, existen discrepancias en cuanto a la localización subcelular de la proteína, ya que inicialmente E7 de HPV 16 se reportó como citoplasmática, pero otros investigadores la reportaron en núcleo. En contraste, el estudio de Kanda y colaboradores (1991) demuestra que E7 se encuentra en ambos compartimientos subcelulares.

Es posible que E7 sufra otras modificaciones postraduccionales durante su proceso de síntesis que le permiten cambiar su conformación estructural, interactuar con diferentes proteínas celulares y distribuirse en diferentes compartimientos subcelulares. Quizá a esto se deba a que cuando se trata de identificar a dicha proteína con algún anticuerpo específico, sólo se detecta a alguna de las isoformas en uno u otro compartimiento. Estas modificaciones postraduccionales podrían ser una de las limitantes por la cual no se genera una buena respuesta inmune cuando se utilizan fragmentos peptídicos como antígenos en las vacunas.

Como hemos observado, E7 es una proteína que interacciona con proteínas involucradas en el control del ciclo celular, sin embargo, a pesar de que esta proteína oncogénica es muy importante para desarrollar cáncer cérvico-uterino, se conoce muy poco acerca de sus características que le permiten interactuar con cada una de sus proteínas blanco. Las propiedades biológicas y bioquímicas de la proteína E7 anteriormente mencionadas son solo algunas de las que se han podido detectar, sin embargo, es necesario realizar estudios más detallados para identificar las propiedades de cada una de las posibles isoformas de E7 que se encuentran en los diferentes compartimientos subcelulares.

El cáncer cérvico-uterino en la actualidad representa un problema de salud pública en nuestro país y en el mundo, por lo que es necesario encontrar los mecanismos que nos permitan prevenir o controlar el proceso canceroso producido por estos virus. El conocimiento de cómo actúan estas proteínas

oncogénicas puede ser una herramienta muy importante que nos ayude a identificar las vías a través de las cuales se puede controlar a esta enfermedad. Por lo que surge la necesidad de identificar y caracterizar las posibles isoformas de E7 que se pudieran generar en las células transformadas, lo que nos permitiría saber qué secuencia peptídica se conserva en las diferentes isoformas. El análisis antigénico de estas secuencias sería de utilidad para usarlas como epítomos para generar una mejor respuesta inmunológica y el desarrollo de una vacuna.

Por lo anterior, en esta investigación nos enfocamos a identificar diferentes isoformas de la proteína E7 de HPV 16 en células transformadas (CaSki). Como se mencionó anteriormente, en estas células se ha demostrado la presencia de diferentes transcritos de RNAm formados por splicing alternativo que podrían sintetizar otras isoformas de las proteínas de HPV16 (Vaeteewoottacharn et al., 2005, Milligan et al., 2007, Schwartz 2008), además, poseen alrededor de 600 copias del DNA viral de HPV16. Por este motivo, las células CaSki son una buena alternativa para detectar posibles isoformas de la proteína E7. La detección de isoformas de E7, el entendimiento de su procesamiento, sus propiedades bioquímicas y localización subcelular, podrían contribuir para dilucidar el mecanismo a través del cual E7 de HPV 16 genera el proceso de transformación celular y como consecuencia el cáncer cérvico uterino.

III Hipótesis:

La variación en el peso molecular de E7 no sólo es consecuencia de su comportamiento electroforético anómalo, sino que existen diferentes isoformas de dicha proteína.

IV Objetivos

IV.1 Objetivo General:

Identificar la presencia de isoformas de E7 de HPV 16 en células CaSki durante su procesamiento celular.

IV.2 Objetivos específicos:

1. Identificar la presencia de isoformas de E7, el peso molecular y el punto isoeléctrico de cada una de ellas.
2. Determinar la vida media de cada una de las isoformas identificadas.
3. Identificar que isoformas de E7 pueden fosforilarse.
4. Identificar por inmunofluorescencia la presencia de E7 y su distribución en diferentes compartimientos subcelulares.
5. Determinar la cinética de expresión de E7 en un sistema *in vitro*.

V. Metodología

V.1 Cultivos celulares

En nuestros experimentos se utilizaron las líneas celulares CaSki (carcinoma epidermoide cervical de humano) las cuales son infectadas naturalmente con HPV-16, células HaCaT (keratinocitos normales de humano) y células Cos-7 (fibroblastos de riñón de mono transformados con SV-40). Las células fueron cultivadas en medio modificado de Eagle de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) v/v (Invitrogen) conteniendo penicilina y estreptomina (100 unidades/ml de penicilina base y 100 µg/ml de estreptomina base) en ambiente húmedo a 37 °C con 5% de CO₂.

V.2 Preparación de células competentes y transformación de bacterias con el plásmido pCO5-CII-E7

Se utilizó el plásmido pCO5 donde se encuentra clonada la secuencia del gen *E7* fusionada al gen *C-II* del fago λ que codifica para los primeros 13 aminoácidos de dicha proteína y que está bajo el control del promotor termoinducible pL del fago λ (Androphy et al., 1985, Pedroza et al., 2000). Dicho plásmido fue usado para transformar células de *Escherichia coli* DH5α y la proteína CII-E7 fue expresada por termoinducción como se menciona más adelante.

Para la preparación de células competentes se cultivaron bacterias DH5α en medio LB (1% Bactotripton, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl) en la fase logarítmica temprana (OD_{600 nm} 0.5) y se cosecharon por centrifugación

(8000 rpm a 4 °C durante 10 min). La pastilla fue resuspendida en la décima parte del volumen original en amortiguador TBS (10% w/v de Polietilenglicol PM 3000 o 6000, 5% DMSO, 20 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, todo disuelto en medio LB) y se mantuvieron en hielo por 10 min.

En la transformación se colocaron 100 µl de células competentes en un tubo eppendorf, se les agregó 1 µg de plásmido pCO-5-CII-E7 y se mantuvieron en hielo por 30 min. Después se les dió un choque térmico de 42 °C por 1 min, se les agregó medio de cultivo fresco y se mantuvieron a 37 °C por 1 h para permitir la expresión de los marcadores de selección. Las bacterias fueron sembradas en medio sólido-ampicilina (medio LB, 1.5% de agar, 50 mg/ml ampicilina) y se cultivaron por 24 h a 37 °C.

V.3 Expresión y purificación de la proteína recombinante CII-E7 y MS2-E7

Una colonia de bacterias transformadas fue cultivada a 32 °C durante toda la noche en 10 ml de medio LB-ampicilina (1% Bactotripton, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl y 50 mg/ml de penicilina). Al día siguiente se agregó todo el volumen a un matraz con 200 ml de medio y se cultivaron en agitación a 32 °C hasta una OD_{600 nm} de 0.5. Después recibieron un choque térmico al adicionarse 100 ml de medio a 60 °C y se cultivaron por 3 h a 42 °C para expresar la proteína recombinante CII-E7. Las bacterias fueron cosechadas mediante centrifugación a 8000 rpm durante 10 min, la pastilla celular fue resuspendida en 10 ml de solución de sacarosa 25% (w/v), 0.05 M de Tris-HCl pH 8.0 y lisozima 5 mg/ml (w/v) y se incubó durante 20 min en hielo. Después se

agregó 1 ml de amortiguador de lisis 10X (Nonidet 10%, desoxicolato de sodio al 5%, NaCl 1 M, Tris-HCl 0.1 M pH 7.4, EDTA 0.01 M) y se mantuvo la mezcla 20 min en hielo. Se agregaron 5 mM de MgCl₂ y 40 U/ml de DNasa I y se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente el lisado fue sonificado con 3 pulsos constantes de 30 seg, cada uno a una intensidad de sonificado de 3 en un sonicador Branson SONIFIER modelo 450. Las proteínas fueron semipurificadas por centrifugación según el método de Gosh et al., (1993) y después se separaron mediante SDS-PAGE preparativa y se tiñeron con azul brillante de Coomassie (Cleveland et al., 1977). Del gel se cortó la banda correspondiente a la proteína E7, se electroeluyó y fue concentrada por centrifugación (Centrifugal Filter Devices, Millipore).

La proteína MS2-E7 fue expresada en *Escherichia coli* (cepa C600/537), transformadas con el plásmido pEX 8mer-HPV16-E7 que contiene el gen *E7* clonado bajo el control del promotor termoinducible pL del fago λ fusionado en su región amino-terminal a los primeros 100 aminoácidos de la polimerasa del bacteriófago MS2. La proteína también se expresó por choque térmico y fue purificada como se mencionó anteriormente.

V.4 Producción de anticuerpos policlonales anti-E7

Se inmunizaron 2 conejos New Zealand por vía intraperitoneal cada 15 días con una dosis de 50 μ g de proteína CII-E7 emulsificada en adyuvante de Freund's. Antes de cada inmunización los conejos fueron sangrados para probar la reactividad del suero contra la proteína E7. Los conejos fueron sangrados a

blanco después de la tercera dosis, debido a que ya no se observó un incremento en los títulos de anticuerpo monitoreados a través de la técnica de ELISA (ver más adelante).

V.5 Producción de anticuerpos monoclonales

En nuestros ensayos también se utilizaron los anticuerpos monoclonales D11, G7 y B4 desarrollados en nuestro laboratorio como se menciona a continuación.

Para la inmunización de los ratones se utilizó la proteína CII-E7 expresada y purificada como se mencionó anteriormente. Ratones Balb/c hembras de 5 semanas fueron inmunizados intraperitonealmente con 20 µg de proteína CII-E7 diluida en 100 µl de urea 6 M mezclada 1:1 con adyuvante completo de Freund's. La segunda inmunización se aplicó a los 15 días pero en éste caso la proteína E7 se preparó en PBS (150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.01 M Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.2) mezclada 1:1 con adyuvante incompleto de Freund's.

Antes de cada inmunización se tomaron muestras de sangre para obtener suero pre-inmune e hiper-inmune a diferentes tiempos. Los títulos de anticuerpos fueron medidos por ensayo de ELISA para verificar niveles de anticuerpos anti-E7 generados en las diferentes inmunizaciones y seleccionar el mejor momento para llevar a cabo la fusión de los esplenocitos y las células de mieloma. Los ratones con títulos más altos de anticuerpos anti-E7 fueron retados una tercera vez por vía intravenosa (i.v.) con 40 µg de proteína CII-E7 para obtener un

mayor número de células de bazo reactivas contra E7 al momento de la fusión. Tres días después los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron las células de bazo por extracción directa del órgano y disgregación a través de una malla metálica. Las células de bazo fueron obtenidas en medio RPMI libre de suero y fueron centrifugadas, después se resuspendieron en medio RPMI sin SFB a una concentración de 5×10^6 células/ml para llevar a cabo la fusión.

V.5.1 Generación de hibridomas

Las células de mieloma de ratón SP2/0 fueron cultivadas en RPMI con 20% SFB a una confluencia no mayor al 80%. Para llevar a cabo la fusión las células de bazo y las células de mieloma fueron mezcladas en una relación de 3:1 en presencia de medio RPMI sin suero y 50% PEG (polietilenglicol 1500), las cuales fueron incubadas a 37°C por 1 min (Harlow & Lane, 1988). Pasado este tiempo se adicionaron 2 ml de RPMI sin suero durante 2 min, proceso que fue repetido con 7 ml de RPMI estéril por un período de 2-3 minutos más. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 20 ml de medio completo RPMI, 20% SFB, HAT (hipoxantina 0.1 mM, aminopterina 0.4 μ M y timidina 0.16 mM), 2 mM glutamina, 5.5×10^{-5} mM mercaptoetanol y 0.005 mg/ml gentamicina. Las células así fusionadas se colocaron en placas de 96 pozos a una concentración de 2×10^5 células en 200 μ l de medio/pozo y se incubaron a 37°C con 5% CO₂ por al menos 15 días.

V.5.2 Expansión y clonación de los hibridomas positivos para anticuerpos anti-E7

Una semana después de la fusión se retiraron 100 µl de medio y se agregaron 100 µl de medio completo nuevo (RPMI, 20% SFB, HAT). Posteriormente cuando el medio se tornó amarillo, los sobrenadantes fueron probados para la presencia de anticuerpos anti-E7 por medio de la técnica de ELISA como se describe más adelante. Los hibridomas, con los sobrenadantes que presentaron las absorbancias más altas fueron seleccionados y se transfirieron a placas de 24 pozos y se cultivaron con 1 ml de medio RPMI suplementado con 20% SFB y HT. Las células se dejaron crecer en estas condiciones (5-7 días) y cuando el medio se tornó amarillo se volvió a analizar el sobrenadante conforme a la técnica de ELISA estandarizada para la determinación de anticuerpos contra E7.

Los sobrenadantes de los hibridomas que dieron los títulos más altos se volvieron a seleccionar y se transfirieron a un frasco de cultivo de 25 cm² con 5 ml de medio RPMI, 20% SFB y HT para aumentar el número de células y posteriormente clonar estos hibridomas por dilución limitante.

V.5.3 Producción de los anticuerpos monoclonales anti-E7 de HPV 16

Las hibridomas obtenidos por dilución limitante (clonas positivas) fueron utilizados para la producción de los anticuerpos anti-E7 en condiciones de cultivo *in vitro* en frascos de 162 cm² durante 10 a 15 días o hasta que el medio se tornó amarillo (Harlow & Lane, 1988). Pasado este tiempo se obtuvo el

sobrenadante, el cual fue centrifugado y alícuotado con azida de sodio 0.02% y conservado a -20°C hasta su uso. Estos sobrenadantes fueron probados posteriormente por ELISA para verificar la presencia de los anticuerpos anti-E7 en las clonas seleccionadas.

V.5.4 Obtención de líquido de Ascitis

Para la propagación *in vivo* y a gran escala de los anticuerpos monoclonales se utilizaron ratones Balb/c hembras de cinco semanas. Primeramente, los ratones fueron estimulados intraperitonealmente (i.p.) con una inyección de 0.5 ml de pristane. Diez días después, los ratones fueron inoculados con 2×10^6 células del hibridoma seleccionado. Los ratones fueron monitoreados a través de la distensión del abdomen por aproximadamente 12 a 15 días. Llegado el momento, el fluido ascítico fue drenado con aguja de calibre 18 y colectado en un tubo cónico estéril. El fluido ascítico colectado fue centrifugado, alícuotado y conservado a -70°C hasta su posterior uso. Los anticuerpos monoclonales fueron purificados del líquido ascítico por medio de cromatografía de afinidad en columnas de proteína G como se describe más adelante. Finalmente, se midieron los títulos de anticuerpos mediante una curva de titulación a diferentes diluciones.

V.5.5 Purificación de anticuerpos por columna de proteína G

Para la purificación del anticuerpo del líquido de ascitis, inicialmente se lavó la columna de proteína G con 20 ml de buffer star (fosfato de sodio 20 mM,

pH 7.0) y posteriormente se equilibró la columna con 15 ml del mismo buffer. Por otro lado, 0.5ml de líquido de ascites fueron centrifugados por 10 min a 14,000 rpm. La muestra de ascitis fue diluida en 4.5 ml de buffer star y fue pasada a través de la columna tres veces. Posteriormente la columna se lavo con 25 ml de buffer star para después eluir los anticuerpos de la columna con 25 ml de buffer de elusión (glicina-HCl 0.1 M, pH 2.7). Las fracciones colectadas fueron de 1 ml el cual fue neutralizado con buffer de neutralización (Tris-HCl 1 M, pH 9.0). Las muestras con mayor absorbancia a 280 nm fueron seleccionadas y mezcladas para posteriormente ser dializadas con PBS. Por último, los anticuerpos dializados fueron alícuotados en 0.5 ml y conservados a -70°C hasta su uso.

V.5.6 Otros anticuerpos

Otros anticuerpos utilizados fueron el anticuerpo comercial anti-E7 (clona ED17 de Santa Cruz, Biotechnology) y para nuestros experimentos de colocalización se utilizaron los anticuerpos anti-calnexina (clona H-70 de Santa Cruz, Biotechnology); el anticuerpo anti-p21 (clona C-19 de Santa Cruz, Biotechnology) y el anticuerpo anti-GM130 (clona 35 de BD Biosciences).

V.6 Técnica de ELISA

El incremento de los títulos de anticuerpo contra E7 se determinó a través de la técnica de ELISA. Para evitar que los anticuerpos reconocieran el péptido adicional de 13 aminoácidos en CII-E7, se utilizó la proteína recombinante MS2-E7 para los ensayos de ELISA. Doscientos microgramos por microlitro de

antígeno MS2-E7 se diluyó en buffer de carbonatos (0.018 M Na₂CO₃, 0.032 M NaHCO₃, 0.02 % azida de sodio) en cada pozo de una placa de 96 pozos y se incubó toda la noche a 4°C. La placa se lavó posteriormente con PBS-Tween 0.05 % pH 7.2 (2.6 mM KCL, 1.5 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl y 8.2 mM NaH₂PO₄) y se bloqueó durante 2 h con leche descremada al 10 % (Carnation) en PBS-T. Se lavó la placa y se agregaron los sueros inmune y control por triplicado en diluciones 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400 diluidos en PBS-Tween-leche al 10%, y se incubó la placa durante una hora y media a 37 °C. Después se lavó la placa y se incubó durante 1 h con el anticuerpo conjugado-HRP diluido 1:1000 en PBS-Tween-leche al 5 %. La placa se lavó y se reveló con solución de ortofenilenediamina al 0.4 % (w/v) en buffer de fosfato-citrato pH 5.0 (0.2 M Na₂HPO₄, 0.1 M ácido cítrico). La reacción se detuvo a los 10 min agregando 100 µl de una solución de ácido sulfúrico 2 M y la densidad óptica se determinó a 490 nm en un espectrofotómetro ELx800 BIO-TEK Instruments Inc.

V.7 Detección de E7 por Inmunoprecipitación.

Células CaSki y HaCaT a 80 % de confluencia se lavaron con PBS y se incubaron por 30 min con DMEM libre de metionina y cisteína suplementado con 5% de SFB dializado previamente contra PBS. Pasado este tiempo se adicionaron 50 µCi /ml de ³⁵S-Promix (metionina y cisteína marcadas con ³⁵S, Cat SJQ0079 de Amersham) (Promix, > 1000 Ci/mmol, GE Healthcare, Piscataway, NJ. USA) y se cultivaron por 16 h. Posteriormente se lavaron con PBS y se lisaron con buffer RIPA (0.1 % de NP-40 V/V, 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7.4,

1 mM EDTA, 0.1 % deoxicolato de sodio w/v y 0.1 % SDS w/v). Las muestras se normalizaron a 2×10^7 cpm/muestra, por medio de precipitación por TCA (ácido tricloro acético), como ya se ha reportado (Sambrook et al., 1989). Brevemente, 5 μ l de lisado celular se absorbieron en papel Whatman. Posteriormente, los filtros se incuban por 10 min con 10% TCA frío con agitación continua. Los filtros después son hervidos con 5% TCA por 10 min. Finalmente se lavan 2 veces por 5 min cada vez con 5% de TCA frío y una vez con alcohol al 95% por 2 min. Los filtros son secados y colocados en tubos con líquido de centelleo y los cpms cuantificados en un Contador de Centelleo para radiaciones Beta (Contador de Centelleo Beckman, modelo LS5801).

Las muestras así normalizadas se incubaron toda la noche con 30 μ l de suero de conejo o 3 μ g de anticuerpo monoclonal purificado anti-E7. Al día siguiente se incubaron 2 h más con 20 μ l de PA-sefarosa (CI-4B, Amersham Biosciences). Las muestras fueron centrifugadas y las pastillas obtenidas se lavaron 3 veces con buffer RIPA y una vez con solución de Tris-HCl 50 mM pH 6.8. Al final las pastillas se resuspendieron en buffer de muestra (Tris HCl 50 mM, pH 6.8, 10 % Glicerol, 2% SDS, 100 mM Dithiothreitol y 1 % Azul de Bromofenol), se hirvieron durante 5 min y se resolvieron en gel de poliacrilamida al 15 % desnaturalizante y reductor (Laemmli 1970). Posteriormente, los geles fueron tratados por 30 min en una solución de 40% metanol / 7% ácido acético y después otros 30 min con solución Enlighting (NEN Research Products). Por último, los geles fueron secados y expuestos a film X-OMAT a -80° C.

V.8 Ensayo de Western blot

Las proteínas de células HaCaT y CaSki extraídas e inmunoprecipitadas con el suero C-24 (como se mencionó anteriormente) se resolvieron a 90 V en geles de poliacrilamida preparativos al 15%. Las proteínas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa (Protan NBA085C, Schleicher & Schuell) a 200 V durante 5 h en buffer de transferencia (Towbin et al., 1979). Las membranas se bloquearon durante 30 min en PBS-Tween, con 10% de leche descremada, después de lo cual se cortaron tiras de 0.4 mm y cada una se incubó durante 16 h con diferentes anticuerpos anti-E7. Los sueros policlonales fueron diluidos 1:200 y los anticuerpos monoclonales 1:100 (stock 200 µg/ml) en PBS-Tween-leche 5%. Al día siguiente se lavaron las membranas con PBS-Tween y se incubaron durante 1 h con anticuerpo anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón (dil. 1:2000 y 1:5000, respectivamente) ambos producidos en cabra y conjugados con peroxidasa de rábano (DAKO). Después se lavaron las membranas con PBS-Tween y se revelaron las proteínas mediante quimioluminiscencia de acuerdo con las especificaciones del proveedor (Western Lightning Chemilumiscence Reagent Plus, Perkin Elmer). Finalmente los filtros se expusieron con X-OMAT film por diferentes tiempos.

V.9 Ensayo de pulso y caza

La síntesis *de novo* de la proteína E7 fue seguida mediante la técnica de pulso y caza. Las células cultivadas a 80-90% de confluencia fueron incubadas por 30 minutos con DMEM libre de metionina y cisteína suplementado con 5 %

de SFB dializado con PBS. Después las células se marcaron con DMEM conteniendo 250 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -Promix por 15 minutos. Posteriormente, el medio con radiactividad fue reemplazado con medio de cultivo normal y se incubaron de manera usual por diferentes periodos de tiempo (0, 1, 3 y 6 h). En cada tiempo las células se lisaron con buffer RIPA, se normalizó el número de cpm a 20×10^6 y fueron incubados para inmunoprecipitación con los anticuerpos anti-E7. Después, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis desnaturizante y reductora. Por último las bandas fueron visualizadas por autorradiografía.

V.10 Técnica de isoelectroenfoque y gel 2D

Las proteínas inmunoprecipitadas a partir de células HaCaT y CaSki (marcadas radiactivamente durante 16 h) fueron solubilizadas en 30 μl de buffer de muestra (urea 9.5 M, NP40 2% v/v, amfolina 2%, DTT 100 mM) y fueron separadas a 400 V en geles cilíndricos de 12 cm de largo para la primera dimensión (urea 9 M, NP-40 2%, 4.5 % acrilamida-0.24% bisacrilamida y 7% de anfolinas con rango de pH 3.0 a 10) (Gutiérrez et al., 1989). Las proteínas fueron separadas después en la segunda dimensión en geles de poliacrilamida al 15 %, después se secaron y las bandas se visualizaron por autorradiografía. La distribución del pH en los geles se determinó midiendo segmentos de 2 cm de largo, se graficaron las lecturas y posteriormente se ubicaron las proteínas de interés.

V. 11 Marcaje de proteínas de síntesis de novo con ortofosfato [³²P]

Los cultivos celulares de HaCaT y CasKi fueron puestos en ayuno por 48 h en medio DMEM con 0.2 % (v/v) de SFB. Después se les cambió el medio de cultivo por DMEM libre de fosfatos que contenía 0.2 % (v/v) de SFB dializado con buffer TBS (Tris 20 mM NaCl 150 mM pH ,7.4) y se incubaron durante 2 h. Posteriormente las células fueron incubadas con [³²P]-ortofosfato a una concentración de 100 µCi/ml (tiempo 0) por 1 h, después de lo cual el medio fue reconstituido al 10 % (v/v) con SFB dializado y se incubaron a diferentes tiempos (0, 1, 3 y 5 h) (Massimi et al., 2001). En cada tiempo de incubación, las células fueron lisadas con buffer RIP-γ con inhibidores de proteasas y fosfatasas (HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, Glicerol 10% v/v, MgCl₂ 1.5 mM, EGTA 200 mM, Orthovanadato de sodio 200 mM, Pirofosfato de sodio 10 mM, NaF 100 mM, PMSF 200 mM, aprotinina 1%, Tritón X-100 1% v/v) y más tarde se incubaron con anticuerpo anti-E7 para inmunoprecipitar dicha proteína. Las muestras fueron centrifugadas y las pastillas obtenidas se lavaron 3 veces con buffer RIP-β [HEPES 200 mM pH 7.5, glicerol 10% (v/v), NaCl 150 mM, orthovanadato de sodio 1 mM, Tritón X-100 0.1% (v/v)] y una vez con Tris 50 mM pH 6.7 antes de resuspender en 50 µl de buffer de muestra. Las proteínas se resolvieron en gel de poliacrilamida al 15% el cual fue secado y expuesto con película Kodak X-Omat para visualizar las bandas por autorradiografía.

V.12 Inmunofluorescencia de E7 en células

Las células sembradas en laminillas Multitest Slide 8-well, (MP Biomedical) y cultivadas hasta un 80 % de confluencia se fijaron en p-formaldehído al 4% durante 20 min, se lavaron con PBS y después se bloquearon durante 20 min con albúmina sérica de bovino (BSA) al 1% en PBS-Tritón X-100 al 0.3% o saponina al 0.2%. Posteriormente, las células se incubaron durante toda la noche con anticuerpos anti-E7 diluidos en solución de bloqueo (suero de conejo 1:100 ó IgG purificada de los anticuerpos monoclonales 2 ng/ µl). Las laminillas fueron mantenidas en cámaras húmedas a 4 °C durante cada incubación.

Al día siguiente se lavaron las laminillas con PBS y se incubaron 2 h más con anticuerpo anti-IgG de conejo Alexa 488 (fluorescencia verde) o anti-IgG de ratón Alexa 594 (fluorescencia roja) (Molecular Probes) o anti-IgG de ratón FITC 115-095-003, (Jackson Immuno-Research) diluidos 1:250 ó 1:800, respectivamente. Finalmente, las muestras fueron montadas con PBS-glicerol al 50% v/v y fueron observadas al microscopio confocal (Laser Scanning Microscope 510 META objetivo Plan-Neofluor 100X/1.3 oil Ph3, Zeiss.)

V.13 Transfección transitoria de células Cos-7 con E7 de HPV-16

Se sembraron 6×10^5 células Cos-7 en cajas de cultivo con laminillas redondas de 18 mm de diámetro y se les dejó adherirse durante 2 h, después se eliminó el medio normal, se lavaron con PBS y se incubaron durante 4 h con 5 µg de pcDNA o pcDNA-E7, (fragmento de E7 abarcando los nucleótidos 562 a

858 de HPV-16) (GenBank access AF 477385) (donado por Dr. J. Berumen, Laboratorio de Medicina Genómica, Hospital General México), diluido en DMEM sin SFB y 250 µg DEAE-dextrán (Hancock et al., 1988). Posteriormente, se retiró esta solución y se les dio a las células un choque de 2 min con solución de choque (HEPES 1 M pH 7.3 y 10% DMSO). Después se lavaron con PBS y se incubaron durante 0, 8, 16, 24, 36, 48 y 72 h en condiciones normales de cultivo. Al finalizar cada periodo de incubación las células fueron fijadas con p-formaldehído y se guardaron a 4°C en PBS-azida de sodio 0.02 % para usarlas posteriormente en las pruebas de inmunofluorescencia como se mencionó anteriormente.

VI Resultados

VI.1 Obtención de clonas que sintetizan la proteína E7 recombinante

Se transformaron bacterias *E. coli* con el plásmido pCO5 que contiene el gen termo-inducible de la proteína E7 de HPV-16 precedido por la secuencia de 13 aminoácidos de la proteína CII del fago λ . Las bacterias transformadas fueron inducidas, lisadas y analizadas por SDS-PAGE al 15%. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie para visualizar las proteínas e identificar qué colonias expresaban la proteína CII-E7. Después de haber realizado la transformación de bacterias se lograron obtener 4 diferentes clonas que expresaron en buena cantidad la proteína CII-E7 (Fig. 5).

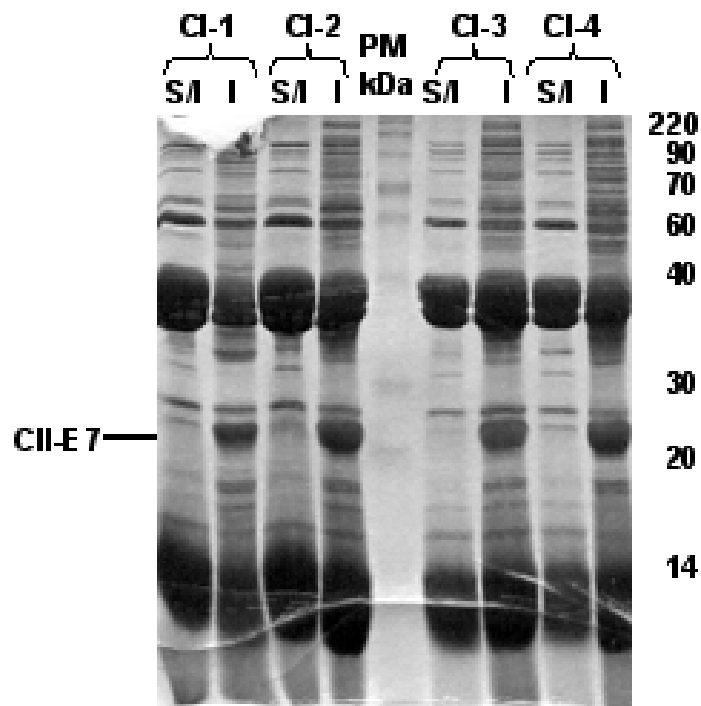


Figura 5. Clonas que sintetizan a CII-E7. Las bacterias fueron cultivadas a 32 °C, se tomó una muestra sin inducir (S/I) y después fueron termoinducidas a 42 °C (I) . Las proteínas fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE. Se observa a CII-E7 con un peso molecular aproximado de 24 kDa (I). Marcadores de peso molecular se observan al centro del gel.

Cuando las clonas fueron cultivadas y cosechadas sin inducir (S/I) no sintetizaron la proteína de interés (carriles 1, 3, 6 y 8), sin embargo, después de realizar la inducción por choque térmico logramos visualizar la proteína CII-E7 con un peso molecular aproximado de 22 kDa (carriles 2, 4, 7 y 9) (Fig. 5).

VI.2 Producción a gran escala de la proteína E7 de HPV 16 recombinante

Para obtener suficiente proteína CII-E7 para las inmunizaciones se cultivaron grandes cantidades de bacterias con medio LB a 32°C e inducida la expresión a 42°C. La proteína recombinante E7 expresada en bacterias fue purificada como se señaló en la Metodología, en geles preparativos y electroeluida. Muestras de diferentes preparaciones de proteína E7 fueron separadas por SDS-PAGE y teñidas con Coomassie (Fig. 6).

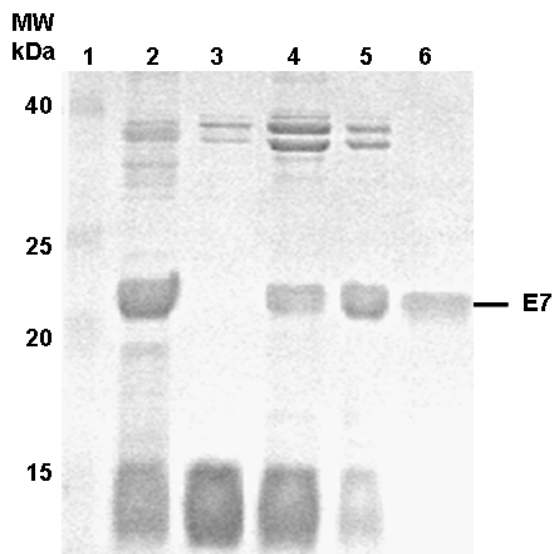


Figura 6. Obtención y purificación de la proteína E7. La proteína E7 fue obtenida de bacterias DH5 α transformadas con el plásmido pSV2neo-E7. La proteína fue expresada por choque térmico, se purificó por SDS-PAGE y se corrió en geles de poliacrilamida al 15% para determinar su pureza. En el carril 1 se observan los marcadores de peso molecular, el extracto crudo de proteína de bacterias inducidas (carril 2) y no inducidas (carril 3), subsecuentes lavados del extracto inducido (4 y 5) y la proteína E7 pura (carril 6) utilizada para la inmunización de los conejos.

Las proteínas de fusión se acumulan en la bacteria como gránulos de oclusión que son liberados cuando la célula es lisada y son insolubles en soluciones acuosas de diferentes detergentes. Al centrifugar y desechar el sobrenadante la proteína de interés se debería concentrar en la pastilla, sin embargo, después de realizar algunos lavados la proteína CII-E7 estaba contaminada con otras proteínas (carriles 4 y 5) que fueron eliminadas después de haber electroeluido nuestra proteína de interés y obtenida de geles preparativos (carril 6).

VI.3 Inmunoprecipitación de E7 de HPV 16 con diferentes anticuerpos anti-E7

Como se mencionó con anterioridad, varios estudios informan que E7 presenta diferente peso molecular y su fosforilación es una de las razones que modifican su peso. Por tal motivo, nos enfocamos a identificar la presencia de isoformas de E7 en estado soluble usando la técnica de inmunoprecipitación. Las proteínas extraídas de células CaSki marcadas metabólicamente durante 16 h con ³⁵S-Promix se incubaron con diferentes anticuerpos monoclonales y policlonales anti-E7 y los complejos formados se inmunoprecipitaron con proteína A-Sefarosa. De esta manera se logró un inmunoprecipitado que mediante resolución en electroforesis reveló una banda de E7 con un peso molecular aproximado de 16 kDa, sin embargo, también se detectó otra proteína de 17 kDa que solo fue identificada por los anticuerpos policlonales C89 y C24 (Fig. 7). Estas dos proteínas no se observaron en los extractos de células HaCaT inmunoprecipitados con los mismos anticuerpos (Fig. 7).

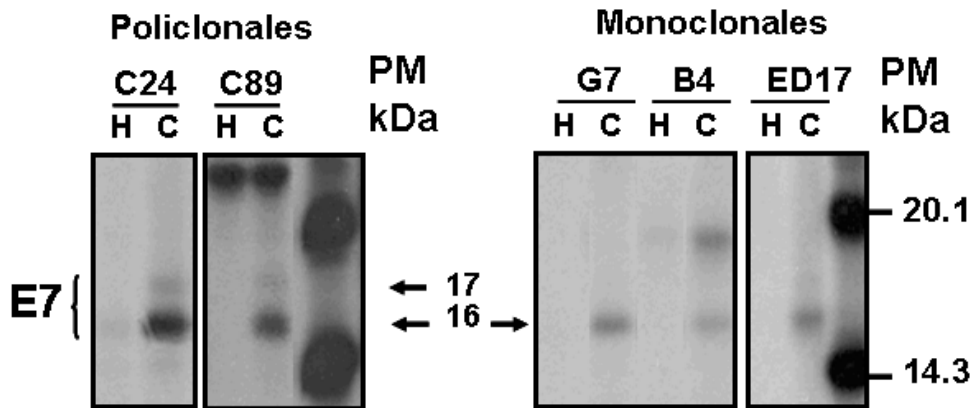


Figura 7. Identificación de isoformas de E7 de HPV16 por diferentes anticuerpos. Las proteínas de células HaCaT (H) y CasKi (C) marcadas radiactivamente durante 16 h fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-E7 monoclonales (G7, B4 y ED17) y los policlonales (C24 y C89). El carril de la derecha muestra marcadores de peso molecular marcados con ^{14}C . Las flechas señalan las bandas de la proteína E7 de 17 y 16 kDa.

Estos resultados indican que al menos dos isoformas de E7 son reconocidas por los anticuerpos policlonales (17 y 16 kDa) y solo la isoforma de 16 kDa fue reconocida por los anticuerpos monoclonales. Estos pesos moleculares para E7 han sido reportados anteriormente en forma separada (Tommasino et al., 1990, Kanda et al., 1991), sin embargo, en nuestros experimentos ambas proteínas fueron visualizadas simultáneamente por los anticuerpos policlonales.

VI.4 Identificación de las isoformas de E7 mediante Western blot

La capacidad de un anticuerpo para reconocer a una proteína puede variar dependiendo de la técnica utilizada. Como se observó anteriormente los anticuerpos policlonales inmunoprecipitaron dos isoformas de E7, de tal manera que en los siguientes experimentos se decidió identificar cuál de estas isoformas de E7 son reconocidas mediante la técnica del Western blot. Para llevar a cabo estos ensayos las proteínas obtenidas de células HaCaT y CaSki fueron

inmunoprecipitadas con el anticuerpo policlonal C-24. Los inmunoprecipitados se resolvieron en geles de poliacrilamida desnaturalizante y reductora al 15%, fueron transferidos a membrana Protean e incubados con los diferentes anticuerpos anti-E7 (policlonales y provenientes de hibridomas). Los resultados demostraron que todos los anticuerpos reconocieron una banda con un peso molecular de 16 kDa en extractos de células CaSki (Fig. 8), misma que no fue identificada en los extractos de células HaCaT.

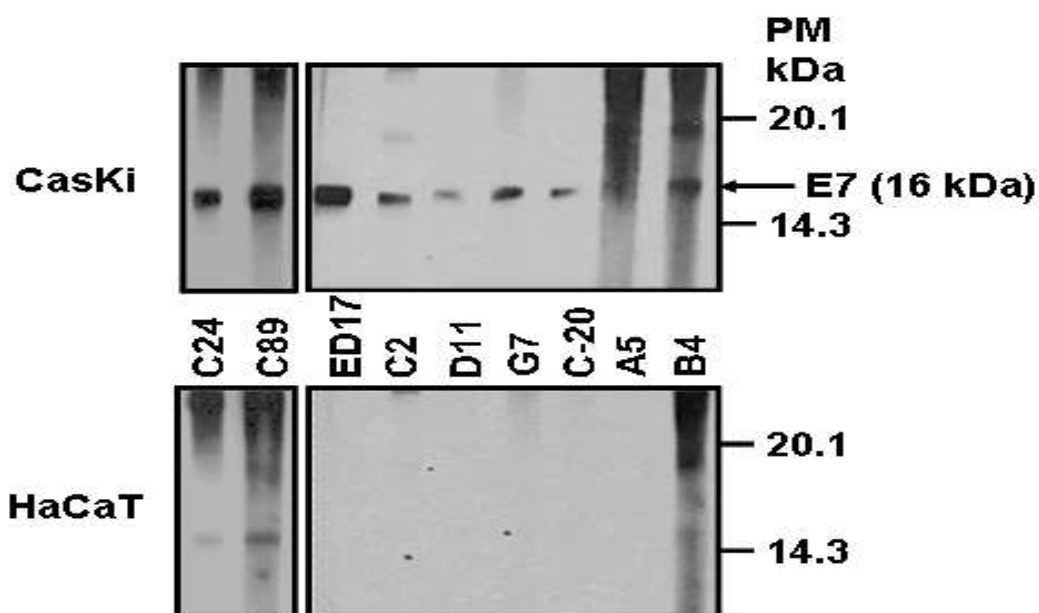


Figura 8. Detección de isoformas de E7 por Inmunoprecipitación y Western blot. Proteínas de células HaCaT y CaSki fueron extraídas e inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-E7 C-24. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a nitrocelulosa y la membrana fue cortada en tiritas para después ser incubadas con anticuerpos anti-E7. La flecha indica la banda específica de E7 con un peso de 16 kDa.

Esto indica que los anticuerpos policlonales que reconocen 2 isoformas por inmunoprecipitación lo hacen a través de dos epitopos distintos, en donde uno de ellos se pierde al someter a la proteína a las condiciones desnaturalizantes y reductoras de la electroforesis. Esto nos hace suponer que la

proteína de 17 kDa esta siendo reconocida mediante un epítipo conformacional que no es detectado por los anticuerpos monoclonales en la inmunoprecipitación (Fig. 7).

VI.5 Procesamiento de la proteína E7 de HPV 16 en el contexto celular

Los siguientes experimentos se realizaron para determinar la variación del peso molecular de estas dos isoformas de E7 conforme transcurre el tiempo. Los experimentos se realizaron mediante marcado metabólico (^{35}S -Met) para identificar proteínas en síntesis *de novo* en células CaSki. Las proteínas se marcaron durante 15 minutos con 250 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -Promix en DMEM libre de metionina y cisteína. Las células fueron lisadas a las 0, 1, 3 y 6 h para extraer sus proteínas, las isoformas de E7 fueron identificadas por inmunoprecipitación y se visualizaron por autorradiografía después de resolverlas mediante electroforesis desnaturizante y reductora. Con estos experimentos observamos la presencia de una banda de E7 con un peso molecular de 17 kDa (E7a) a las cero horas de caza y su intensidad disminuyó después de una hora, sin embargo, en este mismo tiempo apareció otra banda con un peso de 16 kDa (E7b). A las 3 h de caza la banda de mayor peso prácticamente desapareció, mientras que la banda de 16 kDa incrementó un poco su intensidad y desapareció a las 6 h (Fig. 9). En las muestras de células HaCaT se observa la presencia de una banda inespecífica en el tiempo de 6 h a la altura del peso molecular de 15 kDa, sin embargo, no mostró el patrón de bandas observado en células CaSki (Fig. 9).

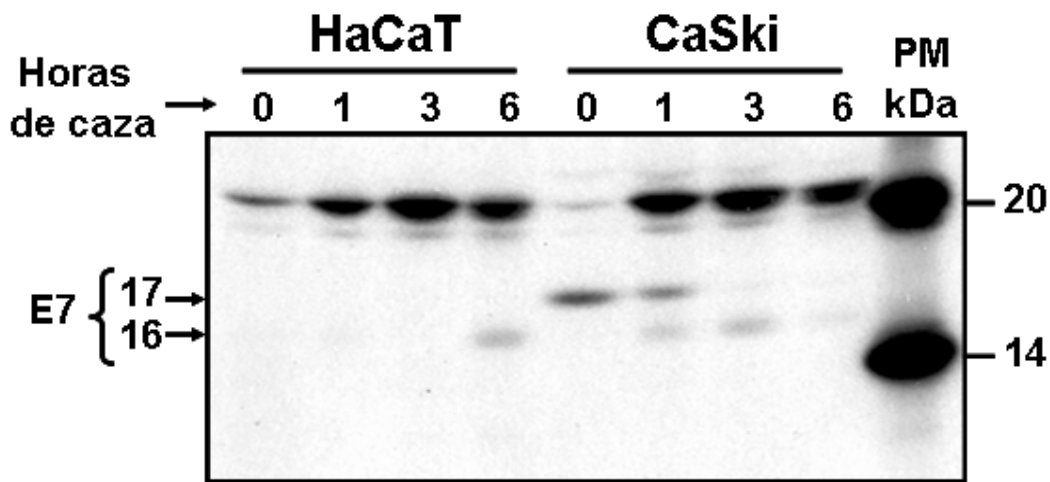


Figura 9. Seguimiento de la proteína E7 de síntesis de novo por pulso y caza. Las células HaCaT o CaSki fueron marcadas con un pulso de 15 minutos con ^{35}S -Promix, incubadas durante distintos tiempos de caza y posteriormente fueron lisadas e inmunoprecipitadas con el suero anti-E7 C-89. Las proteínas fueron separadas en un gel al 15% y las bandas visualizadas por autorradiografía. Las flechas indican las isoformas de E7 de 16 y 17 kDa.

En el análisis de las bandas de E7 por densitometría (Belle et al., 2006) para determinar la vida media de las proteínas de 17 y 16 kDa se encontró que la vida media fue de 50 y 70 min, respectivamente. Estos resultados demuestran que E7 al principio es sintetizada como una proteína de 17 kDa y que se procesa rápidamente (50 minutos aproximadamente) para dar origen a otra banda de 16 kDa con diferente vida media (Tabla 2).

Tabla 2. Determinación de la vida media de las isoformas de HPV 16 E7.

Proteína E7	MW (kDa)	Vida media (min)
E7a	17	50
E7b	16	70

VI.6 Identificación de isoformas de E7 fosforiladas

Como ya hemos mencionado, una de las modificaciones postraduccionales que ocurre a la proteína E7 es la fosforilación (Barbosa et al., 1990). De acuerdo a lo anterior, se llevó a cabo la determinación de la fosforilación de las isoformas de E7 para identificar si en ambas o en solo una ocurre este proceso. Para ello, se marcaron células CaSki con fósforo libre a diferentes tiempos de exposición. Las proteínas fueron extraídas y purificadas en presencia de inhibidores de proteasas (Massimi, et al., 2001), se inmunoprecipitó la proteína E7 con el anticuerpo policlonal C-89 y se resolvió en geles de poliacrilamida desnaturalizante y reductora al 15%. Nuestros resultados mostraron la inmunoprecipitación de una proteína E7 fosforilada cuyo peso molecular relativo es de aproximadamente 17.5 kDa, la cual fue observada en los diferentes tiempos de marcaje con un incremento en su intensidad conforme transcurrió el tiempo; esta banda que no fue detectada en las muestras incubadas con el suero preinmune (Fig. 10). Contrariamente a lo esperado, ninguna de las dos bandas identificadas anteriormente (16 y 17 kDa) presentó este proceso de fosforilación. En otros reportes se menciona que E7 posee diferentes grados de fosforilación, lo cual puede regular su capacidad de interactuar con diferentes proteínas blanco (Maximi et al., 2001), sin embargo, mediante esta técnica solo pudimos visualizar esta proteína con un peso molecular de 17.5 kDa.

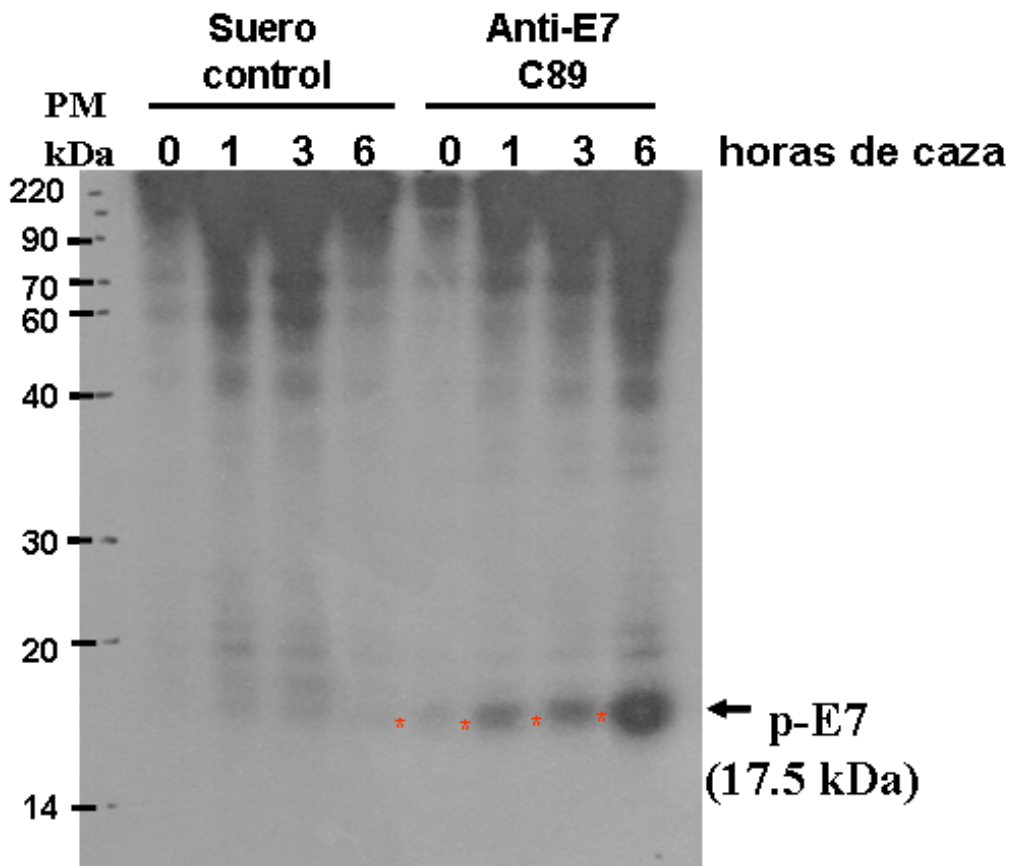


Figura 10. Detección de isoformas de E7 fosforiladas por inmunoprecipitación. Células Caski fueron marcadas por 1 h con [32 P]-ortofosfato y se cosecharon a diferentes tiempos de caza. Las muestras fueron inmunoprecipitadas con suero anti-E7 y separadas en gel SDS-PAGE. Las bandas fueron observadas por autorradiografía.

VI.7 Características fisicoquímicas de las isoformas de E7

En la caracterización de las isoformas de E7 identificadas en nuestros ensayos nos enfocamos a determinar el punto isoeléctrico de las diferentes isoformas observadas anteriormente. Las proteínas extraídas de células CaSki marcadas metabólicamente durante 16 h con 35 S-Promix fueron inmunoprecipitadas y resuspendidas en buffer para isoelectroenfoque (urea 9.5 M, NP40 2% v/v, amfolina 2% pH 3-10, DTT 100 mM). Las muestras fueron separadas en gels-2D y las bandas fueron visualizadas por autorradiografía. Estos ensayos

nos permitieron identificar las dos bandas de 17 y 16 kDa con pI de 6.18 (E7a) y 6.96 (E7b), respectivamente. Sin embargo, también logramos visualizar otra banda específica con un peso molecular aproximado de 17.5 kDa con un pI de 4.68 (E7a1), proteína que podría corresponder a la forma fosforilada de E7 que fue observada anteriormente. Al igual que en los experimentos anteriores, estas bandas no fueron visualizadas en las proteínas inmunoprecipitadas de células HaCaT procesadas por esta misma técnica (Fig. 11).

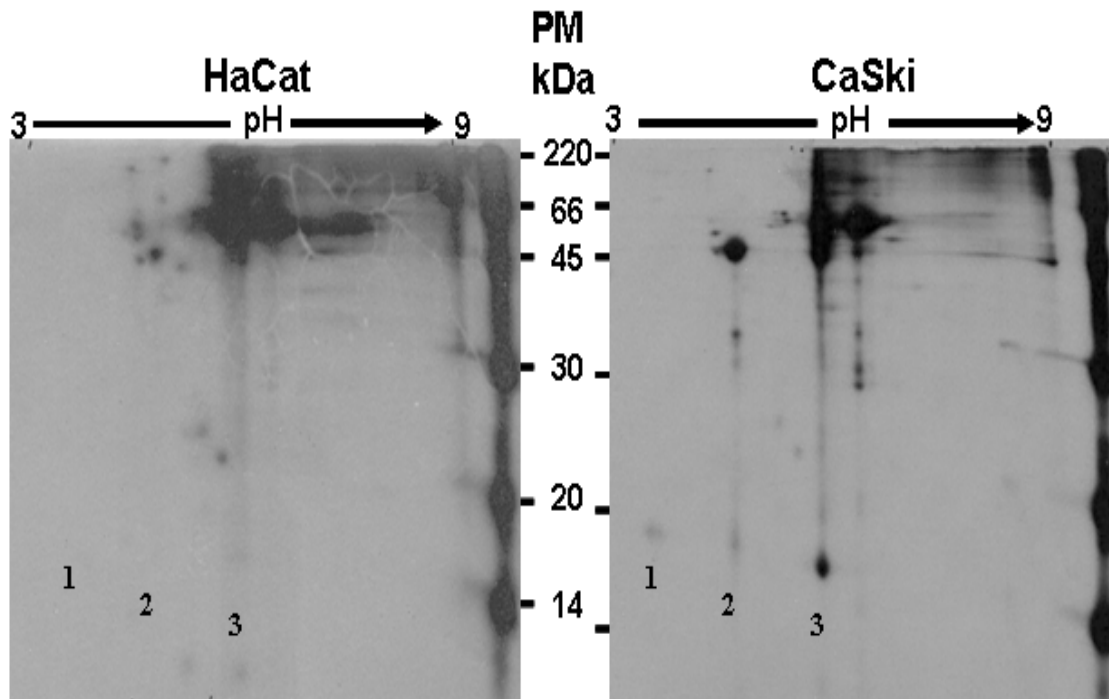


Figura 11. Identificación del punto isoeléctrico (pI) de la proteína E7 de HPV-16. Células HaCaT y CaSki fueron marcadas durante 16 h con ^{35}S -Promix y fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-E7 C24. Las muestras inmunoprecipitadas se corrieron en gel-2D y las proteínas fueron visualizadas por autorradiografía en película Kodak X-OMat. En células CaSki (derecha) se observa una banda de E7 con un peso molecular de 17.5 kDa con un punto isoeléctrico de 4.68 (1), una banda con un peso molecular de 17 kDa con pI de 6.18 (2) y otra banda de 16 kDa con pI de 6.96 (3).

VI.8 Detección de la distribución de E7 por inmunofluorescencia

Una vez identificados los pesos moleculares y punto isoelectrico de las distintas formas de E7 que son capaces de detectar los anticuerpos utilizados, decidimos llevar a cabo la determinación del patrón de distribución de E7 a nivel subcelular por la técnica de inmunofluorescencia en células CaSki y HaCaT. En las células incubadas con los anticuerpos policlonales 6563 y C-89 se observó a E7 simultáneamente en núcleo y citoplasma, aunque su distribución fue mayor en el núcleo. Sin embargo, también se observaron células con la presencia de E7 solo en el núcleo (Fig. 12). A diferencia de estos anticuerpos, el policlonal C-24 solo detectó a E7 en el citoplasma.

Al realizar el mismo ensayo de inmunofluorescencia con los anticuerpos monoclonales de ratón, observamos que el anticuerpo monoclonal B4 sólo mostró a E7 en el citoplasma y en experimentos de colocalización se observó que la señal de localización de E7 con este anticuerpo colocaliza con calnexina (marcador de RE), lo que sugiere que esta fracción de E7 se localiza en retículo endoplásmico rugoso (Fig. 13). Por otra parte, el anticuerpo comercial ED17 detectó a E7 ligeramente en el citoplasma y con mayor intensidad en núcleo, lo cual pudimos comprobar en nuestros experimentos de colocalización con la proteína nuclear p21 (residente en el núcleo) (Fig. 13).

Por otro lado, el anticuerpo monoclonal D11 mostró un patrón de tinción de E7 similar al de B4. Al analizar los experimentos de inmunofluorescencia, realizada con los diferentes marcadores celulares, se identificó que una fracción

pequeña de E7 colocalizó con calnexina (Fig. 13, panel superior). Sin embargo, este mismo anticuerpo detectó a la proteína E7 en el aparato de Golgi, debido a que fue capaz de colocalizar la señal del anticuerpo con el marcador GM-130 residente de Golgi (Fig. 14, panel inferior). Estos resultados demuestran que la proteína E7 es reconocida de manera distinta por los diferentes anticuerpos, los cuales reconocen epítopos diferentes cuya exposición es conferida por algún cambio conformacional, aparentemente asociado al compartimiento subcelular en el que se encuentra la proteína E7.

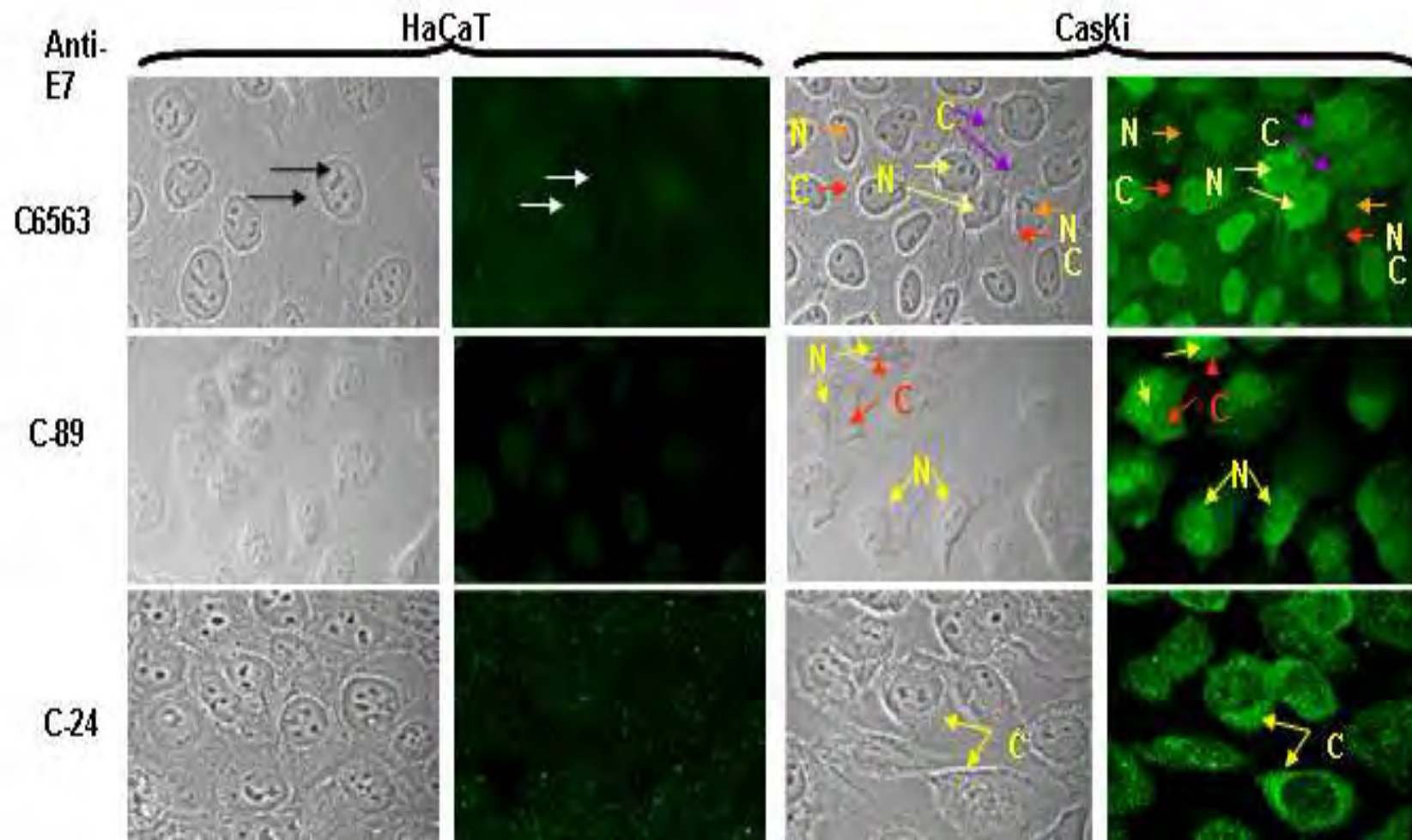


Figura 12. Localización subcelular de E7 de HPV 16 por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos policlonales anti-E7. Las células HaCaT o CasKi fueron fijadas y se incubaron 16 h con los anticuerpos anti-E7. Después se incubaron con el anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo Alexa 488 (verde) y se montaron en PBS-glicerol 50%. Los diferentes sueros policlonales de conejo que se utilizaron fueron C6563, C89 y C24. Fotografías de cortes celulares tomadas con microscopio confocal, 1000X.

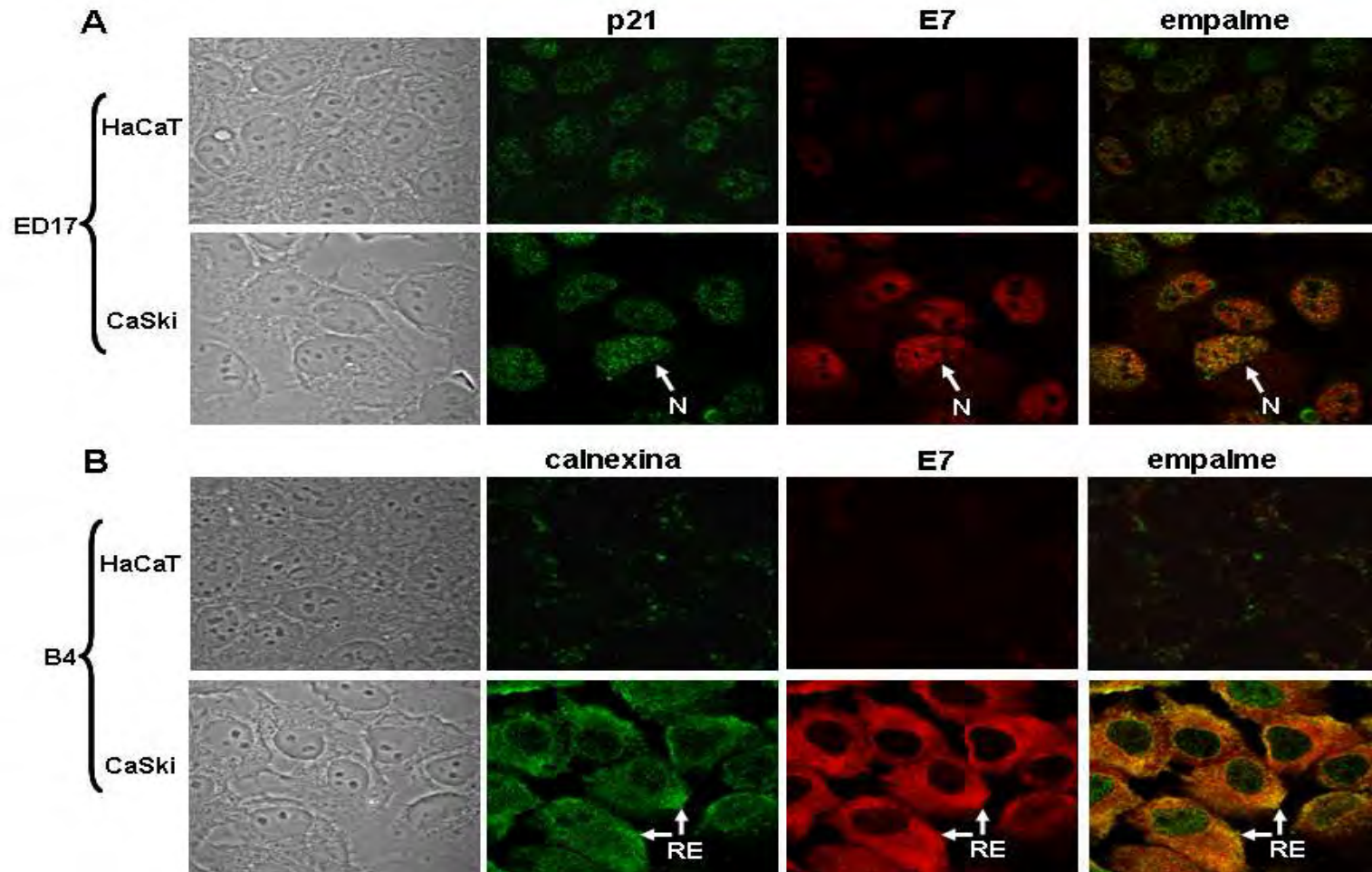


Figura 13. Distribución de la proteína E7 a nivel subcelular identificada por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales. Las células HaCaT o CaSki fueron fijadas e incubadas con el anticuerpo anti-E7 ED17 y anti-p21 (panel A) ó con el anticuerpo monoclonal B4 y anti-calnexina (panel B) y se procesaron para inmunofluorescencia. Los anticuerpos monoclonales anti-E7 fueron visualizados con el segundo anticuerpo Alexa 594 (rojo) y los anticuerpos de conejo (anti-calnexina y anti-p21) fueron detectados con el segundo anticuerpo Alexa 488 (verde). Fotografías de cortes celulares tomadas con microscopio confocal, 1000X.

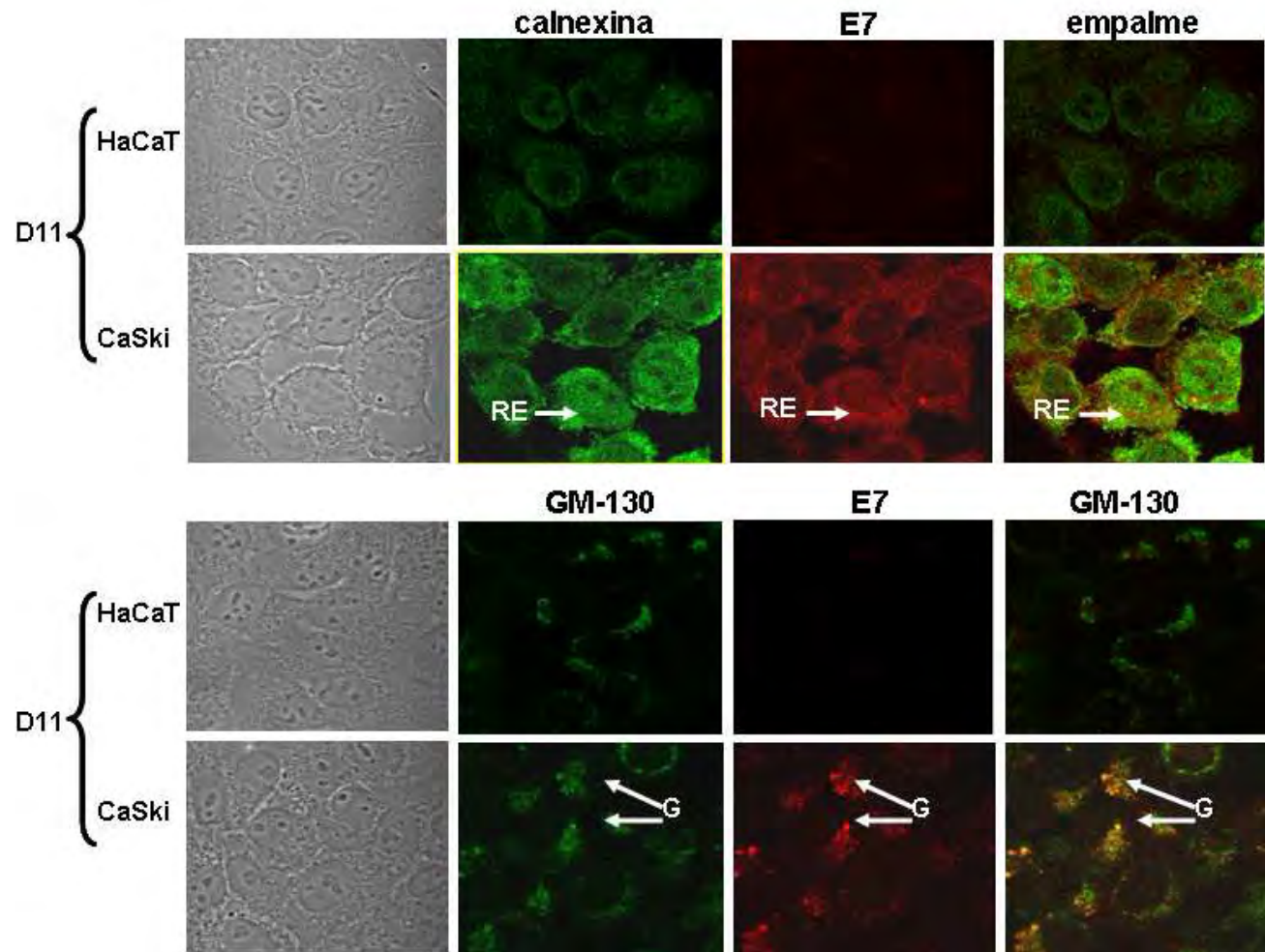


Figura 14. Distribución de la proteína E7 a nivel subcelular identificada por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo monoclonal D11. Las células HaCaT o CaSki fueron fijadas y se procesaron por inmunofluorescencia. Los anticuerpos anti-E7 fueron visualizados con el segundo anticuerpo Alexa 594 (rojo) y el anticuerpo anti-calnexina fue detectado con Alexa 488 (verde). La inmunodetección del GM-130 fue llevada a cabo con un anticuerpo anti-GM-130 acoplado a FITC. Fotografías de cortes celulares tomadas con microscopio confocal, 1000X.

VI.9 Determinación de la cinética de expresión de la proteína E7 en células Cos-7 transfectadas con pcDNA-E7

Una vez determinada la localización subcelular de E7 en células CaSki decidimos evaluar la cinética de expresión de esta proteína en un sistema de expresión transitoria en células Cos-7 transfectadas con el plásmido pCDNA-E7. Este sistema tiene la ventaja sobre células CaSki de no ser constitutivo, por lo que podría ser más apropiado para seguir la cinética de expresión de E7 en células vírgenes sin exposición previa a esta proteína. Se realizaron transfecciones transitorias en células Cos-7 con el plásmido pcDNA-E7 y se cultivaron por diferentes tiempos para observar la síntesis de la proteína. Las células se fijaron con p-formaldehído, se permeabilizaron con saponina o tritón y se procesaron para inmuno-fluorescencia. Al realizar la inmunofluorescencia con el anticuerpo policlonal C89, el cual reconoce 2 isoformas de E7 por inmunoprecipitación y 3 isoformas en geles 2D, los resultados mostraron que la proteína E7 fue detectada por primera vez a las 16 h en citoplasma, mismo patrón que es observado hasta las 24 h después de la transfección, sin embargo, para las 48 h la proteína se observó solo en el núcleo (Fig. 15 e inclusive se observan algunas estructuras, muy bien definidas, que se asemejan al nucleolo y que anteriormente ya fueron reportadas (Zatsepina et al., 1997).

En estos experimentos no se logró detectar a E7 en lapsos de tiempo menores a 16 h, ni mayores a 48 h después de la transfección, por lo que los experimentos solo se llevaron a cabo hasta 48 h. Otro aspecto importante de denotar es que E7 no se observó simultáneamente en ambos compartimientos

como ocurrió con las inmunofluorescencias de células CaSki incubadas con este mismo anticuerpo (Fig. 11).

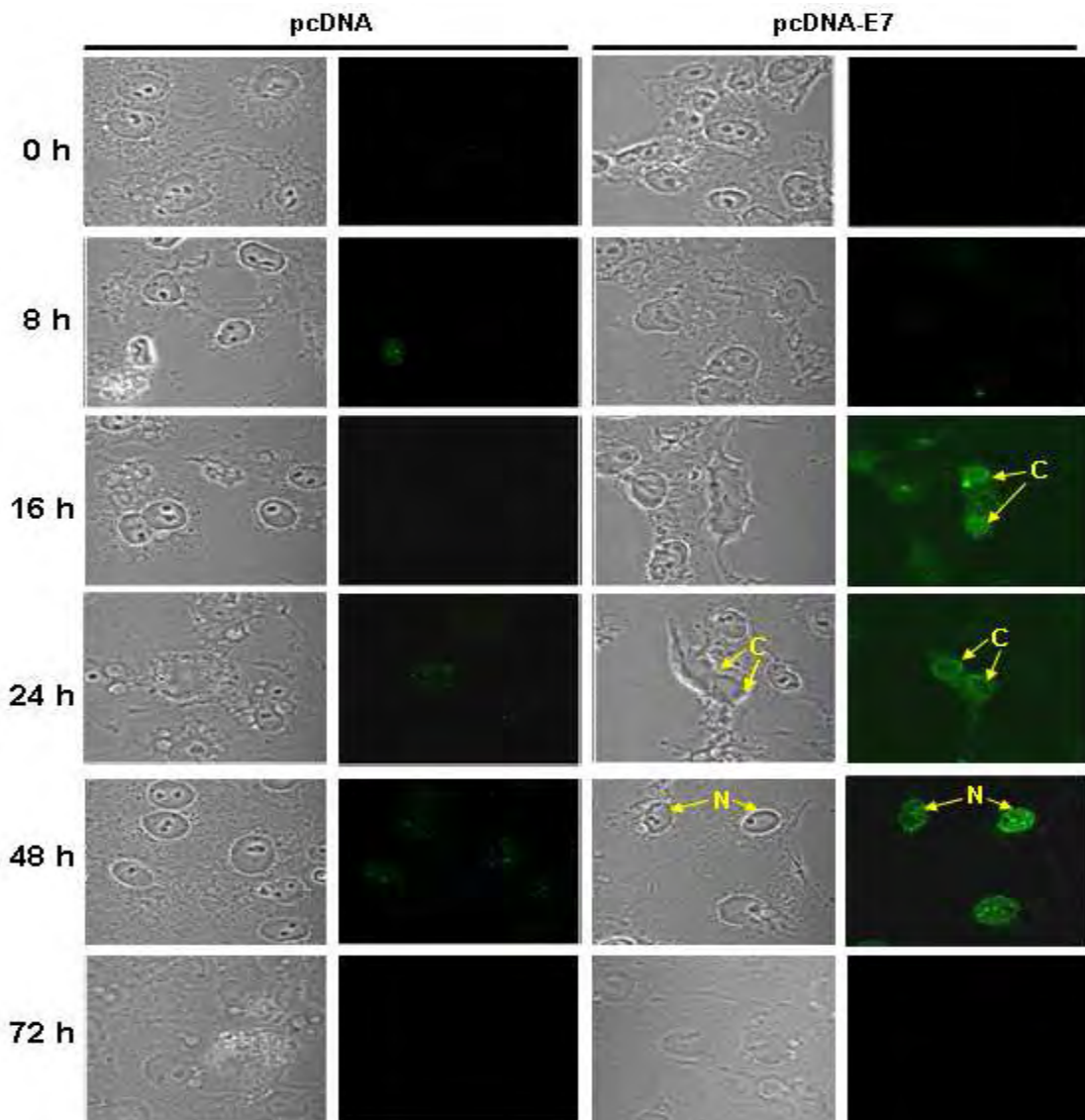


Figura 15. Transfección transitoria y seguimiento de la expresión de la proteína E7 en células Cos-7 transfectadas con pcDNA o pcDNA-E7. Las células fueron fijadas, se incubaron con el anticuerpo de conejo C-89 y después se incubaron con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo Alexa 488. Fotografías de cortes celulares tomadas con Microscopio confocal, 1000X. (C) Citoplasma; (N) Núcleo, (n) nucleolo.

Posteriormente se llevaron a cabo las inmunofluorescencias de células transfectadas transitoriamente con anticuerpos monoclonales D11 (señal en RE

y Golgi) y ED17 (señal en núcleo). Los resultados obtenidos de estos experimentos mostraron que E7 sólo fue localizada en el citoplasma a las 16 y 24 h con el anticuerpo D11. Por otro lado, el anticuerpo ED17 detectó a esta proteína en núcleo a las 24 h y a las 48 h también se observó pero menor intensidad (Fig. 16). Nuestros experimentos de las transfecciones tuvieron una eficiencia de alrededor del 30%, y en cada uno de ellos se obtuvieron los mismos resultados.

Estas observaciones nos permiten sugerir que E7 se encuentra en citoplasma después de ser sintetizada, mantiene su expresión por un periodo de 6 horas, después es translocada hacia el núcleo y deja de ser expresada antes de las 72 horas. Las células Cos-7 transfectadas con el vector vacío no mostraron ninguna señal en los diferentes tiempos de transfección ni cuando fueron incubados con los diferentes anticuerpos monoclonales y policlonales.

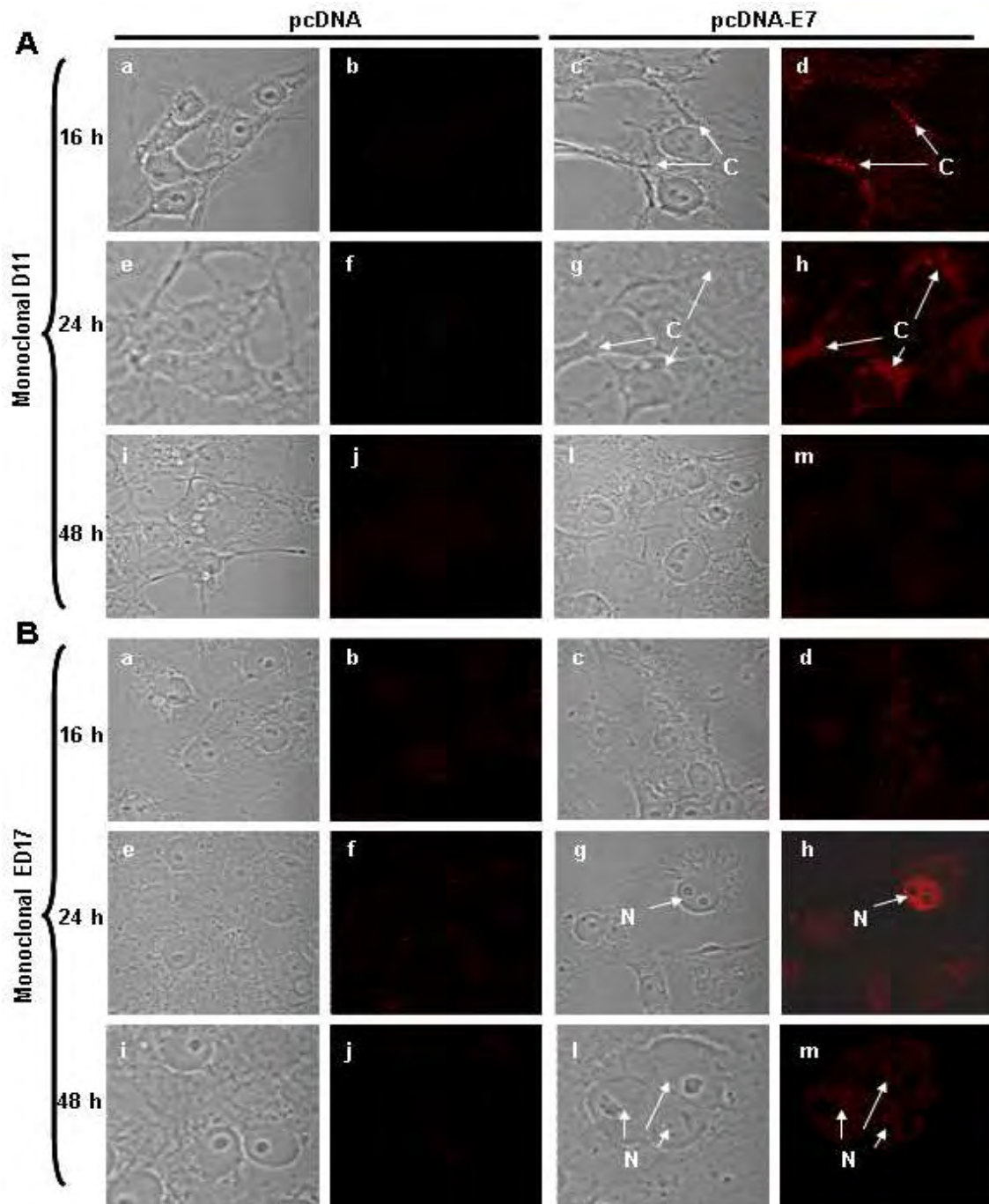


Figura 16. Transfección transitoria y seguimiento de la expresión de la proteína E7 con anticuerpos monoclonales. Las células Cos-7 fueron transfectadas con pcDNA o pcDNA-E7 e incubadas con anticuerpo D11 para visualizar la proteína E7 en citoplasma (A). Alternativamente las células fueron incubadas con el anticuerpo ED17 para visualizar a E7 en el núcleo (B). En ambos casos se procesaron para inmunofluorescencia. Fotografías de cortes celulares tomadas con Microscopio confocal, 1000X.

VII. Discusión

La proteína E7 de HPV es una parte importante en el proceso de transformación celular y ha sido objeto de muchos estudios para determinar su función en el proceso canceroso. Se ha determinado que E7 interactúa con las proteínas pRb, p107 y p130 involucradas en el control del ciclo celular y con algunos factores de transcripción celular, entre otras proteínas de importancia biológica. Todas estas proteínas con las que interactúa E7 se encuentran en el núcleo, sin embargo, diferentes investigaciones demuestran que E7 se encuentra distribuida tanto en el núcleo como en citoplasma. Esta distribución subcelular hace suponer que existen diferentes isoformas de E7 que pueden estar presentes en uno u otro compartimiento de la célula. Por tal motivo, nos enfocamos a identificar la presencia de diferentes isoformas de E7 en células CaSki a través de diversas técnicas de detección con la ayuda de anticuerpos monoclonales y policlonales (producidos en nuestro laboratorio) dirigidos contra diferentes epitopos de la proteína E7 de HPV 16.

En nuestros experimentos de inmunoprecipitación determinamos la existencia de 2 isoformas de E7 con peso molecular de 17 y 16 kDa que pueden ser observadas mediante diferentes técnicas de detección. En estudios previos se demostró que la proteína E7 de células CaSki y SiHa tiene el mismo peso molecular y su vida media es de 55 y 70 min, respectivamente (Smotkin and Wettstein 1987). En nuestros experimentos de pulso y caza observamos este mismo comportamiento de la vida media en dos proteínas E7 provenientes de una misma línea celular (células CaSki) pero con diferente peso molecular.

Durante el seguimiento de su proceso de síntesis, observamos que E7 es sintetizada inicialmente como una proteína de 17 kDa con una vida media de 50 min, la cual es posteriormente procesada a otra de 16 kDa con una vida media de 70 min. Estos resultados sugieren que E7 pudiera sufrir alguna modificación post-traducciona que cambie su conformación y peso molecular.

De acuerdo a su secuencia de aminoácidos, E7 posee un punto isoeléctrico (pI) de 4.05, sin embargo, en experimentos previos con proteínas recombinantes producidas en bacterias se observó que el pI de estas fue de 5.4 (Pahel et al., 1993). En estudios sobre E7 de HPV 18 sintetizada *in vitro* a partir de su cDNA o inmunoprecipitada de células HeLa se observaron 3 o 4 bandas con diferentes pIs pero aparentemente con un peso molecular semejante (Roggenbuck et al., 1991). Sin embargo, en nuestros experimentos al determinar el pI de las isoformas de E7 de células CaSki identificamos tres diferentes bandas con puntos isoeléctricos de 6.96 (E7b), 6.18 (E7a) y 4.68 (E7a1), pero cada una de ellas con diferente peso molecular (16, 17 y 17.5 kDa, respectivamente).

La visualización de una tercera banda en nuestros experimentos de geles-2D fue algo sorprendente que posiblemente se relaciona con su constitución fisicoquímica. En estudios sobre proteína recombinante se encontró que E7 es resistente a la desnaturalización térmica y a los detergentes como el SDS, también se observó que su estructura residual persistente le proporciona un comportamiento electroforético anómalo (Alonso et al., 2002; 2004). Por otra

parte, se ha demostrado que la proteína E7 purificada forma oligómeros y tiende a ser más soluble en presencia de urea; además, se le observa un peso molecular más cercano a su peso teórico cuando es separada en geles que contienen urea 8 M, pero su comportamiento se vuelve anómalo cuando es separada en geles desnaturizantes independientemente de que la proteína se haya solubilizado en presencia de urea (Alonso et al., 2002; 2004). Es posible que la presencia de estas características nos impidieron visualizar la isoforma de 17.5 kDa en nuestros experimentos de pulso y caza. Sin embargo, en los ensayos de isoelectroenfoque las proteínas son disueltas en amortiguador y separadas en gel de poliacrilamida que contienen urea 8 M, lo cual posiblemente permitió la completa desnaturización y solubilización de la proteína, de manera que se pudieron observar las 3 isoformas de E7 visualizadas anteriormente en E7 de células HeLa (Roggenbuck et al., 1991).

Dentro de las modificaciones ya documentadas en E7 se encuentra la fosforilación de las serinas 31, 32 y 71 (Smotkin y Wettstein 1987, Storey et al., 1990, Massimi & Banks, 2000). En nuestros experimentos de fosforilación, visualizamos la presencia de una banda de peso molecular de 17.5 kDa, proteína que podría ser la misma que fue detectada en nuestros experimentos de isoelectroenfoque con un peso molecular de 17.5 kDa o tal vez sea la de 17 kDa observada en nuestros experimentos de inmunoprecipitación. Esta diferencia en su peso molecular tal vez se debe al cambio en su carga que propicia un movimiento migratorio más lento en los geles de poliacrilamida. En el ensayo de fosforilación en gel, la proteína identificada incrementó su fosforilación

de manera gradual con respecto al tiempo, sin embargo, no se logró separar o visualizar más de una isoforma. Experimentos en otros laboratorios han demostrado que esta modificación (fosforilación) reduce de manera muy importante la detección de E7 por algunos anticuerpos, lo cual indica que dicha proteína puede presentar características antigénicas distintas cuando esta fosforilada (Sun et al., 1998). Por otra parte, esta modificación (muy posiblemente) favorece su interacción con otras proteínas celulares que podrían ocupar y ocultar los epítomos antigénicos que pudieran reconocer los anticuerpos y así evitar ser detectadas. Aunado a lo anterior, existen diferentes reportes que demuestran que las características hidrofóbicas de E7 propician un plegamiento distinto cuando es extraída de su medio ambiente, lo cual permite exponer distintos epítomos, impidiendo su inmunodetección (Alonso et al., 2002; 2004).

Hasta ahora, la única modificación postraduccional que se ha observado en E7 es la fosforilación, sin embargo, en nuestros experimentos de inmunofluorescencia en estas mismas células logramos visualizar que una fracción de E7 se encuentra en retículo endoplásmico y otra en aparato de Golgi. De acuerdo con esto, es posible que durante su tránsito a través de estos compartimientos subcelulares E7 pueda sufrir alguna otra modificación postraduccional que podría cambiar sus características fisicoquímicas. De acuerdo a su secuencia de aminoácidos E7 puede ser glicosilada en la asparagina 29, posee dos sitios que pueden ser sulfatados (tirosinas 23 y 26), contiene un sitio consenso CAAX para la isoprenilación en la región carboxilo-terminal y además puede fosforilarse en 4 residuos más independientemente de

las serinas 31, 32 y 71 ya reportadas (Smotkin et al., 1987, Massimi & Banks, 2000). Hasta el momento no sabemos si todas estas modificaciones ocurren en E7, sin embargo, son factores que podrían influir en la carga neta de la proteína y en su comportamiento electroforético y por ello la presencia de isoformas que observamos con los diferentes anticuerpos, sin embargo, más experimentos son necesarios para demostrar esta parte.

La especificidad de los anticuerpos para identificar las diferentes isoformas de E7 por diversas técnicas es muy importante y esto se hizo muy evidente cuando observamos que estos anticuerpos pueden reconocer un patrón de distribución distinto en células CaSki cuando fueron analizadas por inmunofluorescencia. Nosotros observamos que el anticuerpo policlonal C-24 solo reconoce a E7 en el citoplasma, mientras que C-89 localiza a la proteína en núcleo y citoplasma. Sin embargo, C24 logra inmunoprecipitar las dos isoformas E7a y E7b (17 y 16 kDa, respectivamente) al igual que el policlonal C-89. Por su parte, los anticuerpos monoclonales reconocieron a la proteína E7 en el citoplasma (RE y Golgi) y sólo fueron capaces de detectar a la proteína E7b de 16 kDa cuando se probaron por inmunoprecipitación y Western blot.

De acuerdo con los resultados obtenidos en células Cos-7 transfectadas con pcDNA-E7, a las 16 y 24 h la proteína E7 se encuentra en la zona perinuclear. Este patrón de inmunofluorescencia es muy semejante al reportado anteriormente en donde se demostró que E7 puede encontrarse en retículo endoplásmico, citoplasma y la envoltura nuclear en donde puede activar

alostéricamente a la enzima α -glucosidasa (Zwerschke et al., 2000). La proteína E7 que fue detectada con el anticuerpo monoclonal D11 en Aparato de Golgi, es posible que esté cumpliendo esa función y/o tal vez podría ser su vía de síntesis y tránsito para llegar al núcleo en donde interacciona con diferentes proteínas involucradas en el control del ciclo celular. Estos estudios también nos permitieron observar a E7 en el núcleo y en nucleolos en células transfectadas después de 48 h. Estas estructuras fueron visualizadas anteriormente en estudios de inmunofluorescencia en los cuales se demostró que E7 se asocia fuertemente al nucleolo en células en la fase G₂/M (Zatsepina et al., 1997), en donde tal vez se encuentra fosforilada y en asociación con una cinasa de la histona H1 (Davies et al., 1993). En la H1 se lleva a cabo un proceso de fosforilación en la fase S, pero el principal evento es la adición tardía de estos grupos durante la mitosis, lo cual aparentemente está involucrado en la condensación de la cromatina para favorecer la división celular y el avance del ciclo (Lewin, 2001). Por otra parte, se ha reportado que Rb1 se acumula en el nucleolo donde se une al factor auxiliar UBF inhibiendo la activación de la RNA polimerasa I (Pol I) (Cavanaugh et al 1995). Rb1 también es blanco de la proteína E7, y se ha demostrado que esta interacción libera el efecto inhibitorio de la actividad transcripcional de Pol I. La RNA Pol I reside en el nucleolo y es la responsable de transcribir el RNAr, dando cuenta de la mayor parte de la síntesis del RNA celular, lo cual puede ser necesario para una máxima síntesis proteica viral y celular (Zatsepina et al., 1997). Su localización nuclear ha sido comprobada por diferentes estudios, sin embargo, no posee ningún sitio

consenso para ser transportada hacia el núcleo. Su translocación hacia este compartimiento depende de la presencia de Ran-GTP pero no interaccionan directamente y se ha observado que las importinas Kap β 1 y Kap β 2 no están involucradas en este proceso. Algunos investigadores han sugerido la posible existencia de algún acarreador que lleve a cabo esta función de transporte hacia el núcleo, aunque ya se ha demostrado que su importación no depende de su interacción con las proteínas pRb, p130, y p107 (Angeline et al., 2003).

VIII. Conclusiones

Los bajos niveles de detección de la proteína E7 de HPVs de alto riesgo aunado a su corta vida media complican su estudio estructural o conformacional. Muchos de los conocimientos obtenidos sobre E7 se basan en la producción de proteína *in vitro* o en forma recombinante expresada en bacteria o levadura. Sin embargo, las modificaciones postraduccionales que sufren algunas proteínas, proceso observado solo en las células eucariotas, lo cual altera su peso molecular y punto isoeléctrico no han sido estudiadas en E7.

A pesar de estas dificultades, nuestros estudios sobre E7 se basaron en experimentos realizados en células CaSki y en células Cos-7 transfectadas con este gen y, de acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

1) Se identificaron 3 isoformas de E7 con peso molecular y pI distinto; estas proteínas pueden expresarse simultáneamente, por lo tanto, la presencia de diferentes isoformas de E7 no solo se debe al comportamiento electroforético anómalo, sino que existen isoformas de E7 con diferentes características estructurales que le confieren diferente peso molecular y pI; dichas isoformas solo pudieron ser identificadas a través de anticuerpos policlonales que muy posiblemente reconocen diferentes epitopos. También se observó que la especificidad de los anticuerpos puede cambiar cuando E7 es identificada por diferentes técnicas. Independientemente de su localización citoplásmica y nuclear, E7 también transita por retículo endoplásmico y aparato de Golgi,

proceso por el cual dicha proteína podría sufrir alguna modificación postraducciona que se manifieste en sus propiedades fisicoquímicas.

2) E7 es una proteína multifuncional y es necesario realizar más estudios que nos permitan identificar con certeza que otras modificaciones postraduccionales existen además de la fosforilación. Un mayor conocimiento sobre su estructura nos permitirá entender su actividad biológica y molecular durante el proceso canceroso ocasionado por HPV 16. A su vez, estos conocimientos podrían permitir la identificación de sitios blancos que puedan ser reconocidos por anticuerpos anti-E7 para el desarrollo de alguna vacuna que permita detener el desarrollo del cáncer producido por los HPVs de alto riesgo.

IX. Perspectivas que se derivan a partir de este trabajo

1) Localización subcelular de las isoformas de E7. Dentro de las perspectivas que se tienen y que se podrían realizar a partir de éste trabajo se puede mencionar la determinación de la localización subcelular de cada una de las isoformas de E7 por medio de gradiente celular por Percoll o gradiente de sacarosa. Este ensayo nos permitirá determinar específicamente la fracción subcelular en las que se encuentren cada una de las isoformas de la proteína E7 al ser inmunoprecitadas con anticuerpos anti-E7.

2) Identificación de modificaciones postraduccionales. También es necesario determinar que posibles modificaciones postraduccionales sufre E7 además de la fosforilación. Dentro de estos cambios estructurales se encuentran la carboxi-metilación, sulfatación, isoprenilación y la glicosilación. La presencia de estas estructuras en la cadena de aminoácidos de E7 pueden ser evaluadas marcando células CaSki con compuestos radiactivos como (³H-Metil)-Metionina (metilación), ³⁵S-Sulfato (sulfatación) o ³H-Mevalonato (isoprenilación). La proteína E7 sería inmunoprecipitada y separada por SDS-PAGE y las bandas se podrán visualizar por autorradiografía.

En la detección de la glicosilación en E7, las células CaSki serían marcadas metabólicamente con ³⁵S-ProMix y posteriormente se extraerían las proteínas para ser inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-E7. En este caso las proteínas se someten a digestiones enzimáticas (digestión con NANAsa, EndoH y Alfa-manosidasa) para identificar la presencia de diferentes carbohidratos.

Posteriormente todas las muestras se correrían en un gel de poliacrilamida y se procesarían para autorradiografía.

Si la proteína E7 contiene alguna de estas modificaciones estas técnicas pueden llevarse a cabo en combinación con fraccionamiento celular para ubicar la localización de E7 modificada.

3) Identificación de sitios de fosforilación. Es de gran importancia determinar si E7 es fosforilada en algún otro sitio (treoninas 7, 64 78 y la serina 95) independientemente de los tres sitios ya reportados anteriormente. Para tal efecto se pueden realizar mutaciones puntuales en los sitios que codifican a estos aminoácidos en la secuencia del DNA de *E7*, la cual a su vez estará fusionada a un péptido conocido (Cola de histidinas, hemaglutinina, coranfenicol acetiltransferasa, otros) que nos permita detectar la expresión de la proteína independientemente de los anticuerpos anti-E7. Esta construcción de DNA será expresada en células Cos-7 incubadas con medio de cultivo complementado con [³²P]-ortofosfato. Las mutaciones en el gen *E7* propiciarán que la proteína sea o no afectada en su fosforilación y se observarán estos cambios en el patrón de migración y punto isoelectrico por electroforesis en gel de poliacrilamida, isoelectroenfoque y autorradiografía.

4) Detección de las isoformas de E7 en sincronía con el ciclo celular y su interacción con proteínas celulares. Por otra parte, se pueden realizar estudios para determinar si cada una de las isoformas se expresan de manera indistinta o simultáneamente en sincronía con el ciclo celular. En estos

experimentos el ciclo celular de células CaSki será sincronizado en la fase G1 con la ayuda de algún fármaco. Posteriormente el ciclo celular se libera y las proteínas son extraídas a diferente tiempo. La proteína E7 sería inmunoprecipitada para observar su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida para identificar las respectivas isoformas. Simultáneamente al experimento, otras células serán cosechadas y analizadas por la técnica del FACS para determinar en que fase del ciclo celular se encuentran las células al momento de extraer las proteínas. Después de haber identificado la síntesis de cada una de las isoformas conforme a la cronología del ciclo celular, se harán experimentos de coimmunoprecipitación para determinar con que proteínas celulares interactúa cada una de ellas en las diferentes fases.

Los estudios antes mencionados son de gran importancia ya que nos pueden ayudar a identificar las características fisicoquímicas de E7 para entender la actividad biológica que desempeña cada una de las isoformas de E7 durante el proceso de transformación celular.

X. Bibliografía.

1. **Alonso LG, García-Alai MM, Nadra AD, Lapeña AN, Almeida FL, Gualfetti P, Prat-Gay GD.** High-Risk (HPV16) Human Papillomavirus E7 oncoprotein is highly stable and extended, with conformational transitions that could explain its multiple cellular binding partners. *Biochemistry*, 2002; 41: 10510-10518.
2. **Alonso LG, Garcia-Alai MM, Smal C, Centeno JM, Iacono R, Castano E, Gualfetti P, de Prat-Gay G.** The HPV16 E7 viral oncoprotein self-assembles into defined spherical oligomers. *Biochemistry*, 2004; 43(12):3310-7.
3. **Androphy EJ, Schiller JT, Lowy DR.** Identification of the protein encoded by the E6 transforming gene of bovine papillomavirus. *Science*, 1985; 230(4724):442-5.
4. **Angeline M, Merle E, Moroianu J.** The E7 oncoprotein of high-risk human papillomavirus type 16 enters the nucleus via a nonclassical Ran-dependent pathway. *Virology*, 2003; 317:13-23.
5. **Antinore JM, Birrer JM, Patel D, Nader L, McCance JD.** The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the family of transcription factors. *The EMBO J.*, 1996, 15: 1950-1960.
6. **Armbruster-Moraes E, Ioshimoto L, Leao E and Zugaib M.** Prevalence of high-risk HPV in the lower genital tract of Brazilian gravidas. *Int J Gynecol Obstet.*, 2000; 69: 223-27.
7. **Armstrong DJ, Roman A.** The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1993. 14; 192: 1380-1387.
8. **Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM.** Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.*, 1987; 61: 962-971.
9. **Banks L, Matlashewski G, Pim D, Churcher M, Roberts C, Crawford L.** Expression of human papillomavirus type 6 and type 16 capsid proteins in

- bacteria and their antigenic characterization. *J Gen Virol.* 1987; 68 (Pt 12):3081-9.
10. **Barbosa MS, Edmonds C, Fisher C, Schiller JD, Douglas RL, Vousden KH.** The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1A and SV40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II Phosphorylation. *EMBO J.*, 1990; 9: 153-160.
 11. **Belle A, Tanay A, Bitincka L, Shamir R, O'Shea EK.** Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2006. 103: 13004-13009
 12. **Berumen J, Villegas N.** Vacunas terapéuticas contra el cáncer del cuello uterino. *Salud Pública Méx.*, 1997; 39: 288-297.
 13. **Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L.** Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J.*, 1994; 13: 5451-5459.
 14. **Boyer SN, Wazer DE, Band V.** E7 protein of human papillomavirus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.*, 1996; 56: 4620-4624
 15. **Bruce JL, Hurford RK Jr, Classon M, Koh J, Dyson N.** Requirements for cell cycle arrest by p16INK4a. *Mol Cell.* 2000; 6: 737-742
 16. **Castellsague X, Munoz N.** Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr.*, 2003; 31: 20-28.
 17. **Cavanaugh AH, Hempel WM, Taylor LJ, Rogalski V, Todorov G and Rothblum LI.** Activity of RNA polymerase I transcription factor UBF blocked by Rb gene product. *Nature.* 1995; 374: 177-180.
 18. **Chan PK, Chan MY, Li WW, Chan DP, Cheung JL, Cheng AF.** Association of human beta-herpesviruses with the development of cervical cancer: bystanders or cofactors. *J Clin Pathol.*, 2001; 54: 48-53.
 19. **Choe J, Vaillancourt P, Stenlund A, Botchan M.** Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: structural and functional analysis of new viral cDNAs. *J Virol.* 1989; 63: 1743-1755.

20. **Chong T, Apt D, Gloss B, Isa M, Bernard HU.** The enhancer of human papillomavirus type 16: Binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1 y AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J. Virol.*, 1991; 65: 5933-5943.
21. **Chow L, Hirichika H, Nasser M, Stoler M, Wolinski S, Chin M.** Human papillomavirus gene express in papillomavirus. *Cancer Cells*, 1987; 5: 55-72
22. **Clemmens KE, Brent R, Gyiuris J, Münger K.** Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein *in vivo*. *Virology*, 1995; 214: 289-293.
23. **Cleveland DW, Fischer SG, Kirschener MW, Laemmli, U.K.** Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1977; 252: 1102-1106
24. **Crook T., Tiddy J.A. and Vousden K.H.** Dagradaation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell.* 1991; 67: 547-556.
25. **Conrad M, Bubb VJ, Schlegel R.** The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore- forming protein. *J. Virol.*, 1993; 67: 6170-6178.
26. **Cosette M. Wheeler.** Preventive vaccines for cervical cancer. *Salud Pública Méx* 1997;39:283-287.
27. **Dalal S, Gao QS, Androphy EJ, Band V.** Mutational analysis of human papillomavirus type 16 E6 demonstrates that p53 degradation is necessary for immortalization of mammary epithelial cells. *J. Virol.* 1996; 70: 683-688.
28. **Davies R, Hicks R, Croot T, Morris J, Vousden KH.** Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinasa and with p-107 through sequences necessary for transformation. *J Virol.* 1993; 67: 2521-2528
29. **Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF, Soutehrn S, Cuthill S, Millar JB, Doorbar J.** Identification of a G2 arrest domain in the E1^E4 protein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.*, 2002; 76: 9806-9818.

30. **Doorbar J, Parton A, Hartley K, Banks L, Crook T, Stanley M, Crawford L.** Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology*. 1990; 178: 254-62.
31. **Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L.** Specific interaction between HPV16 E5⁺E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 1991; 352: 824-827.
32. **Doorbar J, Foo C, Coleman N, Medcalf E, Hartley O, Prospero T, Naphthine S, Sterling J, Winter G, Greffin H.** Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high affinity synthetic Fabs to E4. *J. Virol.*, 1997;238:40-52
33. **Fiedler M, Campo-Fernandez B, Laich A, Moser B, Stockl P, Jansen-Durr P, Zwerschke W.** Purification and characterisation of the E7 oncoproteins of the high-risk human papillomavirus types 16 and 18. *J Virol Methods*. 2006; 134: 30-5.
34. **Fields BN, Knipe RM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B and Straus SE.** *Virology*. 4th ed, 2001; Lippincott Williams & Wilkins, USA. Fig. 66-2
35. **Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA.** Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*. 1997; 11: 2090-100.
36. **Gage JR, Meyers C, Wettstein FO.** The E7 proteins of the non-oncogenic human papillomavirus type b (HPV-6b) and the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other proteins. *J. Virol*. 1990 64: 723-730
37. **Ghosh KA, Smith KN, Stacey NS, Connor EM, Arrand JR and Stern LP.** Serological response to HPV in cervical dysplasia and neoplasia: correlation of antibodies to E6 with cervical cancer. *Int J Cancer* 1993, 53:591-596.
38. **Gius D, Grossman S, Bedel MA, Laimins L.** Inducible and constitutive enhancer domains in the coding region of human papillomavirus type 18. *J. Virol.*, 1988; 62:665-6672.

39. **Gonzalez SL, Stremlau M, He X, Basile JR, Münger K.** Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol.* 2001; 75: 7583-7591.
40. **Greenfield I, Nickerson J, Penman S, Stanley M.** Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 15: 11217-11221.
41. **Gross-Mesilaty S, Reisntein R, Bercovich B, Tobias KE, Schwartz AL, Kahana C, Ciechanover A.** Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of *Myc* proteins by the ubiquitin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 8058-8063
42. **Gutierrez L, Magee AI, Marshall CJ, Hancock JF.** Posttranslational processing of p21^{N-ras} is two-step and involves carboxy-methylation and carboxy-terminal proteolysis. *EMBO J* 1989; 8:1093-1098.
43. **Hancock JF, Marshall CJ, McKay IA, Gardner S, Houslay MD, Hall A, Wakelam MJ.** Mutant but not normal p21 ras elevates inositol phospholipid breakdown in two different cell systems. *Oncogene* 1988; 3: 187-193.
44. **Harlow E, Lane D.** Antibodies a Laboratory Manual. *United State of America,* 1988; pp: 139-283.
45. **Jeon S, Lambert PF.** Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 1654-1658.
46. **Kanda A, Zanma S, Watanabe S, Furuno A, Yoshiike K.** Two Immunodominant regions of the human Papillomavirus type 16 E7 protein are masked in the nuclei of monkey COS-1 cells. *Virology.* 1991. 182: 723-731.
47. **Kesis TD, Conolly DC, Hedrick L, Cho KR.** Expression of HPV 16 E6 or E7 increases integration of foreign ADN. *Oncogen* 1996; 13: 427-431.
48. **Kinoshita T, Shirasawa H, Shino Y, Moriya H, Desbarats L, Eilers M, Simizu B.** Transactivation of prothymosin alpha and c-myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein. *Virology.* 1997; 232: 53-61.

49. **Kleinberger T, Shenk T.** A protein kinase is present in a complex with adenovirus E1A proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88: 11143-11147.
50. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970, 227: 680-685
51. **Lee JO, Russo AA, Pavletich NP.** Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature.* 1998; 391: 859-865
52. **Lee D, Sohn H, Kalpana GV, Choe J.** Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulate replication of human papillomavirus DNA. *Nature.* 1999; 399(6735):487-491.
53. **Lehman CW, King DS, Botchan MR.** A papillomavirus E2 phosphorylation mutant exhibits normal transient replication and transcription but is defective in transformation and plasmid retention. *J Virol.* 1997; 71: 3652-3665.
54. **Lewin Benjamin.** *Genes VII.* 2001 Oxford University Press, USA. 7th edition. Pag.583, 844.
55. **Mal A, Poon RY, Howe PH, Toyoshima H, Hunter T, Harter ML.** Inactivation of p27Kip1 by the viral E1A oncoprotein in TGFbeta-treated cells. *Nature.* 1996; 380: 262-265
56. **Mal A, Chattopadhyay D, Ghosh MK, Poon RY, Hunter T, Harter ML.** p21 and retinoblastoma protein control the absence of DNA replication in terminally differentiated muscle cells. *J Cell Biol.* 2000; 149: 281-292.
57. **Massimi P, Pim D, Storey A, Banks L.** HPV-16 E7 and adenovirus E1a complex formation with TATA box binding protein is enhanced by casein Kinase II phosphorylation. *Oncogene* 1996. 12: 2325-2330.
58. **Massimi P, Banks L .** Differential phosphorylation of the HPV-16 E7 oncoprotein during the cell cycle. *Virology.* 2000; 276: 388-394.
59. **Massimi P, Pim D, Kuhne C, Banks L.** Regulation of the human papillomavirus oncoproteins by differential phosphorylation. *Mol Cell Biochem.* 2001; 227: 137-144.

60. **Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA.** A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol.* 1998; 72: 7407-7419.
61. **Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Durr P, Eigenbrodt E.** Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7. *Oncogene.* 2001; 20: 6891-6898.
62. **McBride AA, Bolen JB, Howley PM.** Phosphorylation sites of the E2 transcriptional regulatory proteins of bovine papillomavirus type 1. *J Virol.* 1989; 63: 5076-5085.
63. **McBride AA, Howley PM.** Bovine papillomavirus with a mutation in the E2 serine 301 phosphorylation site replicates at a high copy number. *J Virol.* 1991; 65: 6528-6534.
64. **Meyers C, Frattini MG, Hudson JB, Laimins LA.** Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science,* 1992; 257: 971-973.
65. **Milligan SG, Veerapraditsin T, Ahamet B, Mole S, Graham SV.** Analysis of novel human papillomavirus type 16 late mRNAs in differentiated W12 cervical epithelial cells. *Virology.* 2007; 360: 172-181.
66. **Munger K. and Phelps WC.** The human papillomavirus E7 protein as transforming and transactivating factor. *Biochem. Biophys. Acta.* 1993; 1155: 111-113.
67. **Münger K, Basile J, Duensing S, Eichten A, Gonzalez S, Grace M and Zacny V.** Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene.* 2001; 20: 7888-7898.
68. **Pahel G, Aulabaugh A, Short SA, Barnes JA, Painter GR, Ray P, Phelps WC.** Structural and functional characterization of the HPV16 E7 protein expressed in bacteria. *J Biol Chem.* 1993; 268: 26018-26025.
69. **Palacios-Mejía L, Rangel-Gómez G, Hernández-Avila M. and Lazcano-Ponce E.** Cervical cancer, a disease of poverty: Mortality differences between urban and rural areas in Mexico. *Salud Pública Méx.* 2003, 45: S315-S325

70. **Parkin DM, Bray F.** The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 2006;24 (Suppl 3):S11–S25.
71. **Pedroza-Saavedra A, Cruz A, Esquivel F, De La Torre F, Berumen J, Gariglio P, Gutiérrez L.** High prevalence of sera antibodies to Ras and to human papillomavirus type 16 E4 proteins in patients with pre-cancerous lesions from the uterine cervix. *Arch Virol* 2000; 145: 603-623.
72. **Pim D, Collins M, Banks L.** Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene*. 1992; 7: 27-32.
73. **Prokopczyk B, Cox JE, Hoffman D, Waggoner SE.** Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and non-smoker. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89: 868-873
74. **Roggenbuck B, Larsen PM, Fey SJ, Bartsch D, Gissmann L, Schwarz E.** Human papillomavirus type 18 E6*, E6, and E7 protein synthesis in cell-free translation systems and comparison of E6 and E7 in vitro translation products to proteins immunoprecipitated from human epithelial cells. *J Virol*. 1991; 65: 5068-5072.
75. **Sambrook J, Fritsch Maniatis T.** Molecular cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, second edition. United State of America.
76. **Sanders CM, Stern PL, Maitland NJ.** Characterization of human papillomavirus type 16 E2 protein and subdomains expressed in insect cells. *Virology*. 1995; 211: 418-433.
77. **Sankaranarayanan R, Budukh AM, Rajkumar R.** Effective screening programmes for cervical cancer in low- and middle-income developing countries. *Bull World Health Organ*. 2001; 79: 954-962.
78. **Sato H, Watanabe S, Furuno A, Yoshiike K.** Human papillomavirus type 16 E7 protein expressed in *Escherichia coli* and monkey COS-1 cells: immunoflorescence detection of the nuclear E7 protein. *Viol*, 1990; 170: 311-315

79. **Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A.** Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. 1985; 170: 111-114
80. **Schwartz S.** HPV-16 RNA processing. *Front Biosci*. 2008; 13: 5880-91.
81. **Selvey LA, Dunn LA, Tindle RW, Park DS, Frazer IH.** Human papillomavirus (HPV) type 18 E7 protein is a short-lived steroid-inducible phosphoprotein in HPV-transformed cell lines. *J. Gen. Virol*. 1994; 75: 1647-1653.
82. **Sherman L, Alloul N.** Human papillomavirus type 16 expresses a variety of alternatively spliced mRNAs putatively encoding the E2 protein. *Virology*. 1992; 191: 953-959.
83. **Sherman L, Alloul N, Golan I, Durst M, Baram A.** Expression and splicing patterns of human papillomavirus type-16 mRNAs in pre-cancerous lesions and carcinomas of the cervix, in human keratinocytes immortalized by HPV 16, and in cell lines established from cervical cancers. *Int J Cancer*. 1992; 50: 356-364
84. **Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM.** Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007; 121: 621-632.
85. **Smotkin D, Wettstein F.O.** The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *J. Virol*. 1987; 61: 1686-1689.
86. **Storey A, Almond N, Osborn K, Crawford L.** Mutations of the human papillomavirus type 16 E7 gene that affect transformation, transactivation and phosphorylation by the E7 protein. *J Gen Virol*. 1990; 71: 965-970.
87. **Straight SW, Herman B, McCance DJ.** The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J. Viorol.*, 1995; 69: 3185-3192.
88. **Sun-Ho K, Yonk-Ok Ch, Yong-Sang S, Hyo-Pyo L and Woo-Hyun Ch.** Identification of antigenic differences between the phosphorylated and non-

- phosphorylated forms of the E7 protein of human papillomavirus type 16. *J. Med Virol.* 1998, 54: 29-38.
89. **Tommasino M, Contorni M, Scarlato V, Bugnoli M, Maundrell K, Cavalieri F.** Synthesis, phosphorylation, and nuclear localization of human papillomavirus E7 protein in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene.* 1990; 93: 265-270.
90. **Tommasino M, Crawford L.** HPV E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle. *Bioassay.* 1995; 17: 509-518.
91. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76: 4350-4354.
92. **Tsao YP, Li LY, Tsai TC, Chen SL.** Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21 (WAF-1/SDI 1/CIP-1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. *J Virol.* 1996; 70: 7535-7539.
93. **Vaeteewoottacharn K, Chamutpong S, Ponglikitmongkol M, Angeletti PC.** Differential localization of HPV16 E6 splice products with E6-associated protein. *Virology.* 2005; 2:50.
94. **Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N.** Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999; 189:12-19.
95. **Wallin KL, Wiklund F, Luostarinen T, Angström T, Anttila T, Bergman F, Hallmans G, Ikkäheimo I, Koskela P, Lehtinen M, Stendahl U, Paavonen J, Dillner J.** A population-based prospective study of *Chlamydia trachomatis* infection and cervical carcinoma. *Int J Cancer.* 2002; 101:371-374.
96. **Wang HG, Draetta G, Moran E.** E1A induces phosphorylation of the retinoblastoma protein independently of direct physical association between the E1A and retinoblastoma products. *Mol Cell Biol.* 1991; 11: 4253-4265.
97. **World health organization.** Human Papillomavirus and HPV vaccines: *Technical information for policy-makers and health professional.* 2007

98. **Yang L, Li R, Mohr IJ, Clark R, Botchan MR.** Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. *Nature*. 1991; 353: 628-632.
99. **Yang DH, Wildeman AG, Sharom FJ.** Overexpression, purification and structural analysis of the hydrophobic E5 protein from human papillomavirus type 16. *Protein Expression & purification*. 2003, 30: 1-10
100. **Zatsepina O, Braspenning J, Robberson D, Hajibagheri MA, Blight KJ, Ely S, Hibma M, Spitkovsky D, Trendelenburg M, Crawford L, Tommasino M.** The human papillomavirus type 16 E7 protein is associated with the nucleolus in mammalian and yeast cells. *Oncogene*. 1997; 14: 1137-1145.
101. **Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Durr P.** Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*. 1996; 13(11): 2323-2330.
102. **zur Hausen H.** Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 92, No. 9, May 3, 2000
103. **Zwerschke W, Mannhardt B, Massimi P, Nauenburg S, Pim D, Nickel W, Banks L, Reuser A J, Jansen-Dürr P.** Allosteric Activation of Acid α -glucosidase by the Human Papillomavirus Protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275: 9534-9541.

Anexo 1
(Artículo Publicado)

Different Isoforms of HPV-16 E7 Protein are Present in Cytoplasm and Nucleus

H. Valdovinos-Torres¹, M. Orozco-Morales¹, A. Pedroza-Saavedra¹, L. Padilla-Noriega³, F. Esquivel-Guadarrama² and L. Gutierrez-Xicotencatl^{*,1}

¹Research Center of Infectious Diseases, National Institute of Public Health, Cuernavaca, Morelos, Mexico

²Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

³Faculty of Medicine, Autonomous University of Morelos State, Cuernavaca, Morelos, Mexico

Abstract: The E7 protein of high risk HPV types has been found with different molecular weights, mainly because of phosphorylation, an event that changes protein charge and mobility in SDS-PAGE. Distribution of E7 protein in the cellular compartments has also been subject of debate as some groups report the protein in nucleus and others in cytoplasm. The different subcellular distribution and molecular weights reported for the E7 protein suggest the presence of isoforms. We examined this possibility by using several antibodies that recognize different epitopes on the HPV-16 E7 protein. We showed that E7 is processed in 3 isoforms with different molecular weights and isoelectric points (IEP), and described as E7a1 (17.5 kDa, IEP 4.68), E7a (17 kDa, IEP 6.18) and E7b (16 kDa, IEP 6.96). The immunofluorescence results also showed that E7 is distributed into different compartments (ER, Golgi and nucleus), which suggest the presence of other posttranslational modifications, besides phosphorylation.

INTRODUCTION

Cervical cancer (CC) is one of the most prevalent diseases worldwide. CC is the second major cause of death in women from underdeveloped countries [1] and the main etiological factor is the human papillomavirus (HPV) persistent infection status. Over 90% of malignant carcinomas of the genital tract have HPV DNA sequences; the majority of which contain the high risk HPV-16 and 18 types which are linked to the progression of cervical lesions and CC [2, 3].

The mechanisms through which HPVs induce cell transformation have been intensively investigated recently. The most abundant viral transcripts in tumor and tumor cell lines come from the E6 and E7 open reading frames that are known to be oncogenic. These two genes from HPV are necessary and sufficient to induce HPV-mediated transformation of murine cells [4], immortalize human fibroblasts [5] and in cooperation with *ras* to transform baby rat kidney cells and primary human keratinocytes [6, 7].

The transformation capacity of E7 has been shown to be limited to the high risk HPV types. The E7 protein is a 98 amino acid phosphoprotein with a predicted molecular weight of 11 kDa, however this protein shows abnormal electrophoretic mobility in SDS-PAGE gels that generates different molecular weights from 14 to up to 21 kDa, as reported by different groups [8-10]. It has been suggested that the different molecular weights of E7 and its mobility in SDS-PAGE gels are the result of the acidic sequence localized in the amino-terminal region of the protein, together with its high hydrophobicity and high capacity to form oligomers [11-13].

Studies in high risk HPV types showed that E7 deregulates the cell cycle mainly by binding to and promoting degradation of the tumor suppressor retinoblastoma protein (pRb) [14, 15], resulting in the dissociation of pRb from E2F transcription factors and the premature cell progression into the S-phase of the cell cycle. In a similar way, E7 affects the pRb-related pocket proteins p107 and p130 [16, 17]. It has also been demonstrated that a phosphorylated E7 isoform is able to associate with the histone H1 kinase in the late G2/M phase of the cell cycle [16]. Other studies have demonstrated that E7 is capable of inducing the enzymatic activity of the α -glucosidase in the cytoplasm which degrades intracellular glucose and provides energy for cell growth and division [18].

The different activities of the E7 protein, the heterogeneous distribution in different cellular compartments (nucleus and cytoplasm) as well as the different molecular weights reported suggest the presence of different isoforms of E7. We examined this possibility by using polyclonal and monoclonal antibodies that recognize different epitopes on the HPV-16 E7 protein. We showed that E7 is processed into 3 forms (E7a1, E7a and E7b), one of which is phosphorylated. The molecular weight and the isoelectric point (IEP) as well as the cellular localization of the E7 isoforms were different. These results demonstrate that there are different isoforms of E7 in different cellular compartments and this may be important for interaction of the E7 protein with target proteins to generate the cellular transformation.

MATERIALS AND METHODOLOGY

Antibodies. The monoclonal antibodies (mAbs) D11, B4, C2, A5 and G7 were prepared and characterized in our laboratory [19]. Briefly, 20 μ g of purified recombinant cII-E7 protein from HPV-16 (expressed and purified from *E. coli*) were used to immunize mice 3 times every two weeks. Hybridomas were screened and selected by ELISA against a

*Address correspondence to this author at the Research Center of Infectious Diseases, National Institute of Public Health, Av. Universidad 655, Santa Ma. Ahucatlán, Cuernavaca, Mor, Mexico CP 62508; Tel: (52) 777-3-29-30-86; Fax: (52) 777-317-54-85; E-mail: mlxico@correo.insp.mx

different recombinant E7 protein (MS2-E7) [20]. Further characterization was performed by immunoblot, immunoprecipitation and immunofluorescence.

The anti-E7 (C24 and C89) polyclonal antibodies were prepared in our laboratory against the cII-E7 protein purified by electro-elution. Briefly, rabbits were immunized 3 times with 50 µg of recombinant E7 protein and tested for the presence of specific E7 antibodies in the same way as mAbs.

The anti-E7 (clone ED17, C20), the anti-calnexine (clone H-70) and the anti-p21 (C-29) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA. USA). The anti-GM130 (clone 35) was from BD Biosciences (San Jose, CA. USA).

In Vitro Cell Culture Conditions. CaSki cell line (human cervical epidermoid carcinoma, naturally HPV-16 transformed), HaCaT cells (normal human keratinocytes) and Cos-7 (kidney monkey, SV40 transformed fibroblasts) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air, at 37°C.

In Vivo Cell Labeling. Cells were labeled with 50 µCi/ml [³⁵S]-methionine and [³⁵S]-cysteine (Promix, > 1000 Ci/mmol, GE Healthcare, Piscataway, NJ. USA), in methionine and cysteine free medium and 5% of dialyzed FBS in overnight labeling experiments or with 250 µCi/ml [³⁵S]-methionine-cysteine for 15 min in pulse-chase experiments.

Cells labeled with [³²P]-orthophosphate were starved in 0.2% FBS for 48 h and then placed in phosphate free medium for further 2 h, as described previously [21]. After this time, cells were incubated with 100 µCi/ml [³²P]-orthophosphate (3000 Ci/mmol, GE Healthcare, Piscataway, NJ. USA) for 1 h (time zero). The remaining cells were incubated with 10% FBS for different times and labeled for 1 h with orthophosphate, as above, before cells were collected and lysed for immunoprecipitation as described below.

Transient Transfection of HPV-16 E7 in Cos-7 Cells. Cos-7 cells were transfected using the DEAE-dextran method as described previously [22]. Cells were seeded on 8 well Multitest Slide (MP Biomedical, Solon, OH. USA) and grown up to 80% confluence. Cells were transfected with 5 µg of purified pcDNA or pcDNA-E7 plasmid that contains the nucleotides 562 to 858 from HPV-16 which encodes for the E7 protein (GenBank access AF 477385) (a gift from Dr. J. Berumen, Genomic Medicine Laboratory, Hospital General, Mexico D.F.). Cells were grown for different periods of time (0, 2, 4, 8, 16, 24, 48 and 72 h) after which the cells were fixed with p-formaldehyde and treated for immunofluorescence, as described below.

Immunoprecipitation and SDS-PAGE. Cells were lysed and immunoprecipitated as described elsewhere [23]. Briefly, cell monolayers were lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer in the presence of protease inhibitors (Complete mini, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN. USA). Cell lysates were cleared by centrifugation, and supernatants immunoprecipitated for 16 h at 4°C with 3 µg of purified IgG anti-E7 mAbs or 30 µl of anti-E7 rabbit polyclonal antibodies. The antigen-antibody complex was immunoprecipitated with Protein A-Sepharose (GE Healthcare,

Piscataway, NJ. USA) for 2 h at 4°C. Rabbit anti-mouse coated Protein A-Sepharose was used for mAbs. The immunoprecipitates were dissolved in Laemmli loading buffer containing 100 mM dithiothreitol, followed by electrophoresis in a 15% SDS-polyacrylamide gel. Gels were treated for fluorography with the Enlightening reagent (NEN Life Sciences Products, Boston, MA. USA) and specific bands detected by exposing the gels to X-OMAT film.

Immunoblot. Proteins from different cell lines were extracted in RIPA buffer, as described previously [24], in the presence of protease inhibitors (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN. USA). Total protein extracts (1 mg/ml) were incubated with the C24 polyclonal antibody and processed for immunoprecipitation as mentioned before. Immunoprecipitates were separated on 15% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose Protean membranes (0.45µm, Whatman International Ltd., Middlesex, UK), as described by Towbin and coworkers [25]. The membranes were blocked with PBS-0.5% Tween containing 10% skim milk for 30 min at room temperature. Subsequently, the membranes were incubated with a 1:200 dilution of anti-E7 polyclonal antibodies or with a 1:100 dilution of anti-E7 mAbs in PBS-0.5% Tween and 5% skim milk, overnight. Blots were washed with PBS-0.5% Tween followed by incubation for 1 h under the same conditions with the secondary goat anti-rabbit or rabbit anti-mouse IgG antibodies conjugated with horseradish peroxidase (DAKO, Carpinteria, CA. USA). The membranes were developed according with the chemiluminescence kit of Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA) manufacturer instructions. Membranes were exposed to X-OMAT film.

Indirect Immunofluorescence. Cells at 80% confluence were rinsed with PBS and fixed with 4% p-formaldehyde in PBS at room temperature for 20 min followed by treatment with permeabilization buffer [1% BSA in PBS containing either 3% Triton X-100 (for nuclear structures) or 0.2% saponine (for cytosolic and internal membranes)] for 20 min at 4°C. Subsequently, cells were incubated with anti-E7 antibodies (serum diluted 1:100 for anti-E7 polyclonal Abs and 2 ng/µl of purified IgG for anti-E7 mAbs in permeabilization buffer) for 16 h at 4°C. Slides were rinsed with PBS and incubated for 2 h at 4°C with anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 488 (green) or anti-mouse IgG conjugated with Alexa 594 (red) (dilution 1:250 and 1:800, respectively, Molecular Probes, Carlsbad, CA. USA). Specimens were mounted in 50% glycerol in PBS and visualized under the Confocal Microscope 510 META (Carl Zeiss, Massachusetts, USA) under the Plan-Neofluor 100X /1.3 oil Ph3 lent.

2-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis (2D Gels). Immunoprecipitated E7 protein was treated for isoelectrofocusing (IEF), as described previously [26] with some modifications. Briefly, E7 immunoprecipitates were dissolved in IEF sample buffer (9.5 M urea, 2% NP40, 2% ampholines 3-10, 100 mM DTT). IEF used 7% ampholines (GE Healthcare, NJ. USA) pH 3-9 in 2.5 mm diameter polyacrylamide gel tubes and fixed to the adaptor for slap gels electrophoresis apparatus (BRL Wrightsville, PA. USA). The IEF was carried for 16 h at 400 V and electrophoresis for the second dimension was run as described before. The gels were treated for fluorography as described previously.

RESULTS

Characterization of HPV-16 E7 Protein with Different Antibodies. It has been reported that E7 protein shows different molecular weights and that the phosphorylation process is probably one of the causes for these differences. Thus, we decided to identify the different forms reported using polyclonal and monoclonal antibodies, produced in our laboratory that can differentiate the various isoforms. To this end, CaSki cells were labeled with [³⁵S]-methionine-cysteine for 16 h and the E7 protein immunoprecipitated with the different antibodies as described in Materials and Methodology. The result in Fig. (1) shows an E7 protein of 16 kDa that was immunoprecipitated with the polyclonal antibodies C24 and C89, as well as with the mAbs G7, B4 and the commercial ED17. However, a 17 kDa E7 protein was observed only with the polyclonal antibodies (C24 and C89) (Fig. 1A). In contrast, none of these two bands were observed in immunoprecipitates from HaCaT cells that were used as negative controls (Fig. 1A), or with control rabbit or mouse serum (data not shown).

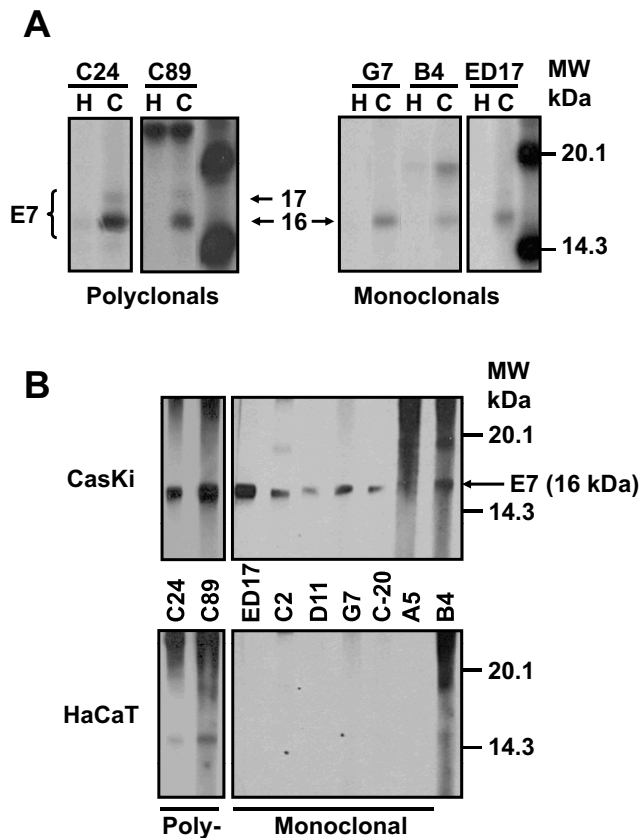


Fig. (1). Recognition of HPV-16 E7 protein by monoclonal and polyclonal antibodies. (A) HaCaT (H) and CaSki (C) cells were labeled with [³⁵S]-methionine-cysteine and immunoprecipitated with different anti-E7 polyclonal (C24, C89) and mAbs (G7, B4, C2, D11, C20, A5, ED17). The arrows show a 16 kDa band recognized by all antibodies, and a 17 kDa band detected only by polyclonal antibodies. (B) Cell extracts were first immunoprecipitated with the C24 polyclonal antibody, samples treated for Western blot and tested with polyclonal and mAbs. The arrow shows the E7 protein of 16 kDa.

We also tested the capacity of the antibodies to recognize the E7 protein by Western blot as the different molecular

weights of the E7 protein could be the result of the different techniques used. Previously, we have shown that the sensitivity of the direct Western blot for E7 is low [27] and therefore, it is necessary to carry out an immunoprecipitation–Western blot to visualize the E7 protein from cell extracts. In this way, cells were immunoprecipitated first with the polyclonal C24 antibody as this antibody recognized 2 forms of E7 protein. The precipitates were separated on a SDS-PAGE gel, transferred to Protean membranes and tested with the different mAbs as described previously. The results in Fig. (1B) showed that 5 of the 6 mAbs tested recognized the 16 kDa band of the E7 protein. This band was also recognized by the commercial mAb ED17 acquired from Santa Cruz, which was used as a positive control. The recognition of 16 kDa band is specific, as this was not present when the mAbs were tested with the HaCaT immunoprecipitates used as negative controls (Fig. 1B). In the case of the polyclonal antibodies (C24 and C89), they only recognized the 16 kDa band but not the 17 kDa band in the Western blot. It is possible that these antibodies only recognize a conformational epitope in the E7 protein that is lost by denaturation during the Western blot process (Fig. 1B).

Processing of HPV-16 E7 Protein. Processing of E7 protein was determined by pulse-chase labeling of CaSki cells and immunoprecipitated with C89 polyclonal antibody (Fig. 2). The top panel of Fig. (2) shows the electrophoretic analysis of immunoprecipitates of [³⁵S] methionine-cysteine labeled E7 protein after 15 min pulse, followed by chase of up to 6 h. It is clear that the E7 protein was synthesized after the 15 min pulse as a 17 kDa protein (E7a) that remained stable for up to 1 h and subsequently disappeared (Fig. 2). After 1 h of chase the E7a protein was processed to a 16 kDa band (E7b) and was stable for up to 3 h of chase (Fig. 2). This pattern of bands was not observed in the immunoprecipitates of labeled HaCaT cells used as control (Fig. 2). The 15 kDa band observed in HaCaT cells at 6 h (smaller than the one observed for E7 in CaSki cells) is a non-specific band as it is not consistently observed in experiment repetitions. The bands of the fluorography were scanned to calculate the half-life of the E7 proteins according to Belle and coworkers [28]. The results showed that the half-life of the E7a protein was only 50 min and 70 min for the faster moving band of E7b (Fig. 2, lower panel). The presence of a non-specific 21 kDa band in pulse-chase cells (HaCaT and CaSki) was due to the high levels of label used in this kind of experiments.

Recognition of 3 Different forms of HPV-16 E7 Protein by Differences in Charge. The pulse-chase experiments showed that the E7a protein was processed to a faster moving form described as E7b. At this point, it was not clear if there was an actual chemical modification of the protein, or if the differences were only due to a conformational change. For this reason, it was important to determine if there was any difference in charge in addition to the difference in molecular weight between these 2 isoforms of E7. Isoelectrofocusing of immunoprecipitates (C89 antibody) of overnight [³⁵S] methionine-cysteine labeled E7 proteins was performed followed by SDS-PAGE gels. The separation of the E7 proteins in a pH gradient showed that E7a and E7b have different net charge (Fig. 3, CaSki, spots 2 and 3 respectively). However, unexpectedly an additional form of

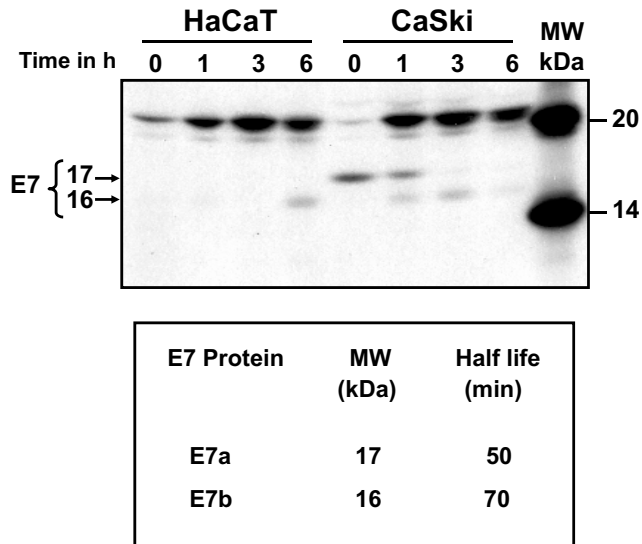


Fig. (2). Processing and half-life of the HPV-16 E7 protein. HaCaT and CaSki cells were pulse labeled with [³⁵S]-methionine-cysteine for 15 min and chased for different times (0, 1, 3 and 6 h). Upper panel: Cell extracts were immunoprecipitated with the anti-E7 polyclonal C89 antibody, samples separated by SDS-PAGE gel and bands visualized by auto-radiography. The arrows showed a 17 kDa (E7a) and a 16 kDa (E7b) bands. The 15 kDa band observed in HaCaT cells is a non-specific band as it is not consistently observed in experiment repetitions. Lower panel: Bands were scanned and plotted in a graph to calculate the half-life of the different forms of E7 protein.

the E7 protein in the extract of CaSki cells that was not resolved in one dimension gels was found. The third band observed (E7a1) showed a molecular weight of 17.5 kDa (Fig. 3, CaSki, spot 1). The IEP for each form of E7 protein was calculated as 4.68 for E7a1 (spot 1), 6.18 for the E7a form (spot 2) and 6.96 for E7b (spot 3). This difference in charge among the 3 isoforms of E7 protein, suggests that the proteins are modified in some ways in two different steps.

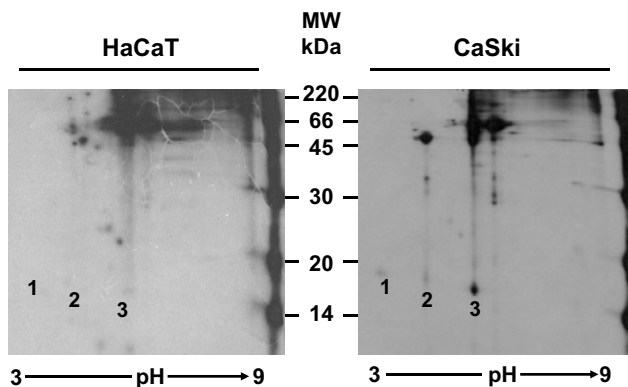


Fig. (3). Characterization of the HPV-16 E7 proteins by IEP. HaCaT and CaSki cells were labeled with [³⁵S]-methionine-cysteine and immunoprecipitated with the C89 polyclonal antibody. The immunoprecipitates were separated in the first dimension in a pH gradient from 3-9 for 16 h. The second dimension was run in a 15% PAGE gel and treated for fluorography. The numbers over the CaSki panel show the localization of the 3 isoforms of HPV-16 E7 proteins (E7a1, E7a and E7b) and these spots were not observed in the HaCaT control cells.

Phosphorylation of the HPV-16 E7 Protein. Previously, it has been reported that posttranslational phosphorylation occurs in E7 [29]. Accordingly, we decided to identify which of the E7 forms was phosphorylated. To this end, cells were starved for 48 h and subsequently labeled with [³²P]-orthophosphate for 1 h at different times after protein synthesis reactivation by addition of FBS as described in Materials and Methodology, and separated in 15% SDS-PAGE gel. The starvation step in this system was introduced to avoid incorporation of [³²P]-orthophosphate in the peptide backbone and to look for novel protein phosphorylation. The result showed a phosphorylated E7 protein with an apparent molecular weight of 17.5 kDa (E7a1) that accumulates over the time, however, the 16 kDa protein band (E7b) was not observed at any time, suggesting that this E7 isoform is not phosphorylated (Fig. 4). Several reports have shown that E7 can be phosphorylated in at least 2 different sites [21, 30, 31], and this could explain the presence of a broad band that could contain the 17.5 kDa (E7a1) and the 17 kDa (E7a) proteins that were observed in the 2D gels.

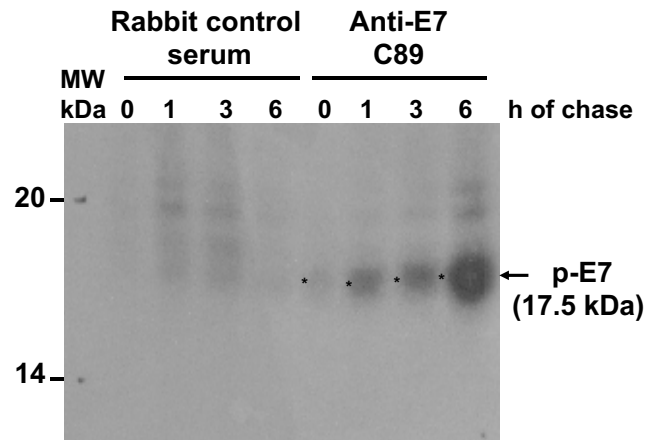


Fig. (4). Phosphorylation of HPV-16 E7 protein. CaSki cells were starved for 16 h, labeled with [³²P]-orthophosphate and harvested at different periods of time. Cell extracts were immunoprecipitated with the anti-E7 polyclonal C89 antibody or with control rabbit serum. The precipitates were separated in a 15% acrylamide gel and visualized by autoradiography. The arrow shows the phosphorylated E7 protein of 17.5 kDa.

Cellular localization of the different forms of HPV-16 E7 proteins. Up to this point, the results showed that HPV-16 E7 from CaSki cells is processed in 3 different molecular weight forms, one of which is phosphorylated (E7a1). We also demonstrated that polyclonal and mAbs recognized different forms of the E7 protein. Taken together, this information made us wonder about the cellular localization of the 3 isoforms of E7. Thus, we used the different polyclonal and mAbs in cells fixed for immunofluorescence and co-localized the E7 protein with antibodies against cellular markers for nucleus (p21), endoplasmic reticulum (ER; calnexin) and Golgi (GM130), as previously reported [32-34]. The results in Fig. (5) showed that the polyclonal antibody C89 recognized the E7 protein in the nucleus as well as in cytoplasm, while the C24 polyclonal mainly stained the cytoplasm. When mAbs were tested together with the cellular markers it was evident that the ED17 antibody recognized the E7 protein in the nuclear compartment as this antibody co-localized only with the p21 nuclear marker (Fig. 5, ED17,

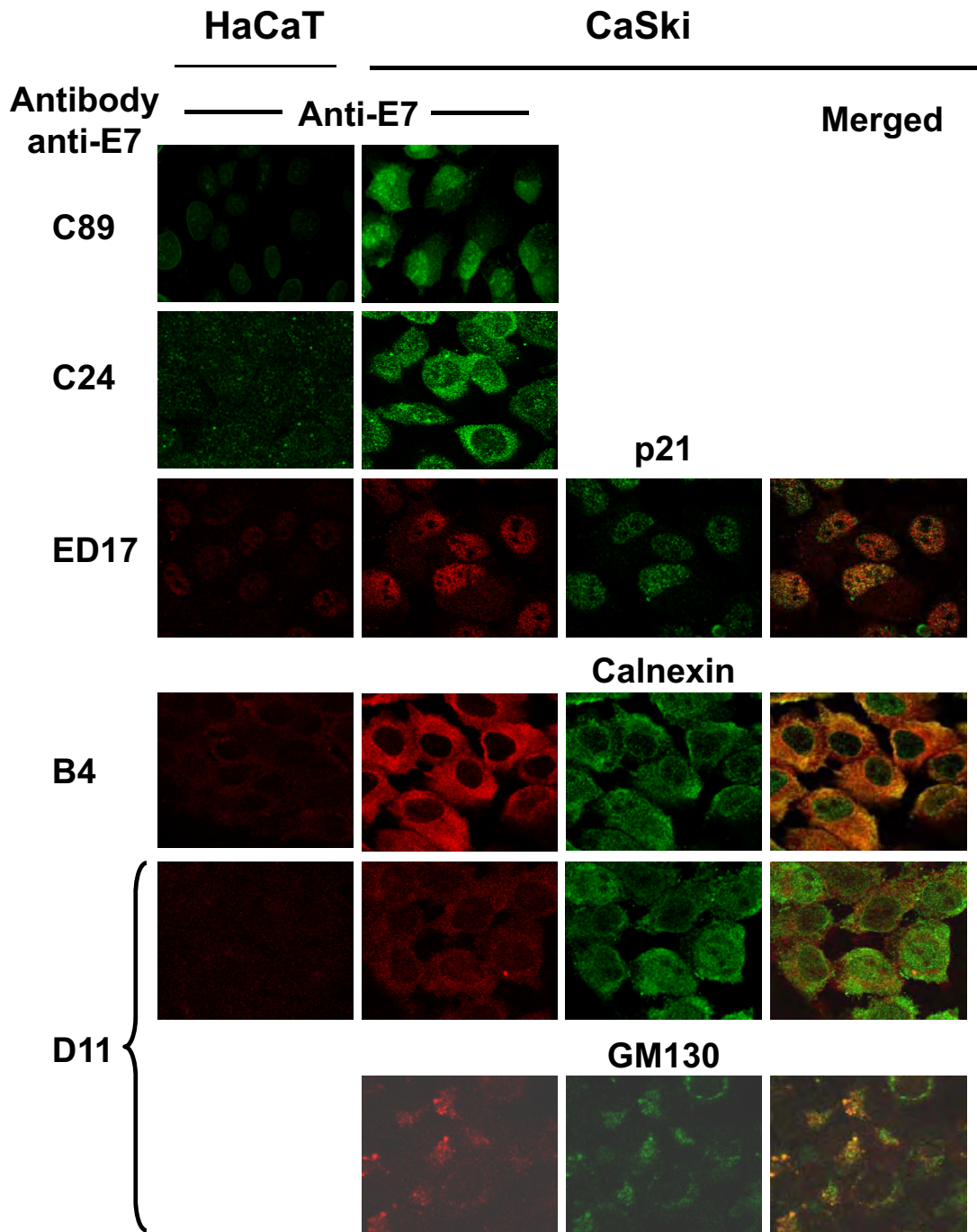


Fig. (5). Subcellular localization of HPV-16 E7 proteins by immunofluorescence. Cells were fixed with p-formaldehyde and permeabilized with 0.2% saponine. Cells were tested with the different anti-E7 polyclonal (C89 and C24) and mAbs (ED17, B4, D11). Biological cell markers were used to identify ER (calnexin), Golgi (GM130) and nucleus (p21) and co-localized with the immunological detected E7 protein. Secondary fluorescent antibodies were anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 488 (green) or anti-mouse IgG conjugated with Alexa 594 (red). The merged image is shown in the right side of the figure and positive co-localization is observed in yellow color. Images were taken at a magnification of 1000X using Confocal microscope.

merged). The E7 protein recognized by the B4 mAb co-localized only with the calnexin marker, which suggests that the E7 form recognized by this antibody is present in the ER (Fig. 5, B4, merged). However, when the D11 mAb was tested a small part of this antibody co-localized with the calnexin marker of ER and a stronger co-localization signal was observed with the Golgi GM130 marker (Fig. 5, D11, merged). These results demonstrated that the E7 protein is

recognized in different cellular compartments by different antibodies.

In Vivo Cellular Processing of HPV-16 E7 Protein in Transfected Cells. The presence of different forms of E7 localized in different cellular compartments prompted us to analyze the processing of the E7 protein in the cell. To analyze the E7 processing, Cos-7 cells were transiently trans-

fecting with the pcDNA-E7 plasmid to investigate *de novo* expression and localization of E7 protein at different periods of time and tested for immunofluorescence, as described in Materials and Methodology. The results in Fig. (6) show that the polyclonal C89 antibody identified 3 different patterns of E7 staining; at first E7 is recognized by 16 h after transfection in the cytoplasm of the cells. By 24 h the E7 protein became concentrated in the periphery of the nucleus and by 48 h the fluorescence was only observed into the nucleus and concentrated in the nucleolus (Fig. 6, C89). With the D11 antibody (identifies E7 in ER and Golgi) a very light cytoplasmic fluorescence signal was observed by 16 h after E7 transfection, that became very strong by 24 h (Fig. 6, D11). However, the fluorescence signal disappeared totally by 48 h after Cos-7 cells transfection. In contrast, the B4 mAb that recognized only the E7 protein in the ER showed a strong fluorescence signal only at 24 h after E7 transfection (Fig. 6, B4). While the ED17 mAb that recognized E7 protein only

in the nucleus identified the protein only after 24 h and the fluorescence signal was still present by 48 h (Fig. 6, ED17). In these experiments the presence of E7 expression was not detected, with any of the different antibodies tested, before the 16 h and after 48 h (data not shown). The specificity of each one of the antibodies was determined by immunofluorescence using Cos-7 transfected cells with pcDNA plasmid alone as it was done for the pcDNA-E7 plasmid (data not shown). In Fig. (6), only the 24 h time pcDNA control is shown for each one of the antibodies as this was the time of the highest E7 expression in the transfected cells.

DISCUSSION

The E7 protein is a very well studied protein that had been demonstrated to interact with a variety of target proteins such as the pocket proteins (pRb, p130 and p107) [14, 15], proteins involved in cell cycle (E2F-Cyclin A complex, Cyclin E, p21^{Waf1}, p27^{Kip1}) [35-39], transcription factors

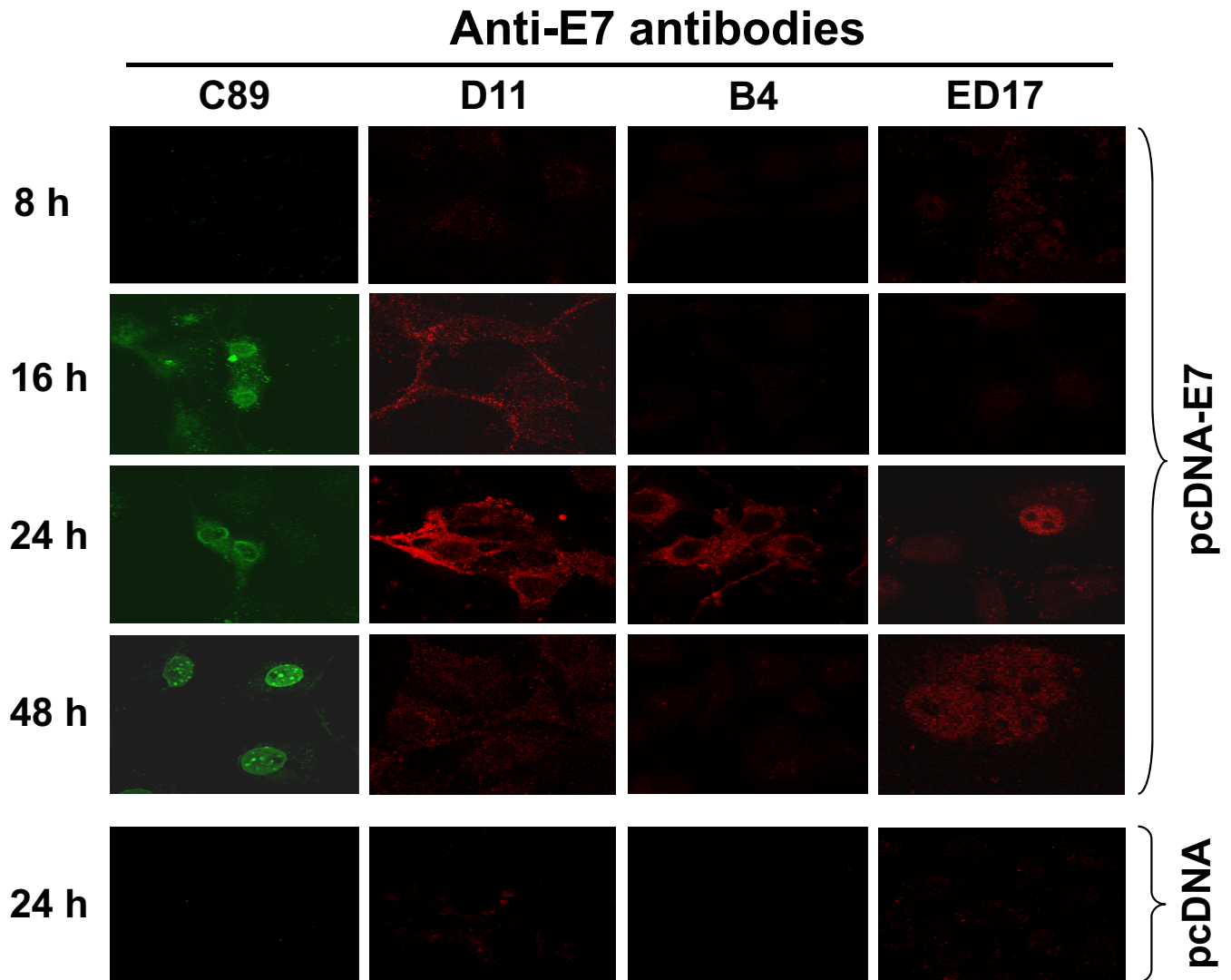


Fig. (6). Processing of the HPV-16 E7 protein under *in vivo* conditions. Cos-7 cells were transiently transfected with the pcDNA-E7 plasmid and chase for different periods of time (8, 16, 24 and 48 h). Harvested cells were fixed with 4% p-formaldehyde, permeabilized as described in Material and Methodology and tested with different anti-E7 antibodies. The antibodies tested were C89 polyclonal antibody, and D11, B4 and ED17 mAbs. Secondary fluorescent antibodies were anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 488 (green) or anti-mouse IgG conjugated with Alexa 594 (red). Cos-7 cells transfected with pcDNA plasmid alone at 24 h was used as control of the system as this was the time for the highest expression of the E7 protein observed. Images were taken at a magnification of 1000X using Confocal microscope.

(pCAF acetyltransferase, TBP, AP-1 family factors) [40-43] and with the senescence-regulating protein DEK [44], among others. All of these target proteins are present in the nucleus; however the reports about the distribution of the E7 in the cell have shown that this protein is present not only in nucleus but also in the cytoplasm. We believe that this differential distribution of E7 in the cells is due to the presence of different isoforms of E7 that are produced during its cellular processing. To test this hypothesis, monoclonal and polyclonal antibodies that recognize different epitopes in the E7 protein were developed in our laboratory. The results showed the presence of 3 isoforms of HPV-16 E7 protein that vary in molecular weight and IEP. These E7 proteins were described as E7a1 (17.5 kDa and IEP of 4.68), E7a (17 kDa and IEP of 6.18) and E7b (16 kDa and IEP of 6.96). The half-lives of the E7 proteins were calculated as 50 min for E7a and 70 min for E7b. These results are consistent with a previous report that showed that the half-life of E7 from CaSki cells was 55 min and 70 min in SiHa cells, although these researchers only identified one E7 band protein in each cell line [30]. The difference between Smotkin and Wettstein results and ours was the use of different anti-E7 antibodies and that these recognized the different isoforms of the E7 protein.

In the pulse-chase experiments we identified that E7 is initially synthesized as a 17 kDa protein and after approximately 1 h, it is processed to a faster moving band of 16 kDa with a short half-life. These results suggest that E7 undergoes some posttranslational modifications that generate the shift in molecular weight. A known modification for E7 is the phosphorylation of the serine residues 31 and 32 [29, 45], although serine 71 is also a potential phosphorylation site [31, 46]. Our results showed a broad phosphorylated band of a calculated molecular weight of 17.5 kDa that could be the 17 kDa band that was recognized in the immunoprecipitations. The difference in molecular weight could be due to the change in charge that makes the protein to be retarded in the SDS-PAGE gel. Another possibility is that the antibodies did not recognize efficiently the non-phosphorylated protein as has been reported for other mAbs [47], suggesting that the phosphorylated E7 protein has distinct antigenic properties (conformational changes). However, these results did not account for the lower molecular weight band of 16 kDa (E7b) that was identified in the Western blot and in the immunoprecipitations. Another as yet unidentified modification could exist and be the reason for the presence of this faster moving E7b protein.

According to the HPV-16 E7 protein sequence the calculated IEP of this protein is 4.05, however, when this characteristic was measured with recombinant E7 protein produced in bacteria the IEP obtained was 5.4 [48]. When the IEP of the HPV-18 E7 protein produced *in vitro* (using rabbit reticulocyte lysates) or immunoprecipitated from HeLa cells, there were 3 bands of the same molecular weight, but different IEP [49]. The researchers suggested that this was a typical pattern for phosphorylated proteins and this was similar to what we found. However, in our experiments not only the IEP, but also the molecular weights of the E7 proteins (E7a1, E7a and E7b), were different in the 2D gels. This again suggests that the C89 polyclonal antibody is recognizing different epitopes of the E7 isoforms that have not been fully characterized.

At least 2 distinct molecular weights have been reported for HPV-16 E7 by 2 different groups [50, 51]. However, the C89 antibody was able to recognize simultaneously 2 forms of E7 by radio-immunoprecipitation and 3 when 2D gels were used. It has been shown that E7 is highly hydrophobic and that this characteristic together with its conformational structure produce an anomalous electrophoretic behavior. Purified E7 protein is present as oligomers, and tends to be soluble and with a molecular weight close to the calculated in the presence of 8M urea [13, 52]. It is possible that we were able to visualize the 3 forms of E7 in the 2D gels, not only because the difference in charge, but because the proteins were solubilized in 8M urea.

When we examined the localization of the different E7 forms in the cellular compartments by immunofluorescence staining, it was observed that the E7 protein was first observed in the ER as this was the first signal observed with the antibodies (16 h). Subsequently, the E7 protein was visualized in the Golgi compartment (16 to 24 h) and finally translocated to the nucleus (48 h), where it probably interacts with target proteins, such as pRb. From this work, it is clear that the E7b (16 kDa, recognized by mAbs) isoform is localized in the cytoplasm and nucleus, but the localization of the 17 and 17.5 kDa E7 isoforms still needs to be determined as there are not specific antibodies available to differentiate them. According with this processing of the E7 protein, it is possible that the protein encounters some posttranslational modifications during the transit through different cellular compartments that allow the final localization of the protein. Studying the amino acid sequence of the HPV-16 E7 protein, it could be observed that it contains a consensus sequence for glycosylation of Asp 29, has 2 sulfation sites (Tyr 23 and 26) and 5 phosphorylation sites besides the already known Ser 31, 32 and 71 [46]. Up today, only phosphorylation has been reported for the E7 protein and this posttranslational modification only accounts for the difference in charge identified in the 3 different forms of E7, but other modifications will still need to be studied to clarify the differences on molecular weight identified by our polyclonal and mAbs.

During the processing of the E7 protein in the Cos-7 transfected cells, the protein is localized at the perinuclear zone by 24 h after being synthesized. This localization is in agreement with a previous report that showed that E7 from HPV-16 was observed in ER, cytoplasm and the nuclear membrane, where E7 was able to activate the α -glucosidase enzyme in an allosteric way [18]. Subsequently, during the expression of the E7 protein in the Cos-7 transfected cells (48 h), the protein was visualized in the nucleus and relocated into the nucleolus of the cells. These structures have also been reported to be present in CaSki cells, but only during the G2/M cell cycle phase [53]. The nuclear localization of the E7 protein has been reported in several studies [50, 51, 53, 54]; however, this protein does not contain a consensus sequence to be translocated into the nucleus. The translocation of the E7 protein into this compartment has been reported to be through a non-conventional Ran-GTP pathway and an intermediary carrier protein seems to be involved [54]. Alternatively, *in vitro* characterization of E7 protein has demonstrated that formation of dimers and tetramers of E7 depends on pH changes which allow exposure of hydrophobic epitopes [13]. It is also well established that cell compartments are microenvironments that functions at dif-

ferent pHs [55, 56]. It is possible then, that final localization of the different isoforms of E7 in the cell could be driven by exposure of different epitopes due to oligomerization of E7 induced by changes in pH, during their transit through the different cellular compartments.

The low levels of E7 expression of the high risk HPVs, together with the short half-life of this protein, makes it difficult to carry on with biochemical experiments helpful to completely characterize this protein. Most of the information obtained in an effort to biochemically characterize E7 protein has been generated from recombinant E7 protein produced in bacteria or produced under *in vitro* conditions. However, some of the posttranslational modifications of the proteins are predominantly observed in eukaryotic cells. The lack of these modifications would change the molecular weights as well as the net charges of the protein, making it difficult to detect the intermediates or processed forms of the HPV-16 E7 protein that are reported in this paper as we used eukaryotic cell cultures. In this way, 3 forms of HPV-16 E7 proteins were identified with polyclonal and mAbs that showed different molecular weights and different IEPs (E7a1, E7a and E7b). Due to the fact that the different antibodies recognized different epitopes, the E7 protein was recognized in different cellular compartments at different times during its processing.

The E7 protein has been recognized as a multifunctional protein that interacts with a high variety of target proteins. It will be of great interest to identify the complete molecular processing of the E7 protein (other posttranslational modifications) that will allow a better knowledge about the structure and the biological activity of this oncogenic protein and its role in the transformation process.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the technical support of the people from the Virus and Cancer Department from the National Institute of Public Health, Mexico. We also acknowledge to Dr. Robert Tindle and Dr. Eric Lam for helpful comments and to the MSc Tanya Plett for revising the manuscript.

Potential Conflicts of Interest

The funds for this work were obtained from the Instituto Nacional de Salud Publica and supported by the Mexican government through a grant from CONACYT-SEP (49574-24483-M).

H. Valdovinos-Torres, is PhD student of the Postgraduate Program of Ciencias Biológicas, UNAM, Mexico City, Mexico. The PhD supervisor of this student was Dr. Lourdes Gutierrez-Xicotencatl.

REFERENCES

- Parkin DM, Bray F. The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 2006; 24 (Suppl 3): S11-S25.
- zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(9): 690-698.
- Syrjänen K. Mechanisms and predictors of high-risk human papillomavirus (HPV) clearance in the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 2007; 28(5): 337-351.
- Yasumoto S, Burkhardt AL, Doniger J, DiPaolo JA. Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J Virol* 1986; 57: 572-577.
- Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, Doniger J, DiPaolo JA. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* 1987; 61: 1061-1066.
- Matlashewski G, Schneider J, Banks L, Jones N, Murray A, Crawford L. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *EMBO J* 1987; 6: 1741-1746.
- Phelps WC, Yee CL, Mürger K, Howley PM. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 1988; 53: 539-547.
- Gage JR, Meyers C, Wettstein FO. The E7 proteins of the non-oncogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol* 1990; 64: 723-730.
- Sato H, Watanabe S, Furuno A, Yoshiike K. Human papillomavirus type 16 E7 protein expressed in *Escherichia coli* and monkey COS-1 cells: immunofluorescence detection of the nuclear E7 protein. *Virology* 1989; 170: 311-315.
- Greenfield I, Nickerson J, Penman S, Stanley M. Human papillomavirus type 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11217-11221.
- Armstrong DJ, Roman A. The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192: 1380-1387.
- Mürger K, Phelps WC. The human papillomavirus E7 protein as transforming and transactivating factor. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1155: 111-123.
- Alonso LG, García-Alai MM, Nadra AD, et al. High-Risk (HPV16) Human Papillomavirus E7 oncoprotein is highly stable and extended, with conformational transitions that could explain its multiple cellular binding partners. *Biochemistry* 2002; 41: 10510-10518.
- Caldeira S, Dong W, Tommasino M. Analysis of E7/Rb associations. *Methods Mol Med* 2005; 119: 363-379.
- Collins AS, Nakahara T, Do A, Lambert PF. Interactions with pocket proteins contribute to the role of human papillomavirus type 16 E7 in the papillomavirus life cycle. *J Virol* 2005; 79: 14769-14780.
- Davies R, Hicks R, Crook T, Morris J, Vousden K. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J Virol* 1993; 67: 2521-2528.
- Zhang B, Chen W, Roman A. The E7 proteins of low- and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 437-442.
- Zwerschke W, Mannhardt B, Massimi P, et al. Allosteric activation of acid α -glucosidase by the human papillomavirus E7 protein. *J Biol Chem* 2000; 275: 9534-9541.
- Orozco-Morales M, Esquivel-Guadarrama F, Valdovinos-Torres H, Gutierrez-Xicotencatl L. Characterization of mouse hybridomas specific for E7 of HPV-16. In preparation.
- Pedroza-Saavedra A, Cruz A, Esquivel F, et al. High prevalence of serum antibodies to Ras and type 16 E4 proteins of human papillomavirus in patients with precancerous lesions of the uterine cervix. *Arch Virol* 2000; 145: 603-623.
- Massimi P, Pim D, Kühne C, Banks L. Regulation of the human papillomavirus oncoproteins by differential phosphorylation. *Mol Cell Biochem* 2001; 227: 137-144.
- Hancock JF, Marshall CJ, McKay IA, et al. Mutant but not normal p21 ras elevates inositol phospholipid breakdown in two different cell systems. *Oncogene* 1988; 3: 187-193.
- Magee AI, Gutierrez L, McKay IA, Marshall CJ, Hall A. Dynamic fatty acylation of p21N-ras. *EMBO J* 1987; 6: 3353-3357.
- Brugge JS, Erikson RL. Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature* 1977; 269: 346-348.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4354.
- Gutierrez L, Magee AI, Marshall CJ, Hancock JF. Post-translational processing of p21ras is two-step and involves car-

- boxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis. *EMBO J* 1989; 8: 1093-1098.
- [27] Escalante AD, Recillas TF, Valencia C, *et al.* Expression of E6 and E7 papillomavirus oncogenes in the outer root sheath of hair follicles extends the growth phase and bypasses resting at telogen. *Cell Growth Diff* 2000; 11: 527-539.
- [28] Belle A, Tanay A, Bitincka L, Shamir R, O'Shea EK. Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 13004-13009
- [29] Barbosa MS, Edmonds C, Fisher C, Schiller JT, Lowy DR, Vousden KH. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and SV40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J* 1990; 9: 153-160.
- [30] Smotkin D, Wettstein FO. The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *J Virol* 1987; 61: 1686-1689.
- [31] Storey A, Almond N, Osborn K, Crawford L. Mutations in the human papillomavirus type 16 E7 gene that affect transformation, transactivation and phosphorylation by E7 protein. *J Gen Virol* 1990; 71: 965-970
- [32] Tominaga K, Kondo C, Kagata T, Hishida T, Nishizuka M, Imagawa M. The novel gene fad158, having a transmembrane domain and leucine-rich repeat, stimulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004; 279: 34840-34848.
- [33] Huang SM, Huang SP, Wang SL, Liu PY. Importin alpha1 is involved in the nuclear localization of Zacl and the induction of p21WAF1/CIP1 by Zacl. *Biochem J* 2007; 402: 359-366.
- [34] Perez F, Pernet-Gallay K, Nizak C, Goodson HV, Kreis TE, Goud B. CLIPR-59, a new trans-Golgi/TGN cytoplasmic linker protein belonging to the CLIP-170 family. *J Cell Biol* 2002; 156: 631-642.
- [35] Arroyo M, Bagchi S, Raychaudhuri P. Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2F-cyclin A complex. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 6537-6546.
- [36] McIntyre MC, Ruesch MN, Laimins LA. Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology* 1996; 215: 73-82.
- [37] Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* 1997; 11: 2090-2100.
- [38] Jones DL, Alani RM, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* 1997; 11: 2101-2111.
- [39] Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Durr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 1996; 13: 2323-2330.
- [40] Maldonado E, Cabrejos ME, Banks L, Allende JE. Human papillomavirus-16 E7 protein inhibits the DNA interaction of the TATA binding transcription factor. *J Cell Biochem* 2002; 85: 663-669.
- [41] Avvakumov N, Torchia J, Mymryk JS. Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase. *Oncogene* 2003; 22: 3833-3841.
- [42] Massimi P, Pim D, Banks L. Human papillomavirus type 16 E7 binds to the conserved carboxy-terminal region of the TATA box binding protein and this contributes to E7 transforming activity. *J Gen Virol* 1997; 78: 2607-2613.
- [43] Antinore MJ, Birrer JM, Patel D, Nader L, McCance DJ. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J* 1996; 15: 1950-1960.
- [44] Wise-Draper TM, Allen HV, Thobe MN, *et al.* The human DEK proto-oncogene is a senescence inhibitor and an upregulated target of high-risk human papillomavirus E7. *J Virol* 2005; 79: 14309-14317.
- [45] Firzlauff JM, Lüscher B, Eisenman RN. Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 5187-5191.
- [46] Massimi P, Banks L. Differential phosphorylation of the HPV-16 E7 oncoprotein during the cell cycle. *Virology* 2000; 276: 388-394.
- [47] Kee SH, Choi YO, Song YS, Lee HP, Chang WH. Identification of antigenic differences between the phosphorylated and nonphosphorylated forms of the E7 protein of human papillomavirus type 16. *J Med Virol* 1998; 54: 129-134.
- [48] Pahel G, Aulabaugh A, Short SA, *et al.* Structural and functional characterization of the HPV16 E7 protein expressed in bacteria. *J Biol Chem* 1993; 268: 26018-26025.
- [49] Roggenbuck B, Larsen PM, Fey SJ, Bartsch D, Gissmann L, Schwarz E. Human papillomavirus type 18 E6*, E6, and E7 protein synthesis in cell-free translation systems and comparison of E6 and E7 in vitro translation products to proteins immunoprecipitated from human epithelial cells. *J Virol* 1991; 65: 5068-5072.
- [50] Tommasino M, Contorni M, Scarlato V, Bugnoli M, Maundrell K, Cavalieri F. Synthesis, phosphorylation, and nuclear localization of human papillomavirus E7 protein in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 1990; 93: 265-270.
- [51] Kanda T, Zanma S, Watanabe S, Furuno A, Yoshiike K. Two Immunodominant regions of the human papillomavirus type 16 E7 protein are masked in the nuclei of monkey COS-1 cells. *Virology* 1991; 182: 723-731.
- [52] Alonso LG, Garcia-Alai MM, Smal C, *et al.* The HPV16 E7 viral oncoprotein self-assembles into defined spherical oligomers. *Biochemistry* 2004; 43: 3310-3317.
- [53] Zatepina O, Braspenning J, Robberson D, *et al.* The human papillomavirus type 16 E7 protein is associated with the nucleolus in mammalian and yeast cells. *Oncogene* 1997; 14: 1137-1145.
- [54] Angeline M, Merle E, Moroianu J. The E7 oncoprotein of high-risk human papillomavirus type 16 enters the nucleus via a nonclassical Ran-dependent pathway. *Virology* 2003; 317: 13-23.
- [55] Kane PM. The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006; 70: 177-191
- [56] Wiseman RL, Koulov A, Powers E, Kelly JW, Balch WE. Protein energetics in maturation of the early secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 359-367.