



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL

CINVESTAV, ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**Los oncogenes de VPH-16 (E6/E7) desregulan la
expresión de algunos factores de *splicing*: análisis del
papel de NF- κ B.**

T E S I S

Que presenta:

M. en C. Job Alí Díaz Hernández

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias

En la especialidad de:

Biomedicina Molecular

Director de Tesis: Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor el Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, por su tiempo, asesoramiento, consejos y paciencia en la elaboración, redacción y revisión de esta tesis, así como por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo.

A mis asesores la Dra. Leticia Cedillo Barrón, Dra. Rosaura Hernández Rivas, Dra. Lorena Gutiérrez Escolano y la Dra. Elena Arechaga Ocampo, por el tiempo y dedicación en la revisión y asesoramiento de esta tesis.

Al Biól. Raúl Bonilla Moreno, por todos sus consejos, apoyo, paciencia y enseñanzas en el laboratorio.

A la QFB. Leticia Alemán Lazarini, por su enseñanza, trabajo y apoyo en el uso y manejo del microscopio confocal.

Al C. Víctor Manuel Ortiz Santiago por su apoyo y ayuda técnica en distintas áreas del laboratorio.

A la C. María de Jesús Maqueda Villegas por su asistencia y apoyo burocrático en todos los trámites realizados durante esta estancia doctoral.

A mis compañeros y amigos del L1, a Raúl, Macario, Israel, Víctor, Leti y Caro, por su apoyo, amistad, consejos y solidaridad dentro y fuera del laboratorio que hicieron más llevaderos estos 5 años.

Al CONACyT por haberme entregado la beca numero 323824.

A todos ellos, muchas gracias.

DEDICATORIAS

A mi familia: a mis padres Oscar y María Guadalupe, por todos sus consejos, apoyo, amor y apoyo incondicionales, por ser siempre mi fuente de inspiración y superación personal, por enseñarme los valores y perseverancia necesarios para superar esta meta y las demás alcanzadas en mi vida, por sentirme orgulloso de ustedes, ya que sin su ejemplo y dirección no existiría la persona que soy hoy en día.

A mis hermanos Ahmed, Karen y Pepe, por todo su apoyo y cariño, por brindarme risas, bromas y experiencias, por sus enseñanzas, por recordarme día a día quien soy.

A mi novia, amiga, colega y compañera de vida Jessica, por todo tu amor, cariño, apoyo y consejos, por darme fuerzas en mis tiempos de flaqueza, por darme aliento cuando sentía frustración, por darme alegría cuando me sentía triste, por todos los momentos que hemos pasado dentro y fuera del laboratorio, también por ser un asesor mas en esta tesis.

A todos mis amigos, aquellos que me han conocido desde hace décadas y los más recientes, por todas sus risas y experiencias, por sus consejos y sabiduría, por brindarme su amistad.

CONTENIDO

	Página
Lista de figuras	5
Lista de Tablas	7
Abreviaturas	9
Resumen	11
Abstract	12
Introducción	13
Antecedentes	24
Justificación	30
Hipótesis	31
Objetivos	32
Estrategia Experimental	33
Materiales y Métodos	36
Resultados	41
Discusión	63
Conclusiones	69
Perspectivas	70
Referencias	71

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Proceso de <i>splicing</i> . 15
Figura 2	Representación esquemática del genoma del VPH. 17
Figura 3	Ciclo replicativo del virus del papiloma humano. 19
Figura 4	<i>Splicing</i> alternativo del pre-mRNA de E6/E7. 21
Figura 5	Expresión proteica de los factores de <i>splicing</i> en las diferentes líneas celulares. 42
Figura 6	Análisis densitométrico de la expresión proteica de los factores de <i>splicing</i> en las diferentes líneas celulares. 42
Figura 7	Expresión de mRNA de los factores de <i>splicing</i> en las diferentes líneas celulares. 43
Figura 8	Expresión proteica de los factores de <i>splicing</i> en las células C33A, C33A-E6E7C y C33A-Mock. 47
Figura 9	Análisis densitométrico de la expresión proteica de los factores de <i>splicing</i> en las células C33A, C33A-E6E7C y C33A-Mock. 47
Figura 10	Expresión de mRNA de los factores de <i>splicing</i> en las células C33A, C33A-E6E7C y C33A-Mock. 48
Figura 11	Expresión proteica de los factores de <i>splicing</i> en las células C33A, C33A-E6SDM y C33A-E7. 50
Figura 12	Análisis densitométrico de la expresión proteica de los factores de <i>splicing</i> en las células C33A, C33A-E6SDM y C33A-E7. 50
Figura 13	Expresión de mRNA de los factores de <i>splicing</i> en las células C33A, C33A-E6SDM y C33A-E7. 51
Figura 14	Expresión proteica de los factores de <i>splicing</i> en las células C33A, C33A-E6*I, C33A-E6*II y C33A-E6^E7. 53
Figura 15	Análisis densitométrico de la expresión proteica de los factores de <i>splicing</i> en las células C33A, C33A-E6*I, C33A-E6*II y C33A-E6^E7. 54
Figura 16	Expresión de mRNA de los factores de <i>splicing</i> en las células C33A, C33A-E6*I, C33A-E6*II y C33A-E6^E7. 54

Figura 17	Expresión proteica de los factores de <i>splicing</i> en las líneas celulares CaSki y SiHa con y sin tratamiento de BAY 11-7082.	56
Figura 18	Análisis densitométrico de la expresión proteica de los factores de <i>splicing</i> en las líneas celulares CaSki y SiHa con y sin tratamiento de BAY 11-7082.	57
Figura 19	Expresión proteica de factores importantes en la vía clásica de NF-κB en las líneas celulares C33A, CaSki y SiHa.	59
Figura 20	Análisis densitométrico de la expresión proteica de factores importantes en la vía clásica de NF-κB en las líneas celulares C33A, CaSki y SiHa.	59
Figura 21	Expresión proteica de factores importantes en la vía clásica de NF-κB en las líneas celulares C33A, C33A-E6SDM y C33A-E7.	61
Figura 22	Análisis densitométrico de la expresión proteica de factores importantes en la vía clásica de NF-κB en las líneas celulares C33A, C33A-E6SDM y C33A-E7.	62

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Anticuerpos	38
Tabla 2	Oligonucleótidos	40
Tabla 3	Valores de la expresión a nivel de mRNA de los factores de <i>splicing</i> en las líneas celulares.	43
Tabla 4	Valores de la expresión a nivel de mRNA de los factores de <i>splicing</i> en las líneas celulares C33A, C33A-E6E7C y C33A-Mock.	48
Tabla 5	Valores de la expresión a nivel de mRNA de los factores de <i>splicing</i> en las líneas celulares C33A, C33A-E6SDM y C33A-E7.	51
Tabla 6	Valores de la expresión a nivel de mRNA de los factores de <i>splicing</i> en las líneas celulares C33A, C33A-E6*I, C33A-E6*II y C33A-E6^E7.	55
Tabla 7	Análisis in silico de los factores de <i>splicing</i> para la unión probable de p53, E2F y NF-κB.	56
Tabla 8	Expresión a nivel de mRNA de Ro52 en las líneas celulares C33A, CaSki, SiHa, C33A-E6SDM, C33A-E7 y C33A-Mock.	60

ABREVIATURAS

μL:	micro Litro
μM:	micro Moles
3´ss:	Sitio de Splicing 3´
5´ss:	Sitio de Splicing 5´
ABIN:	Proteína de Unión a A20 inhibidora de NF-κB
ATP:	Trifosfato de Adenosina
BAFFR:	Receptor del Factor Activante de células B
BPS:	Sitio de Ramificación
CaCU:	Cáncer Cervico-Uterino
CD:	Grupo de diferenciación
cDNA:	DNA complementario
DAZAP1:	Proteína 1 Asociada a la Deletada en Azoospermia
DNA:	Acido Desoxirribonucleico
E6AP:	Proteína asociada a E6
E6SDM:	E6 Sitio Donador Mutado
EBV:	Virus Epstein-Barr
ESE:	Potenciador exónico del splicing
ESS:	Inhibidor exónico del splicing
GFP:	Proteína Verde Fluorescente
hnRNP E2:	Ribonucleoproteína heterogéneo nuclear E2
IFN:	Interferón
IKKα:	Cinasa del Inhibidor del Factor Nuclear kappa B subunidad alfa
IKKβ:	Cinasa del Inhibidor del Factor Nuclear kappa B subunidad beta
IKKγ:	Cinasa del Inhibidor del Factor Nuclear kappa B subunidad gamma
IL:	Interleucina

IRF:	Factor de Respuesta a IFN
IκB:	Inhibidor del Factor Nuclear kappa B
kDa:	kilo Daltons
L:	Litro
LCR:	Región Larga de Control
LTβR:	Receptor de Linfotoxina beta
LUBAC:	Complejo de Ensamble de Cadenas Lineares de Ubiquitina
M:	Molar
MEM:	Medio Esencial Mínimo
mM:	mili Molar
mRNA:	RNA mensajero
NEMO:	Modulador Esencial del Factor Nuclear kappa B
NF-κB:	Factor Nuclear kappa B
NIK:	Cinasa Inductora de NF-kappaB
ORF:	Marco de Lectura Abierto
PBS:	Buffer Fosfato Salino
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH:	Potencial de Hidrogeno
PPT:	Tracto de polipirimidinas
PTB:	Proteína de Unión al tracto de Polipirimidinas
PVDF:	Polifluoruro de Vinilideno
qPCR:	PCR cuantitativa
RANK:	Receptor Activador del Factor Nuclear kappa B
Rb:	Retinoblastoma
RNA:	Acido Ribonucleico
Ro52/SSA:	Antígeno A del síndrome de Sjögren de 52 kDa
RPMI:	Medio Roswell Park Memorial Institute

SD:	Sitio Donador
SDS:	Dodecilsulfato Sódico
SF2/ASF:	Factor de Splicing 2 / Factor de Splicing Alternativo
SFB:	Suero Fetal Bovino
shRNA:	RNA pequeño con horquilla
SMA:	Atrofia Muscular Espinal
SNP:	Polimorfismo de un solo nucleótido
snRNA:	RNA pequeño nuclear
snRNP:	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares
STAT1:	Transductor de Señales y Factor de Transcripción 1
TAK:	Cinasa Asociada a Aminotransferasa de Tirosina
TBS:	Tris Buffer Salino
TIA1:	Antígeno 1 Intracelular de células T
TIAR:	Antígeno Relacionado a TIA1
TNF:	Factor de Necrosis Tumoral
TNFR:	Receptor del TNF
U170k:	Subunidad U1 de 70 kDa
U2AF65:	Factor asociado a U2 de 65 kDa
U:	Unidades
UBAN:	Unión a Ubiquitinas en ABIN y NEMO
VIH:	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VPH:	Virus del Papiloma Humano

RESUMEN

El cáncer cervical es la segunda causa de muerte en mujeres alrededor del mundo; el virus del papiloma humano (VPH) es el principal factor de riesgo para el desarrollo de este tipo de cáncer; las oncoproteínas E6 y E7 de VPH tienen un papel importante en la transformación e inmortalización de las células huésped. Datos del laboratorio, muestran que las oncoproteínas E6 y E7 alteran la expresión de algunos factores de *splicing*, sin embargo desconocemos a qué nivel se da dicha alteración. Para tratar de elucidarlo, se analizó la expresión de los factores TIA1/TIAR, SF2/ASF, hnRNP E2, U2AF65, U170k y DAZAP1 en las líneas celulares C33A (Negativa a VPH), CaSki, HeLa y SiHa (Positivas a VPH), por medio de western blot a nivel traduccional y PCR en tiempo real a nivel transcripcional. Para definir el papel de VPH se transfectó la línea celular C33A con un bicistrón proveniente de la línea CaSki (E6/E7C), y para determinar el papel independiente de las proteínas producidas por este bicistrón se transfectó nuevamente la línea celular C33A con monocistrones de E6SDM, E7, E6*I, E6*II y E6^E7. Al analizar por medio de western blot y PCR en tiempo real los factores antes mencionados, encontramos que solo TIA1/TIAR y SF2/ASF son regulados positivamente por E6 o E7 a nivel de su RNA mensajero (mRNA), mientras que, todos son regulados por E6*I al mismo nivel. Para investigar si estas alteraciones se daban indirectamente a través de la vía de NF- κ B se trató a las líneas celulares CaSki y SiHa con 10 μ M del Inhibidor de la vía clásica de NF- κ B, BAY 11-7082 y se observó que solo U2AF65 y U170k parecen estar siendo reguladas por esta vía. Por otro lado decidimos analizar componentes de la vía clásica de de NF- κ B en CaSki y SiHa, y en C33A transfectada con E6SDM y E7, encontrando una relación entre el incremento de la expresión de Ro52, que se produce por la transfección con E6 o E7 y el incremento en la expresión de IKK β , cinasa que regula a I κ B. Nuestros resultados nos permiten sugerir que Ro52 estabiliza los niveles de proteína, y en general IKK, activando de esta manera la vía clásica de NF- κ B. Sin embargo, se requiere una investigación más detallada para esclarecer este fenómeno.

ABSTRACT

Cervical cancer is the second leading cause of death among women around the world, human papillomavirus (VPH) is the main risk factor for developing this cancer type, and the E6 and E7 oncoproteins of VPH play an important role in the transformation and immortalization of the host cells. We found that the E6 and E7 oncoproteins alter the expression of some *splicing* factors, however, is yet not known the regulation. The expression TIA1 / TIAR, SF2 / ASF, hnRNP E2, U2AF65, DAZAP1 U170k factors in the C33A cell line (VPH negative), CaSki, HeLa and SiHa (VPH positive) were analyzed by using western blot and real-time PCR, to define the role of VPH-16 E6/E7 in such expression alteration. To elucidate this point, the C33A cell line was transfected with an E6/E7C bicistron from CaSki, and the expression changes of these *splicing* factors, was analyzed. To determine the independent role of all proteins produced by the e6/E7 bicistrón, the C33A cell line was transfected with each other of the monocistronic constructs of E6SDM, E7, E6*I, E6 *II and E6^E7, and the expression profile of the aforementioned *splicing* factors was analyzed. We found that only TIA1 / TIAR and SF2 / ASF are upregulated by E6 and E7 in the mRNA level, while all of these factors were upregulated by the transfection with the E6*I and E6*II constructs, But no effect was observed with the transfection of E6^E7. To investigate whether the expression changes observed were controlled through of the NF- κ B pathway, CaSki and SiHa cells were incubated in presence of 10 μ M BAY 11-7082 (cognate NF- κ B classical pathway inhibitor), the results revealed, that only seem U2AF65 and U170k seem to be regulated by this pathway. Furthermore, we analyzed the expression of three components of the IKB Kinase (IKK), key protein for the regulation of the NF- κ B classical activation pathway, in these cells. By analyzing the expression changes of the IKK components in the C33A cells transfected with E6SDM and E7, we observed the association of the expression of Ro52 an important regulator of the NF- κ B activation by the IKK activation. Likely, Ro52 controls the IKK β protein levels, by stabilization of the IKK complex, thereby inactivating the classical pathway of NF- κ B. However a more detailed investigation is required.

INTRODUCCIÓN

El proceso de splicing

El *splicing* del pre-mRNA ocurre en el spliceosoma, el cual es un complejo de cinco RNAs pequeños nucleares (snRNA): U1, U2, U4, U5 y U6, un núcleo de proteínas asociadas y varios cientos de proteínas que se ensamblan en el pre-mRNA naciente, durante la transcripción (Fedor 2008). Las señales intrónicas clásicas de *splicing* consisten de tres elementos en *cis*: a) un sitio donador de *splicing* o 5'ss, b) un sitio de ramificación, y c) un sitio aceptor de *splicing*, el cual es bipartito y se constituye por una región de 15 a 40 pirimidinas (U's) llamado tracto de polipirimidinas (PPT) y el propio 3'ss formado por la secuencia YAG (Figura 1a). El primer paso en el reconocimiento exacto de un sitio donador (5'ss) y el sitio aceptor (3'ss) en un intrón, es definir el límite entre el exón-intrón, e involucra la interacción del 5'ss con U1 snRNP; la interacción del sitio de ramificación con U2 snRNP, y del aceptor de *splicing* con U2AF65 y U2AF35 (heterodímero de factores auxiliares de U2); ambas proteínas pertenecen a la familia SR y su función es modulada por otros factores de *splicing*, incluyendo proteínas SR (Wu y Maniatis, 1993; Zamore y Green, 1989).

Las regiones de secuencias específicas dentro de algunos exones pueden influenciar positivamente o negativamente en el reconocimiento de los sitios de *splicing* cercanos. Además de las secuencias que limitan el exón-intrón, hay otras que afectan su procesamiento. Las que lo afectan positivamente se conocen como enhancers; las que lo afectan negativamente, como silencers; ambas pueden ubicarse en los exones o los intrones. La actividad de los enhancers exónicos de *splicing* (ESE) o silencers exónicos de *splicing* (ESS) pueden ser modulados por otros factores de *splicing*. Por lo general los ESEs son reconocidos por proteínas SR, mientras los ESSs por hnRNPs, aunque esta correlación no siempre es estricta (Black 2003). Además la regulación por estos factores permite la expresión génica en una manera espacio-temporal (Blaustein 2007).

El complejo catalítico del spliceosoma (llamado complejo "C") no existe *de novo* en su estructura final, se forma paso a paso en un proceso altamente dinámico, y los complejos intermedios pueden ser aislados, en sus diferentes etapas, que

involucran los complejos intermediarios (E-A-B y C). El primer paso del proceso de *splicing* conocido como “E” (Early) es definido por la unión de U1 snRNP al 5' ss y por la unión del heterodímero U2AF65/35 en el tracto de polipirimidinas y en el sitio 3' ss: Además de la asociación de la proteína SF1 con la secuencia del punto de ramificación (BPS); SF1 interacciona con el factor U2AF, previo al reconocimiento del BPS. El complejo E evoluciona hacia el complejo pre-spliceosomal “A” por la adición de U2 snRNP en el BPS, (evento independiente de ATP) facilitando el apareamiento entre U2 snRNA y el propio BPS. Subsecuentemente, por el reclutamiento y adición del tri-snRNP U4-U6/U5, se forma el complejo “B”. Finalmente, el complejo “C” es formado por remodelación extensiva tanto del RNA como del complejo B, asumiendo un estado activo conocido como B*. Destacan la pérdida de las snRNPs U1 y U4, para producir un sitio activo capaz de realizar la química de transesterificación requerida para la liberación del intrón en forma de “lariat” o lazo y la ligación del exón (Staley y Guthrie 1998, Valadkhan 2007) (Figura 1a). Durante el primer paso catalítico del *splicing*, el límite 5' exón/intrón es cortado mediante un ataque nucleofílico del grupo 2'-hidroxilo de una adenosina específica en el BPS para generar un fragmento 5'-exon y un intermediario llamado “lariat” que contiene el intrón circularizado con la adenosina ramificada y un segmento en cadena sencilla que contiene el 3'-exon. En el segundo paso químico, el corte del límite 3'-exon/intrón ocurre mediante un segundo ataque nucleofílico, el 3'-hidroxilo del exón 5' ataca al 3' ss, liberando el intrón y como resultado se ligan los exones; el intrón se libera en forma de “lariat” (Fedor 2008) (Figura 1b).

Conexión entre splicing y enfermedad

El *splicing* alternativo es un mecanismo crucial para generar la diversidad de las proteínas. Variantes de *splicing* pueden mostrar diferentes funciones biológicas e incluso antagónicas. Mutaciones en elementos *cis*, o cambios en la actividad de proteínas regulatorias que comprometan la precisión del *splicing* constitutivo o alternativo pueden tener un impacto profundo en la patogénesis humana, en particular en el desarrollo y progresión de tumores. Existen muchos ejemplos de alteraciones en *splicing* asociadas a cáncer y son atribuibles a mutaciones que modifican sitios de *splicing*, *enhancers* o *silencers*. Sin embargo, solo en pocos casos, se ha probado una relación causa-efecto.

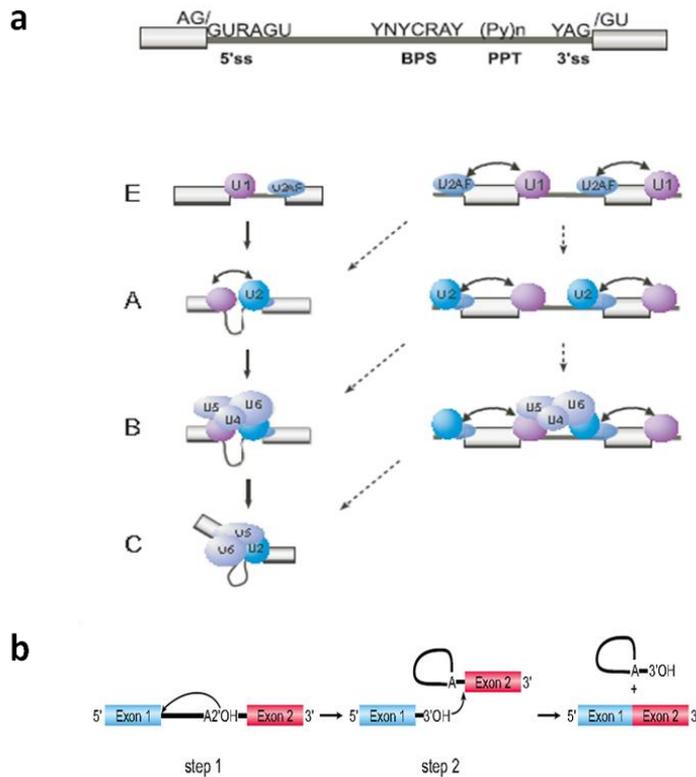


Figura 1. Proceso de *splicing*.

a) secuencias consenso que definen los límites exón/intrón. Los nucleótidos consenso son indicados debajo de la línea (Y= U ó C; R=G ó A), y la descripción esquemática de los pasos en el ensamble del spliceosoma. b) el *splicing* del pre-mRNA ocurre a través de dos reacciones secuenciales de transesterificación, que resulta en la liberación del intrón en forma de "lariat" y en la ligación de los exones.

La mayoría de las mutaciones en los sitios de *splicing* que llevan a alguna enfermedad involucran los dinucleótidos invariantes GT y AG en los sitios de *splicing* 5' y 3' respectivamente, y pueden llevar a la pérdida del *splicing*, y típicamente resulta en la exclusión del exón, la activación de sitios de *splicing* críticos o la retención del intrón. Incluso cambios en un par de bases en el intrón pueden afectar dramáticamente la inclusión del exón por romper el reconocimiento espliceosomal del sitio de *splicing* (Krawczak *et al*, 2007). Además, mutaciones dentro de exones codificantes pueden tener efectos indeseables por alterar el *splicing*. Esto ocurre cuando las mutaciones alteran secuencias ESS o ESE. Un ejemplo, se observa en la Atrofia Muscular Espinal (SMA), en donde el gen SMN2 sufre una sustitución silente de C por T, la cual promueve la exclusión de exón 7 y produce una proteína truncada e inactiva. Hay dos modelos que explican la exclusión del exón; esta se produce por una ganancia de ESS o por la pérdida de un ESE (Lorson *et al*, 1999). En el modelo de ganancia de ESS, la mutación crea un ESS, sitio de unión para la proteína heterogéneo nuclear (hnRNP) A1, que funciona como un represor del *splicing*, mientras en el modelo de pérdida de ESE, la mutación altera un ESE, que

debilita la unión el activador de *splicing*, SF2/ASF, proteína de la familia SR (Kashima *et al*, 2007; Cartegni *et al*, 2002). Para algunos genes, la tasa de dos o más variantes de *splicing* puede ser apropiadamente balanceada, en respuesta a cambios en las condiciones celulares. La regulación antagonista entre factores que actúan positiva o negativamente contribuye a este delicado control y su desregulación puede llevar a enfermedad. La familia de las proteínas Bcl-2, ilustra como diferencias en el nivel de factores de *splicing* en *trans* pueden afectar el balance crítico entre sus variantes de *splicing*. Un miembro de esta familia, Bcl-X produce dos isoformas vía un sitio alternativo 5' de *splicing* en el primer exón codificante. El uso de sitio de *splicing* río arriba, crea una isoforma larga (Bcl-X_L) con funciones antiapoptóticas, mientras que el uso de sitio de *splicing* río abajo, produce una isoforma corta (Bcl-X_S) con función proapoptótica. Un desbalance de estas dos isoformas, ha sido implicado en varios cánceres; la antiapoptótica Bcl-X_L se sobre expresa en mieloma múltiple, carcinoma celular pequeño de pulmón, cáncer de mama y de próstata, y es asociada con un riesgo elevado de metástasis (Olopade *et al*, 1997; Tu *et al*, 1998). La expresión de la forma proapoptótica Bcl-X_S, esta disminuida en células transformadas, pero su sobre expresión forzada sensibiliza las células de cáncer de mama a agentes quimioterapéuticos (Sumantran *et al*, 1995).

Mutaciones causantes de enfermedad que actúan en *cis* afectan el *splicing* de un solo gen, mutaciones que afectan componentes de la maquinaria del *splicing* crean el potencial para alterar el *splicing* de múltiples genes. La desregulación de otros factores de *splicing* que actúan en *trans* también tiene efectos significativos sobre el *splicing*. Un ejemplo son las proteínas SR que controlan eventos de *splicing* alternativo en proto-oncogenes y genes supresores de tumor, frecuentemente modificando su actividad celular. Muchas proteínas SR son sobre-expresadas en tumores, un ejemplo son los altos niveles de SRp20, SF2/ASF y SC35 en cáncer de ovario (Fischer *et al*, 2004) y SF2/ASF en tumores de colon, tiroides, intestino delgado, riñón y pulmón (Karni *et al*, 2007), un estudio muestra que la sobre-expresión de SF2/ASF, puede transformar células inmortalizadas y células que expresan altos niveles de SF2/ASF son tumorigénicas en ratones desnudos. El fenotipo transformado de

estas células y de una línea celular de cáncer de pulmón exhiben alta expresión de SF2/ASF que puede ser revertida por su *knockdown* mediado por shRNA, indicando que los reguladores de *splicing* pueden ciertamente actuar como oncogenes (Karni *et al*, 2007).

Virus del Papiloma Humano (VPH)

Los papilomavirus son un grupo de virus de DNA sin envoltura, de aproximadamente 55 nm de diámetro que infectan desde peces y aves hasta mamíferos, incluyendo humanos. Los papilomavirus infectan epitelios y mucosas y usualmente causan tumores benignos, pero en ocasiones también causan neoplasias (Zheng y Baker 2006). Más de 100 genotipos diferentes de VPH han sido identificados, de los cuales cerca de 40 infectan la mucosa genital humana (Roden and Wu 2006) y 12 se consideran de alto riesgo por tener un papel preponderante en la etiología del cáncer cervical. El tipo más frecuente es el 16 (VPH-16), y se detecta en alrededor de 50% de los tumores cervicales (Muñoz *et al*, 2006). El genoma de los VPH contiene entre 6800 y 8000 pares de bases y se divide en ocho marcos de lectura abiertos (ORF) agrupados en dos grupos o “clusters”: E6, E7, E1, E2, E4, E5 y L2 y L1, codificantes para funciones “tempranas” (E) o “tardías” (L), ambos grupos están separados por una región no codificante, que se conoce como región larga de control (LCR) (Figura 2) (zur Hausen 2002, Howley y Lowy 2001).

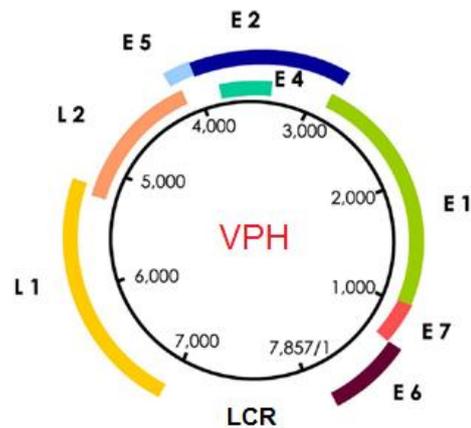


Figura 2. Representación esquemática del genoma del VPH. Se muestra la organización de los genes tempranos E (o genes no estructurales), los genes de la cápside o estructurales (L1 y L2) y la región larga de control (LCR).

Los tipos de papilomavirus se caracterizan por tener un 90% de identidad en la secuencia del gen L1; el marco de lectura abierto (ORF) mas conservado del genoma de los virus de papiloma. Sin embargo, la variación genética de los papilomavirus no solo está presente entre los diferentes tipos, sino también dentro de los mismos tipos virales. Las variantes intratípicas de VPH se definen por la variación de 2% o menos dentro de los ORF de E2, E6 y de E7 (De

Villiers *et al*, 2004). Las variantes intratípicas de VPH-16 se agrupan de acuerdo con su origen geográfico: europeo (E), asiático (AS), asiático-americano (AA), africano 1 (A1), africano 2 (A2) y norteamericano (NA) (Ho *et al*, 1993). Adicionalmente, se han descrito polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) característicos de cada grupo de variantes (Zehbe *et al*, 1998; Swan *et al*, 2005). Algunos ocasionan cambios de aminoácidos que tienen un efecto en la actividad biológica del virus o al menos en las propiedades de la oncoproteínas E6 (Stöppler *et al*, 1996; Zehbe *et al*, 2009), lo que probablemente relaciona la asociación entre las variantes y los diferentes grados de riesgo de neoplasias intraepiteliales (Xi *et al*, 2007, Zehbe *et al*, 2001). La infección por papilomavirus humanos causa lesiones hiperproliferativas que pueden transformarse en neoplasias malignas. Los virus del papiloma humano son clasificados en bajo o alto riesgo por su propensión a causar cáncer cervical; los tipos de alto riesgo más notables son VPH-16 y VPH-18, los cuales son encontrados en más del 80% de estos tumores, lo que sugiere que este virus es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cervical (Roden y Wu 2006, zur Hausen 2008, Walboomers 1999).

El ciclo viral progresa junto con el estado de diferenciación de las células infectadas, de modo que las proteínas tempranas se expresan en las células basales e intermedias del epitelio escamoso estratificado, mientras que las proteínas tardías se expresan en las células más diferenciadas (Zheng and Baker 2006). La infección por papilomavirus requiere la disposición de células epiteliales o de mucosas que aún son capaces de proliferar (células de la capa basal), en estas células la expresión génica viral es suprimida, aunque la limitada expresión de genes virales tempranos específicos como E5, E6 y E7 resulta en una proliferación incrementada de las células infectadas y expansión lateral. En las capas suprabasales es iniciada la expresión de genes virales “tardíos”: el genoma circular es entonces replicado y se forman las proteínas estructurales. En las capas superiores de la epidermis o mucosa, se ensamblan y se liberan las partículas virales (Figura 3) (zur Hausen 1996).

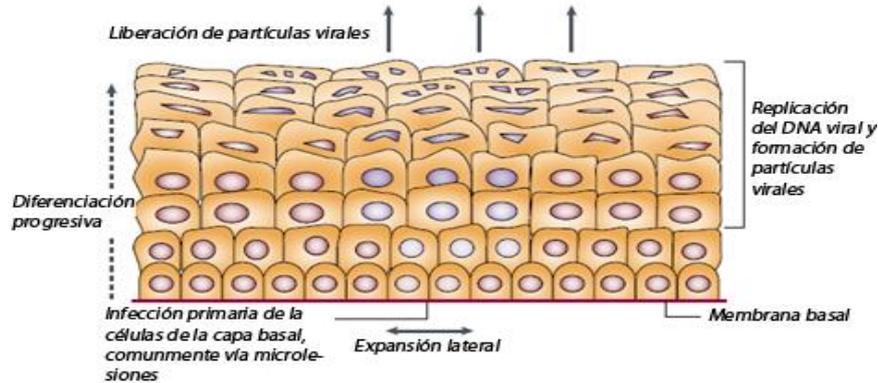


Figura 3. Ciclo de replicativo del virus del papiloma humano. La infección requiere la disponibilidad de células de la capa basal, esto usualmente ocurre en microlesiones de la piel o mucosa. Las células infectadas se dividen y la población se dispersa lateralmente, la progenie migra a las capas celulares suprabasales diferenciadas, donde los genes virales son activados, el DNA viral es replicado y las proteínas de la cápside formadas. Se produce la formación de las partículas virales, las cuales son liberadas en la superficie y pueden entonces infectar tejidos adicionales.

Los tres genes de VPH que poseen actividad proliferativa son: E5, E6 y E7; aunque el papel más relevante para la transformación maligna puede ser asignado a los genes E6 y E7 y sus respectivas proteínas, que son expresadas consistentemente en tejidos malignos, al inhibir su expresión, se bloquea el fenotipo maligno de las células de cáncer cervical. Las proteínas E6 y E7 son capaces por sí mismas de immortalizar varios tipos de células humanas en cultivos de tejido y la eficiencia con la que lo logran se incrementa cuando ambas proteínas son expresadas simultáneamente (Münger 1989).

Durante el ciclo replicativo del virus, la expresión de E6 y E7 es regulada transcripcionalmente por la proteína E2, de manera negativa. Sin embargo, en las lesiones cancerosas, el genoma viral a menudo se integra en el DNA celular. Típicamente, la integración ocurre de tal manera que el ORF de E2 se interrumpe, y se elimina el control transcripcional que ejerce en el promotor temprano, y el resultado es la producción descontrolada e incrementada de las oncoproteínas E6 y E7 (Hebner y Laimins 2005).

La proteína E6 de los VPH de alto riesgo contiene aproximadamente 150 aminoácidos, y su expresión se localiza tanto en el núcleo como el citoplasma de las células infectadas. E6 es una proteína con múltiples funciones, una de las mejor caracterizadas es la de interferir con la regulación del ciclo celular dependiente de la proteína p53. p53 controla (activa o reprime) transcripcionalmente la expresión de varias proteínas reguladoras que inducen arresto del ciclo celular y/o apoptosis en respuesta al daño al DNA. E6 de VPH de alto riesgo se une a p53 y facilita su degradación al formar un complejo trimérico con la ubiquitin ligasa celular E6AP, este complejo puede unirse a p53 y ubiquitarlo, promoviendo su degradación. De esta manera, evita su función de restricción sobre la síntesis de DNA y permite la replicación viral y del genoma celular (Hebner y Laimins 2006, Werness 1990).

La proteína E7 contiene aproximadamente 98 aminoácidos. Una de las principales funciones de E7, es unirse y promover la degradación de los miembros de la familia de proteínas Rb. Las proteínas Rb son los principales reguladores del ciclo celular, mediante el control de los factores E2F, que son parte de una familia de factores de transcripción que activan la expresión de muchos componentes implicados en la fase S del ciclo celular. En células normales, la fosforilación de Rb por complejos ciclina-cinasa produce la liberación de E2F; la proteína E7 puede superar esta barrera normal de control del ciclo celular, al unirse y promover la degradación de Rb hiperfosforilado en una vía dependiente de proteosoma, liberando así constitutivamente los factores E2F (Boyer 1996, Jones 1997).

Splicing alternativo de E6 y E7

Los transcritos de E6/E7 de los VPH de alto riesgo son los primeros que se expresan en las células basales y son producidos como mensajeros bicistrónicos o policistrónicos; subsecuentemente son modificados por *splicing*. El pre-mRNA de E6/ E7 de VPH-16 es transcrito del promotor P97 como un pre-mRNA bicistrónico, que contiene cuatro exones y tres intrones. Además, es procesado por *splicing* alternativo. El intrón 1 (ubicado en los genes E6 y E7) es procesado por *splicing* alternativo y está formado por un sitio donador (en el nucleótido 226) y tres sitios aceptores, por lo tanto, el intrón tiene tres

diferentes longitudes: intrón 1a (nucleótido 226:409), intrón 1b (nucleótido 226:526), intrón 1c (nucleótido 226:742); por lo tanto, su procesamiento alternativo es del tipo 3'. El *splicing* del pre-mRNA de E6/E7 produce los siguientes mRNAs: E6^I/E7, producido por unión de los nucleótidos 226 (5' ss) al 409 (3' ssA), E6^{II}/E7 unión del nucleótido 226 (5' ss) al 526 (3' ssB), y E6^E/E7, producido de la unión del nucleótido 226 (5' ss) al 742 (3' ssC) (Figura 3). Las formas procesadas del transcrito E6 producen formas cortas de la proteína E6. Ocasionalmente, este intrón permanece sin sufrir *splicing*, se produce el pre-mRNA E6/E7 sin procesar y como resultado se expresa la proteína E6 oncogénica de longitud completa (Zheng y Baker 2006, Smotkin 1989). Es notable que en el VPH-16 el sitio de ramificación se produzca en una guanosina, generando un *splicing* poco eficiente que permite que un porcentaje del pre-mRNA permanezca sin procesar (De la Rosa-Ríos 2006).

El *splicing* del RNA de E6/E7 provee tres transcritos capaces de expresar la proteína E7 y se sugiere que por el *splicing* en el transcrito E6/E7, se generan transcritos con un potencial mayor para traducir E7, mientras la carencia de *splicing* del RNA produce bajos niveles de traducción de E7. Sin embargo, un procesamiento muy eficiente por *splicing* de los transcritos de E6/E7 podría prevenir la expresión de una proteína E6 funcional. Obviamente la proporción óptima de proteínas E6 y E7 depende del *splicing* del transcrito E6/E7 finamente regulado y procesado.

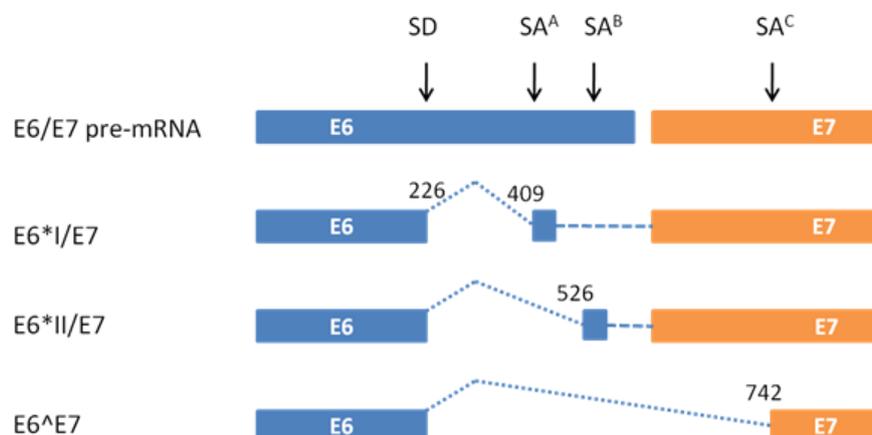


Figura 4. *Splicing* alternativo del pre-mRNA de E6/E7. Organización genómica de los genes E6/E7 de VPH-16, el intrón 1 tiene un sitio donador (SD) en el nucleótido 226 y tres sitios aceptores en los nucleótidos 409 (SAA), 526 (SAB) y 742 (SAC).

Únicamente E6 de longitud completa exhibe capacidad transformante, mientras que virus modificados experimentalmente que contienen solo E6*1, no son capaces de replicarse eficientemente en cultivos organotípicos. E6*1/E7 es producida mediante la exclusión de un fragmento de 183 pb del ORF de E6, el cual lleva a un desplazamiento del marco de lectura y a un codón de terminación prematuro. La proteína E6*1 (de 8 kDa) ha mostrado modular funciones de E6, se ha mostrado que E6*1 del VPH-18 puede contrarrestar las funciones de E6, restableciendo los niveles de p53 *in vivo* (Pim y Banks, 1999). Aunque la interacción de E6 de VPH-16 con procaspasa-8 acelera su degradación, la unión de E6*1 resulta en su estabilización y por lo tanto puede sensibilizar a las células a apoptosis mediada por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Pim 1999, Filippova 2007).

Las vías de señalización de NF- κ B

La familia de factores de transcripción del factor nuclear kappa B (NF- κ B) regula diversos procesos biológicos, incluyendo muchos aspectos de la función inmunológica, inflamación y supervivencia celular (Vallabhapurapu *et al*, 2009; Hayden *et al*, 2008 y 2011). Esta familia está compuesta de factores de transcripción estructuralmente homólogos, incluyendo NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA, RelB y c-Rel, los cuales se unen al “enhancer” κ B como homo o heterodímeros. Las proteínas de NF- κ B están secuestradas normalmente en el citoplasma por proteínas inhibitoras específicas, inhibidores de NF- κ B (I κ Bs), caracterizados por la presencia de repetidos de anquirina en su estructura. El miembro prototipo de I κ B es I κ B α , el cual tiene un papel importante en mediar la activación de la vía canónica (o clásica) de NF- κ B (Hayden *et al*, 2008). Los factores NF- κ B1 y NF- κ B2 son producidos por sus proteínas precursoras, p105 y p100 respectivamente, las cuales funcionan como moléculas parecidas a I κ B. La porción C-terminal tiene estructura homóloga con I κ B e inhibe su translocación nuclear. El procesamiento de p105 y p100 mediante proteasoma no solo genera sus respectivas proteínas maduras p50 y p52, sino que también resulta en su translocación nuclear (Beinke *et al*, 2004).

Las vías de señalización que median la activación de NF- κ B pueden ser clasificadas en canónica o no canónica (o alternativa). La vía canónica

responde a numerosos estímulos, incluyendo ligandos para receptores de antígeno, receptores de citocinas, receptores de reconocimiento de patrones, entre otras. (Hayden *et al*, 2008). Las diferentes señales convergen en un complejo I κ B cinasa (IKK) compuesto de las subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) y regulatoria (IKK γ o NEMO). Después de la activación, IKK fosforila a I κ B α en dos serinas del N-terminal llevando a su ubiquitilación y degradación proteasomal mediada por β TrCP1, (Winston *et al*, 1999) esto lleva a la translocación nuclear de los complejos NF- κ B, predominantemente los dímeros p50/RelA y p50/c-Rel. La activación de la vía no canónica de NF- κ B involucra diferentes moléculas de señalización y lleva a la activación de un dímero predominante: p52/RelB (Sun 2011). En contraste a la activación de la vía canónica de NF- κ B por diversos receptores de señal, únicamente un subconjunto de miembros de la superfamilia de TNFR media la inducción de la vía no canónica de NF- κ B: entre estos LTbR (Dejardin *et al*, 2002), CD40 (Coope *et al*, 2002), BAFFR (Kayagaki *et al*, 2002, Novack *et al*, 2003), RANK (Novack *et al*, 2003), TNFR2 (Monroe & Bishop 2004, Rauert *et al*, 2010), CD27 (Ramakrishnan *et al*, 2004), entre otros. El principal efecto de la activación de la vía no canónica involucra la inducción del procesamiento del precursor p100 en su forma madura p52 y su translocación al núcleo del complejo p52/RelB (Bonizzi & Karin 2004). En esta vía NIK (Cinasa inductora de NF- κ B) tiene un papel importante al activar IKK α por fosforilación en dos serinas Ser176 y 180 (Ling, *et al* 1998), así el procesamiento de p100 es mediado por dos fosforilaciones en dos serinas en su C-terminal realizadas por IKK α (Senftleben *et al*, 2001), de esta forma el dímero maduro p52/RelB puede translocarse al núcleo y ejercer su función como factor de transcripción.

Antecedentes

Virus y Splicing

Se ha propuesto una conexión de alteraciones en el *splicing* con diferentes enfermedades, (alteraciones en *cis* o factores que actúan en *trans*), también se ha reportado la desregulación de factores de *splicing* como proteínas SR y también de hnRNPs en diferentes tipos de cáncer (Grosso *et al*, 2008), sin embargo no hay estudios que demuestren que la desregulación de estos factores tenga algún efecto directo o indirecto sobre el proceso de immortalización y malignización de las células cancerígenas. Dado que, la alteración de los niveles de factores de *splicing* puede cambiar el transcriptoma de una célula, sería interesante investigar si estos cambios contribuyen a la heterogeneidad tumoral. Los tumores aun cuando son de un mismo tipo, son heterogéneos entre individuos y también sus metástasis son heterogéneas en un mismo individuo (Grosso *et al*, 2008). Por otro lado, también son escasos los estudios donde se demuestre que la desregulación de factores de *splicing* puede ser debida no solo a mutaciones dentro del genoma, sino que también sea consecuencia de la infección por algún patógeno para el ser humano, como lo son los virus.

A este respecto, en un estudio reportado por Dowling *et al*, 2008, se describe que en macrófagos infectados con HIV-1 la expresión de factores de *splicing* mostro un patrón inverso entre factores potenciadores (miembros de la familia de proteínas SR o proteínas de unión a RNA) y factores inhibitorios (miembros de la familia hnRNP), al comparar células infectadas y no infectadas del mismo donador. Mientras los niveles de la proteína SC35 fueron incrementados en las primeras semanas después de la infección, las hnRNP A/B y H disminuyeron. Alrededor del pico mínimo de producción de virus, la expresión de SC35 disminuyo a niveles comparables de células no infectadas o menores, mientras las hnRNPs se incrementaron, en relación a sus niveles control. Por ejemplo, la disminución drástica en los niveles de SC35 produce una pérdida de la expresión de los oncogenes E6/E7 de VPH-16 (Graham *et al*, 2015)

En otro estudio, Verma *et al*, 2010 muestran que la proteína SM del virus Epstein-Barr (EBV), la cual es una proteína de unión a RNA, activa el *splicing* a

través de su interacción con proteínas SR. Estudios de purificación por afinidad y espectrometría de masas de complejos SM provenientes de células transfectadas con la proteína SM llevaron a la identificación del factor de *splicing* SRp20 como una proteína que interactúa con SM. Esta interacción es importante para los efectos de SM sobre el *splicing* alternativo de STAT1, mientras la sobre-expresión de SRp20 potencia el *splicing* mediado por SM, el silenciamiento de SRp20 inhibe el efecto de SM sobre el *splicing*.

Bridge *et al*, 1994, mostraron que la infección por adenovirus afecta la distribución nuclear de factores de *splicing* celulares. Las células infectadas en su fase tardía contienen grupos discretos de snRNPs que están separadas de centros que contienen proteínas de unión a DNA virales de 72 kiloDaltons (proteína 72K). Durante el comienzo de la fase tardía, la distribución intranuclear de factores de *splicing* es muy diferente de la vista después de que la fase tardía está establecida. Cuando la transcripción viral tardía comienza, las células con grupos de snRNP son menos prevalentes que en cultivos que contienen los máximos niveles de transcripción. En cambio, algunas células que contienen snRNPs concentrados en un foco y que también contienen la proteína viral 72K, estos focos de snRNPs desaparecen de los cultivos de 18 a 20 horas después de la infección con alta multiplicidad. Los resultados sugieren que existe una organización dinámica de los factores de *splicing* en las células infectadas.

En la literatura existen varios estudios donde se muestran otros virus interactuando o desregulando factores de *splicing* celulares, en cambio los ejemplos anteriores son muestra de que los virus pueden actuar a diferentes niveles, desregulando la expresión, interactuando con ellos, modificando la afinidad por sus blancos, y alterando la localización de estos. Sin embargo, poco se sabe sobre el efecto de estas alteraciones en la producción de enfermedad. Para el caso de VPH, no se sabe si éste influye de manera directa en el proceso de immortalización y malignización de las células huésped. A continuación se muestran estudios en donde se ha sugerido que VPH desregula la expresión de factores de *splicing*, pero salvo por algunas excepciones, no se muestra el efecto sobre dicha desregulación por lo que si VPH es responsable de ello es una mera asociación. Un estudio de Cheunim *et*

al, 2008 muestra que los factores de *splicing* SF2/ASF y hnRNP A1 son sobre-regulados en queratinocitos infectados con VPH-16 en un modelo de diferenciación celular (Cheunim *et al*, 2008). Más tarde el mismo grupo de investigación utilizando una serie de líneas cervicales que modelan la progresión de un tumor cervical, mostraron que SF2/ASF, SRp20 y SC35 son sobre-reguladas (Mole *et al*, 2009). Y por último utilizando técnicas como inmunoprecipitación de la cromatina demuestran que E2 de VPH-16 transactivan al promotor de SF2/ASF, regulando así su expresión.

Datos de nuestro laboratorio, muestran que las líneas celulares positivas para VPH-16 (CaSki y SiHa) tienen un perfil heterogéneo en la expresión de factores de *splicing*; esta heterogeneidad puede ser producida por las diferencias inherentes a las líneas celulares, ya sea genómicas o debido a su estado de diferenciación. En dichas células se observa la variación de la expresión de los factores de reconocimiento U170k y U2AF65, y de las proteínas regulatorias de *splicing* SF2/ASF y PTB entre las líneas celulares (Del Moral-Hernández *et al*, 2010). Al analizar otros factores de *splicing* como lo son TIAR, Ro/SSA, hnRNP E2 y DAZAP1 también se observan diferencias en su expresión. Al transfectar la línea celular C33A que es negativa a VPH con tres diferentes bicistrones (E6E7C, E6E7R y E6E7S) provenientes de tres variantes polimórficas del VPH16 y analizar nuevamente la expresión de estos factores de *splicing* se obtiene un patrón de expresión heterogéneo a pesar de tener el mismo fondo genético, es decir las diferencias en la expresión de estos factores son debidas a los productos de expresión de los diferentes bicistrones. Asimismo, cuando se transfecta C33A pero ahora solo con las oncoproteínas E6 y E7 por separado, se observa que los cambios en la expresión de los factores TIAR, DAZAP1, Ro/SSA, hnRNP E2 y SF2/ASF son más marcados, lo que sugiere que las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16 son las responsables de dicho cambios (Díaz-Hernández, Tesis de maestría).

Ro52 y NF-κB

Ro52/SSA (Antígeno A del síndrome de Sjögren) es una proteína relativamente nueva, descubierta en un inicio en pacientes con síndrome de Sjögren al detectar auto-anticuerpos contra esta proteína y contra otra proteína no

homóloga y no relacionada: Ro60 (Ben-Chetrit *et al*, 1988; Itoh *et al*, 1991), pero últimamente mas estudiada por el probable papel que tiene en la vía canónica de NF- κ B y en otros procesos como una E3 ubiquitin ligasa.

Ro52 o TRIM21 (Dominio tripartito 21) es un miembro de la familia de proteínas de dominio tripartito, caracterizados por tres dominios en el N-terminal: RING, B-box y “coiled coil” (Reymond *et al*, 2001). El dominio RING es crítico para la actividad E3 ubiquitin ligasa (Zheng *et al*, 2000; Joazeiro *et al*, 1999), mientras que los dominios B-box y “coiled coil” son importantes para la homo o heterodimerización (Peng *et al*, 2000; Napolitano y Meroni 2012). Por la presencia del dominio RING en Ro52 se pensaba que tenía funciones de E3 ubiquitin ligasa, hasta que en 2006 Wada y Kamitani demostraron mediante ensayos *in vitro* que Ro52 se mono-ubiquitila a sí misma, y que esta ubiquitilación es dependiente de su dominio RING, sin embargo esta ubiquitilación no la lleva a su degradación proteasomal por lo que esta modificación puede participar en eventos no proteasomales. Posteriormente se demostró que Ro52 interactúa con IKK β y además lo mono-ubiquitila, dentro de los requerimientos *in vitro* para este proceso se necesita: Ubiquitina, una enzima E1 y E2. El resultado de la mono-ubiquitilación de IKK β es la disminución de la expresión de genes dependientes de NF- κ B en células HEK293 (Wada *et al*, 2009). Más adelante este mismo grupo de trabajo demostró que esta modificación lleva a una translocación subcelular de IKK β a autofagosomas y en menor cantidad autofagolisosomas, y también que la actividad de ubiquitin ligasa de Ro52 está involucrada en la reducción de los niveles endógenos de fosfo-IKK β inducido por Tax, es decir Ro52 mono-ubiquitila a IKK β activo, esta modificación lleva a su degradación vía autofagia, de esta manera inhibe la actividad de la vía canónica de NF- κ B (Niida *et al*, 2010).

Por otro lado hay diversos estudios que resaltan la importancia de la ubiquitilación en la vía de NF- κ B, y particularmente del papel de NEMO en dicha vía. Se ha reportado que la unión de NEMO a poliubiquitinas ligadas a lisina 63 (Lys 63 o K63) es requerida para la activación normal de IKK y NF- κ B inducida por TNF α . Sobre todo la unión de NEMO a su principal blanco RIP poliubiquitinado en Lys 63, además NEMO tiene la habilidad de unirse a

proteínas que han sido modificadas por poliubiquitinación en K63, también existe la posibilidad de que se una a sí mismo en esta modificación (Wu *et al*, 2006). En otro estudio realizado por Ea *et al*, 2006 demuestra que la poliubiquitinación de RIP es importante para reclutar los complejos TAK1 e IKK, NEMO se une preferencialmente a cadenas de poliubiquitina en K63 en RIP1, el cual recluta a TAK1 e IKK al TNF-R1. En contraste una mutante de NEMO que carece de la región de unión a IKK (86-419) o carente del dominio de unión a poliubiquitina (1-302) es deficiente en la activación de IKK, sugiriendo que la habilidad de unión de NEMO a ubiquitinas puede estar relacionada a su habilidad de mediar la activación de IKK inducida por TNF α (Ea *et al*, 2006). Posteriormente análisis estructurales, bioquímicos y funcionales proporcionaron evidencia de que la unión de NEMO a cadenas lineales de ubiquitinas juega un papel importante en la activación de la vía canónica de NF- κ B, y esta función es dependiente del dominio de unión a ubiquitina, ahora llamado UBAN (Unión a ubiquitinas en ABIN y NEMO) (Rahighi *et al*, 2009).

En otro estudio, se ha determinado que un complejo llamado LUBAC (Complejo de ensamble de cadenas lineales de ubiquitina, compuesto por dos proteínas con dedos RING: HOIL-1L y HOIP) se une a NEMO en el complejo canónico IKK y que además conjuga cadenas lineales a este factor, por lo que puede estar involucrado en la activación de dicho complejo. De esta forma la estimulación con citocinas pro-inflamatorias incluyendo IL-1 β y TNF α induce la asociación de LUBAC con NEMO en el complejo IKK, lo cual provoca la poliubiquitinación lineal de NEMO en Lys 285 y Lys 309, y subsecuentemente activación de NF- κ B (Tokunaga *et al*, 2009).

Tanto la poliubiquitinación de NEMO, como el reconocimiento de poliubiquitinas en K63 por el mismo, son importantes en la vía de señalización canónica de NF- κ B. Dado que datos obtenidos en nuestro laboratorio indican que en las líneas celulares CaSki y SiHa las vías de señalización de NF- κ B se encuentran activadas diferencialmente, y que Ro52 se expresa diferencialmente en estas células, lo cual parece ser dependiente de E6 y E7, ya que cuando se transfectan en C33A (VPH-) inducen una mayor expresión de Ro52 (Díaz-Hernández, Tesis de Maestría), por lo que existe la posibilidad de que E6 o E7 alteren la vía canónica de NF- κ B al desregular la expresión de Ro52.

Varios estudios resaltan la importancia de β TrCP1 por su capacidad de ubiquitar al dominio de destrucción (DpSGXXpS) dependiente de fosforilación y que está presente en varios miembros de I κ B (Wu y Ghosh, 1999; Shirane *et al*, 1999), además también p105 en su C-terminal contiene un dominio de destrucción y después de su fosforilación por IKK es reconocido por una β TrCP E3 ubiquin ligasa que media su poliubiquitinación a degradación completa por proteosoma. Así p105 es degradada de la misma forma como I κ B α , de esta forma es interesante como otros miembros de la familia NF- κ B pueden ser degradados cuando estén formando complejos con p105 (Heissmeyer *et al*, 2001). Por otro lado β TrCP1 también juega un papel importante en la vía de β -Catenina (Fuchs *et al*, 1999; Hart *et al*, 1999; Kitagawa *et al*, 1999), así como en diversas fases del ciclo celular (Guardavaccaro *et al*, 2003; Margottin-Goguet *et al*, 2003), y en respuesta a daño al DNA (Jin *et al*, 2003), por lo que es importante también analizar su expresión bajo los efectos de E6 o E7, dado que hasta el momento no hay reportes de una relación entre ambos.

Justificación

El CaCU ocupa el segundo lugar de mortalidad entre las mujeres de todo el mundo, y es el principal cáncer en las mujeres de los países en vías de desarrollo. En México para el año 2008, fue la segunda causa de muerte con respecto a otros cánceres, y es el virus del papiloma humano (VPH) el principal factor de riesgo para el desarrollo de CaCU. Adicionalmente está demostrado que las oncoproteínas E6 y E7, participan en el desarrollo de cáncer cervical.

El mecanismo de *splicing* alternativo genera una amplia variedad de transcritos y es el principal medio de diversificación del transcriptoma y del proteoma, por lo que una alteración en la red regulatoria del *splicing* puede contribuir al desarrollo de varias enfermedades, incluyendo cáncer. Algunos factores de *splicing* son sobre-expresados en lesiones cervicales de alto grado asociadas a VPH y en tumores cervicales, indicando que pueden tener alguna participación en el proceso oncogénico. Sin embargo, en CaCU asociado a VPH, se desconoce el efecto de esta alteración en los niveles de los factores de *splicing* en los mecanismos de oncogénesis del virus. Estos factores podrían ser biomarcadores útiles para el pronóstico de la enfermedad asociada al VPH.

Las vías de NF- κ B regulan procesos importantes como la supervivencia celular, por lo que determinar cuál es el papel de los oncogenes E6 y E7 en dicha vía podría ayudar al desarrollo de mejores terapias en CaCU, dado que se ha visto en este tipo de cáncer que las vías de NF- κ B se encuentran activas y se han asociado a una mayor resistencia al tratamiento. De esta forma al determinar el papel de la relación E6/E7 – Ro52 – NF- κ B permitirá conocer un posible mecanismo de la resistencia a fármacos en CaCU asociado a VPH.

Hipótesis

1. Las oncoproteínas E6/E7 de VPH-16 desregulan indirectamente la expresión de algunos factores de *splicing* a través del efecto que ejercen sobre la actividad de algunos factores de transcripción, como NF- κ B.
2. Las oncoproteínas E6/E7 de VPH-16 desregulan la expresión de Ro52 y esta a su vez tiene impacto sobre la vía canónica de NF- κ B.

Objetivos generales

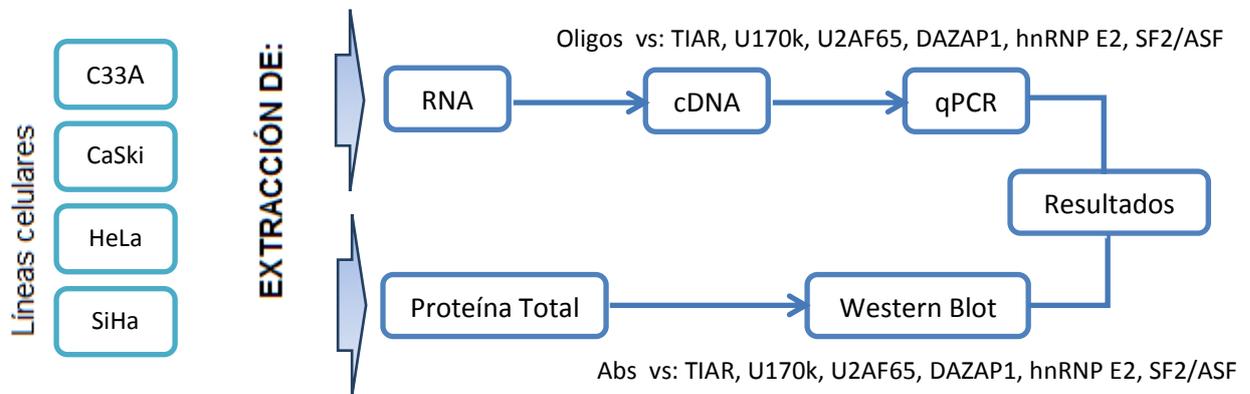
- Investigar la forma en que las oncoproteínas E6 y E7 de VPH -16 o sus isoformas (E6*I, E6*II, E6^E7) desregulan la expresión de algunos factores de *splicing*.
- Determinar si E6 y/o E7 alteran la expresión de Ro52 y determinar cuál es el efecto sobre la vía de señalización canónica de NF-κB.

Objetivos específicos

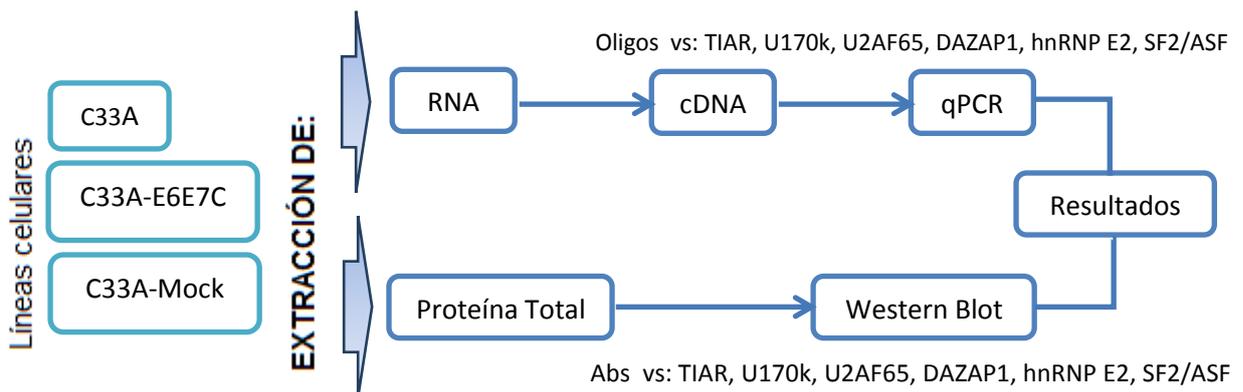
- Analizar si la variación de los factores de *splicing* en las diferentes líneas de CaCU es a nivel transcripcional.
- Analizar si la variación de los factores de *splicing* es debida a E6/E7.
- Analizar el efecto de E6 y E7 sobre la variación de los factores de *splicing*.
- Analizar el efecto de las isoformas de E6 (E6*I, E6*II, E6^E7) de VPH-16 en la variación de los factores de *splicing*.
- Determinar el papel de la vía clásica de señalización de NF-κB sobre la variación de los factores de *splicing* en las líneas de CaCU.
- Determinar el papel de Ro52 en las vía clásica de señalización de NF-κB en las líneas celulares de CaCU.

Estrategia Experimental

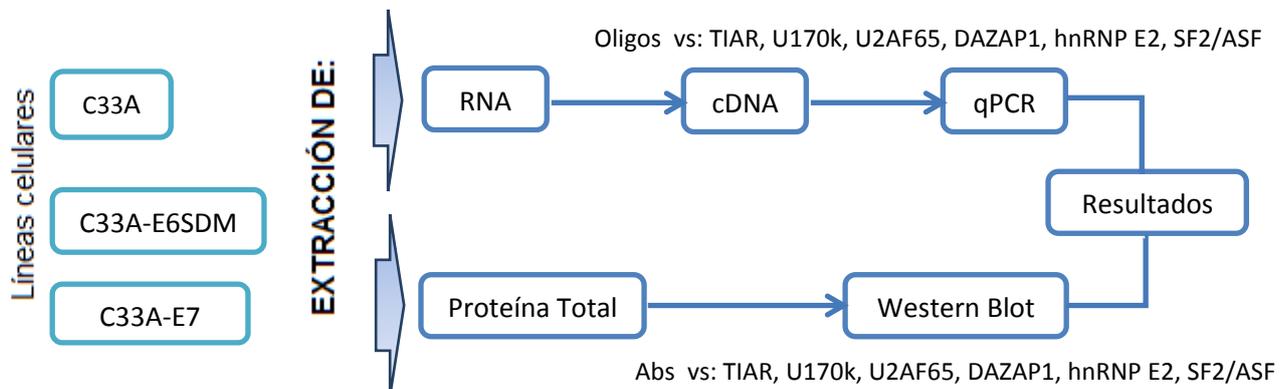
Objetivo: Analizar si la variación de los factores de *splicing* en las diferentes líneas de CaCU es a nivel transcripcional.



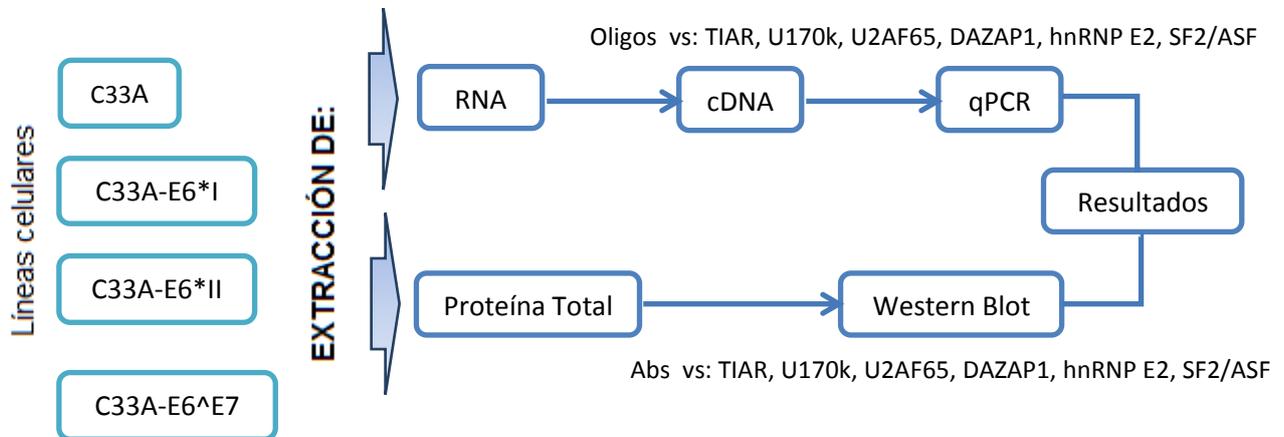
Objetivo: Analizar si la variación de los factores de *splicing* es debida a E6/E7.



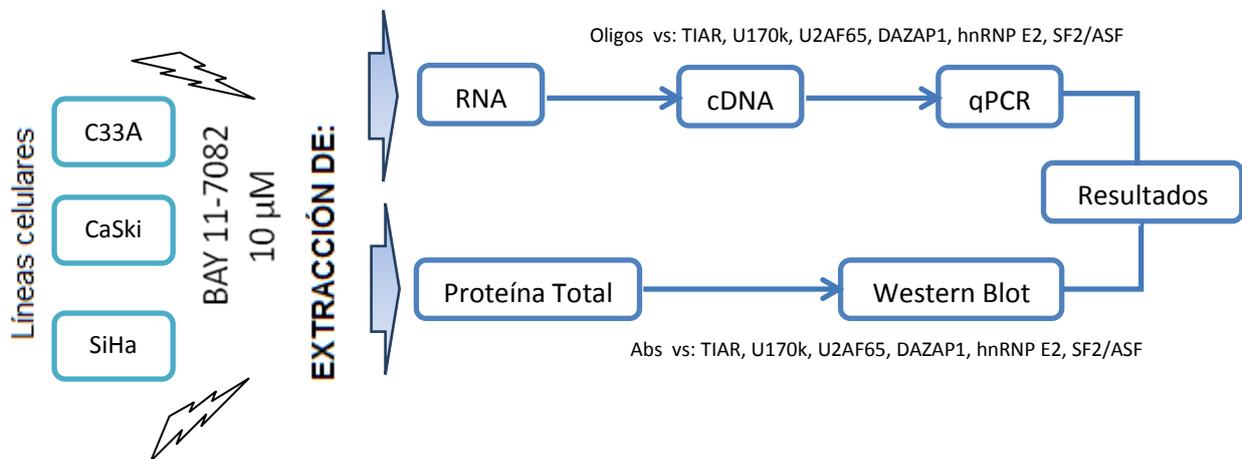
Objetivo: Analizar el efecto de E6 y E7 sobre la variación de los factores de *splicing*.



Objetivo: Analizar el efecto de las isoformas de E6 (E6*I, E6*II, E6^E7) de VPH-16 en la variación de los factores de *splicing*.

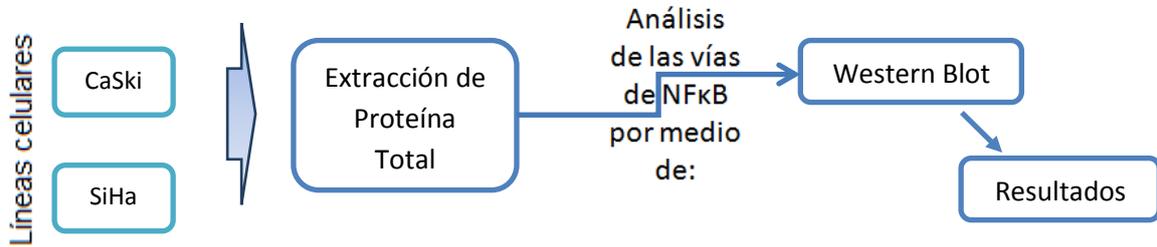


Objetivo: Determinar el papel de la vía clásica de señalización de NF-κB sobre la variación de los factores de *splicing* en las líneas de CaCU.

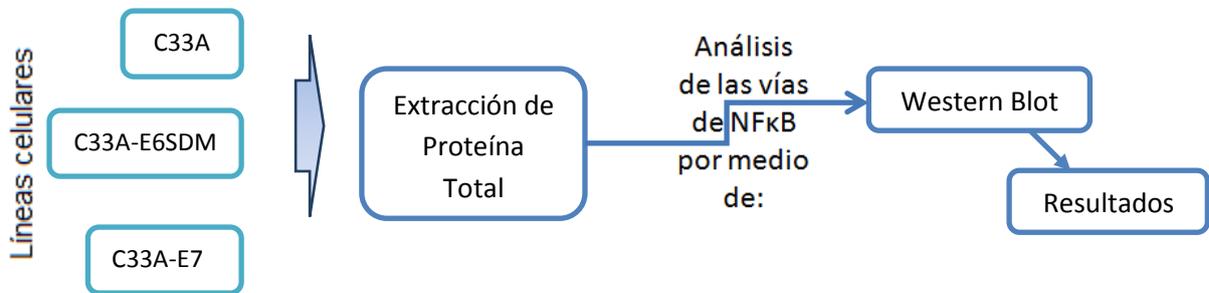


*BAY-11082: Es un inhibidor de la vía clásica de NF-κB, inhibe la fosforilación de IκBα y por ende su degradación vía proteosoma, a altas concentraciones es capaz de inhibir la vía no clásica de NF-κB.

Objetivo: Determinar el papel de Ro52 en las vías de señalización de NF- κ B en las líneas celulares de CaCU.



Ab vs: Ro52, IKK α , IKK β e IKK γ , I κ B α , β -TrCP



Ab vs: Ro52, IKK α , IKK β e IKK γ , I κ B α , β -TrCP

Materiales y Métodos

Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las líneas celulares derivadas de carcinoma cervical SiHa (positiva para VPH-16), HeLa (positiva para VPH-18) y C33A (negativa a VPH) se crecieron en medio MEM adicionado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y 1% de penicilina/estreptomicina. La línea celular CaSki (positiva para VPH-16) se creció en medio RPMI adicionado con aminoácidos no esenciales al 1%, SFB y penicilina/estreptomicina en las mismas concentraciones que las anteriores, y todas se crecieron a 37°C con 5% de CO₂.

Las diferentes líneas transfectantes estables C33A-N1-E6E7C, C33A-N1-E6E7R, C33A-N1-E6E7S, C33A-N1-E6wt, C33A-N1-E7, C33A-N1-E6mut5', C33A-N1-E6*I, C33A-N1-E6*II, C33A-N1-E6^E7 y C33A-N1-GFP (mock) se crecieron en las mismas condiciones anteriores y adicionando 1% de geneticina (G418) como seleccionador de resistencia. Además se hizo una selección mediante "sorting" por medio de citometría de flujo, las células recuperadas se crecieron en las condiciones anteriores hasta lograr un 85-95% de estabilidad en las transfectantes.

Tratamientos

Las diferentes líneas celulares C33A, CaSki y SiHa fueron tratadas con el inhibidor de la vía clásica de NF-κB: BAY 11-7082 a 10 μM concentración final por una hora, después del correspondiente tiempo de incubación se procedió a cosechar las células y realizar extracción de proteínas.

Extracción de Proteínas

La extracción de proteínas totales se realizó utilizando el kit ProteoJET (Fermentas) + COMPLETE (inhibidor de proteasas). Se lavó la monocapa dos veces con PBS 1X y se agregó 800 μL de ProteoJET + COMPLETE, se cosecharon las células con gendarme y se centrifugaron a 12000 r.p.m por 15 min., se obtuvo la fase acuosa (proteína total) y se utilizó para los ensayos de western blot. En algunos casos se adicionaron inhibidores de fosfatasas (PhosStop – Roche), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Western Blot

Se extrajo proteína a partir de cultivos celulares de 72 h y/o con una confluencia de 90-100 %. Los extractos de proteína total se cuantificaron por el método de Bradford (Fermentas). De 10 a 50 µg de proteína total se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 o 12% [4 mL de agua des-ionizada, 2.5 mL de amortiguador pH 8.8 (Tris 1.5 mM, SDS 0.4%), 100 mL de SDS al 10%, 3.3 mL de acrilamida-bis-acrilamida al 30% (29% acrilamida, 1% bis-acrilamida), 100 mL de persulfato de amonio al 10%, 4 µL de TEMED (Sigma-Aldrich)]. Las proteínas se cargaron con el amortiguador de Laemmli (Tris 62 mM, SDS al 23%, glicerol al 10%, β-mercaptoetanol al 5%, azul de bromofenol al 0.1%) y como marcador de peso molecular se utilizó el *BenchMark Prestained Protein Ladder* (Invitrogen). La electroforesis se hizo en la cámara Hoefer SE 260 (Amersham Biosciences) con un amortiguador de corrimiento (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.05%). Las proteínas se electro-transferieron a membranas de PVDF en un amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, 20% de metanol). Después de la transferencia las membranas se bloquearon con una solución de TBS 1X-Tween-20 (Tris 10 mM pH 7.6, NaCl 100 mM, Tween-20 al 0.01%) con 5% de leche descremada en polvo durante 1 hora y se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios (Tabla No. 1). Las membranas se lavaron 3 veces con TBS 1X-Tween-20 y se incubaron durante 1:30 horas con los anticuerpos secundarios anti-conejo, anti-cabra o anti-ratón conjugados con peroxidasa diluidos 1:5000 o 1:10000 en TBS 1X-Tween-20 con 5% de leche descremada. Después las membranas se lavaron 3 veces con TBS 1X y se revelaron por quimioluminiscencia con el kit SuperSignal® WestPico o SuperSignal® WestFemto (Thermo Scientific) en placas radiográficas (FUJIFILM) o en el equipo ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad).

Extracción de RNA total

El RNA se extrajo a partir de cultivos celulares de 72 h y/o con una confluencia de 90-100 %, con el reactivo de Trizol (Gibco). Se lavo la monocapa dos veces con PBS 1X y se agrego 1 mL de trizol por aprox. 10 millones de células y se homogenizo hasta disminuir la viscosidad, después se agregaron 200 µL de

cloroformo, se centrifugo a 12000 r.p.m. por 15 min., se recupero la fase acuosa y se precipito con isopropanol centrifugando a 12000 r.p.m por 10 min. El RNA se lavo con etanol y se precipito nuevamente a 8000 r.p.m por 5 min., se elimino la fase acuosa, se seco el boton y el RNA se resuspendió con 50 μ L de agua DEPC (libre de RNAsa).El RNA se trato con DNAsa para eliminar cualquier posible contaminación con DNA genómico de la siguiente manera: Se adiciono 10% de buffer DNAsa 10X y 2 μ L de enzima DNAsa. Posteriormente se incubo a 37°C durante 45 minutos, se agrego un 10% de reactivo de inactivación, se incubo por 2 minutos a TA, se centrifugo 1 minuto a 14000 r.p.m., se tomo el sobrenadante y se paso a un tubo limpio para su almacenamiento a -70 °C.

Tabla No.1 Anticuerpos

Anticuerpo vs:	Origen	Dilución usada	Casa comercial
TIAR	Cabra	1:500	Santa Cruz
SF2/ASF	Ratón	1:100	Zymed
hnRNP E2	Ratón	1:500	Santa Cruz
U2AF65	Ratón	1:1000	Zymed
U170k	Cabra	1:200	Santa Cruz
DAZAP	Cabra	1:200	Santa Cruz
Ro52/SSA	Ratón	1:500	Santa Cruz
IKK α	Ratón	1:1000	Cell Signaling
IKK β	Conejo	1:500	Santa Cruz
IKK γ (NEMO)	Ratón	1:500	Santa Cruz
IkB α	Conejo	1:1000	Cell Signaling
P-IkB α	Ratón	1:1000	Cell Signaling
β TrCP	Conejo	1:200	Santa Cruz
NIK	Conejo	1:1000	Cell Signaling
p53	Ratón	1:1000	Zymed
Rb	Ratón	1:2000	Cell Signaling
GFP	Cabra	1:1000	Zymed
Actina	Ratón	1:1000	Dr. Manuel Hernández.- Biología Celular – CINVESTAV - IPN

RT-PCR

El cDNA se generó por transcripción reversa usando RNA total de las células transfectadas y sus controles. La reacción de retro-transcripción se llevó a cabo en una mezcla de 4 μL de oligo dT 10 μM y 6 μg de RNA, se incubó a 70 °C durante 10 minutos y posteriormente se adicionó una mezcla de 8 μL del amortiguador 5X (Tris-HCL 250 mM, pH 8.3, KCl 375 mM y MgCl_2 15 mM), 4 μL de Dithiothreitol 0.1 M, 4 μL de desoxiribonucleótidos (dNTP`s) 200 μM , 2 μL de transcriptasa reversa (200 U/ μL)(*SuperScript II*, Invitrogen) y agua libre de nucleasas para llevar a un volumen final de 40 μL . La mezcla se incubó a 22°C durante 10 minutos y a 42°C durante 2 horas para llevar a cabo la reacción de retro-transcripción y a 70°C por 5 min para detenerla.

PCR en tiempo real

Para cuantificar los mRNAs de los transcritos de TIAR, SF2/ASF, hnRNP E2, U2AF65, U170k y DAZAP1 se usó el sistema *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystem). Este ensayo se hizo en el equipo para PCR en tiempo real ABI-PRISM 7000 SDS (Applied Biosystem). La mezcla de reacción contenía: 5 μL Master Mix 2X, 0.15 μL de cada oligonucleótido (Tabla No. 2), y 3.7 μL de agua libre de nucleasas, se adicionó un microlitro de cDNA (1 μg). Las condiciones de la reacción fueron: 5 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 20 segundos a 92 °C y 50 °C por 15 segundos y 72 °C por 20 segundos, para amplificar el mRNA de TIAR, SF2/ASF, hnRNP E2 y DAZAP1. Para amplificar los transcritos de U2AF65 y U170k se utilizaron las mismas cantidades de reactivos y las condiciones de la reacción fueron: 5 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 20 segundos a 92 °C y 47.5 °C por 15 segundos y 72 °C por 20 segundos. Por último para el mRNA de actina se utilizaron las mismas cantidades de reactivos y las condiciones de reacción fueron las siguientes: 5 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 20 segundos a 92°C y 45 °C por 15 segundos y 72 °C por 30 segundos. El método de cuantificación fue por medio de curva estándar para cada uno de los transcritos, utilizando un re-amplificado de PCR para cada uno de los mismos.

Tabla No. 2 Oligonucleótidos

Factor	Sentido 5' → 3'	Antisentido 5' → 3'
TIAR	ATGAAAGTGCAGCCCATGCCATTGTT	TGGCTCCATTGGCCCCATTGACTAT
SF2/ASF	TCGATCTCGAAGCCGTAGTCGTAGC	GCGAGATCTGCTATGACGGGGAGAA
hnRNP E2	AGGACAGTATGCCATTCCACAGCCA	ATGCATCCAAACCTGCCCAATAGCC
U2AF65	GGGGCTTACCCAACCTGAACGA	ATGTCCACGTACTIONCACAGAAGGCGT
U170k	GAGTACGAACACGAGCGAGACATGC	GGATGTTACATCAGCCCCTCCTCT
DAZAP	ACCGTTCACCTCCTACATCGTGTCC	GAGGCCCGTAGCCAAAACCTGAACTG
Ro52/SSA	AGAATCCTGGGGGAGAAAGAGGCCAA	CCAGGTCCCTCAGGTTCCAGGACTC
Actina	CTCCTTAATGTCACGCACGATTC	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA

Preparación de las curvas estándar

Para generar las curvas estándar se realizaron diluciones seriadas 1:10 de re-amplificados de PCR de cada uno de los transcritos, dichos re-amplificados fueron cuantificados y mediante una relación con el número de Avogadro, se determino el número de copias correspondiente para cada transcrito.

Por ejemplo:

El amplificado de TIAR pesa 145 pb, y si una base pesa 330 g/mol, entonces $(330 \times 145) \times 2$ (por las 2 hebras de DNA) = 95700 g en un mol de amplificado de TIAR. Entonces 1 mol de amplificado de TIAR = 95700 g, y la cuantificación del amplificado es 0.453 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, así en un microlitro de amplificado de TIAR hay 2.85101254^{12} copias del amplificado de TIAR. De esta forma para el factor TIAR se realizaron diluciones 1:10 de 2.85^{12} a 2.85^8 copias/ μL , para DAZAP diluciones 1:10 de 4.21^7 a 4.21^3 copias/ μL , hnRNP E2 diluciones 1:10 de 3.1^8 a 3.1^4 copias/ μL , SF2/ASF diluciones 1:10 de 3.98^9 a 3.98^5 copias/ μL , U170k diluciones 1:10 de 3.21^7 a 3.21^3 copias/ μL , U2AF65 diluciones 1:10 de 3.52^7 a 3.52^3 copias/ μL y Actina diluciones 1:10 de 1.22^9 a 1.22^5 copias/ μL . Los valores de ciclo umbral (CT) en cada dilución fueron medidos tres veces y entonces fueron graficados contra la muestra correspondiente en número de copias. Así cada muestra problema fue generada por regresión lineal utilizando la curva estándar correspondiente para cada transcrito.

RESULTADOS

Los factores de *splicing* se expresan diferencialmente tanto a nivel de mensajero como de proteína en las diferentes líneas de CaCU.

Se analizó la expresión a nivel de proteína de los factores de *splicing* TIAR, SF2/ASF, hnRNP E2, U170k y DAZAP por medio de Western blot (Figura 5) y a la par, comparamos su expresión a nivel de mensajero (Figura 7 y Tabla 3) observamos que cada uno tiene un comportamiento diferente en las distintas líneas celulares.

Cuando analizamos el factor TIA/TIAR, se observaron dos bandas de un peso aproximado de 45 y 40 kDa, las diferencias son sutiles, pero a excepción de la banda inferior en CaSki y SiHa la expresión de TIA/TIAR es mayor en estas en comparación con las otras 2 líneas celulares. Debido a que el anticuerpo a pesar de ser específico contra TIAR, detecta el mismo patrón de expresión en estas líneas celulares que al utilizar un anticuerpo que reconoce ambas proteínas, TIA1 y TIAR (Díaz-Hernández, tesis de maestría); dado que TIA1 y TIAR comparten 80 % de sus aminoácidos, no fue posible discernir entre ambas proteínas. Además, tanto TIA1 como TIAR producen cada una dos isoformas, traducidas del mismo pre-mensajero y generadas por *splicing* alternativo; se complicó aun más discernir entre ambas isoformas, por lo que nos referiremos de ahora en adelante como TIA/TIAR. En la figura 6 podemos observar mejor las diferencias a nivel proteico para este factor entre las diferentes líneas celulares, sin embargo estas diferencias no fueron significativas estadísticamente. En cambio cuando se determina la expresión a nivel de mensajero solo de TIAR por medio de PCR en tiempo real (qPCR) fue mayor en las líneas celulares VPH+: CaSki (120.1 millones de copias de mensajero), HeLa (83.8 millones), SiHa (93.1 millones) si se comparan contra la línea celular VPH-: C33A (19.86 millones), sin embargo, estas cantidades de mensajero no correlacionan con los niveles de expresión a nivel de proteína, a pesar de ser significativas cuando las comparamos contra la expresión del mensajero en la línea celular C33A (Figura 7).

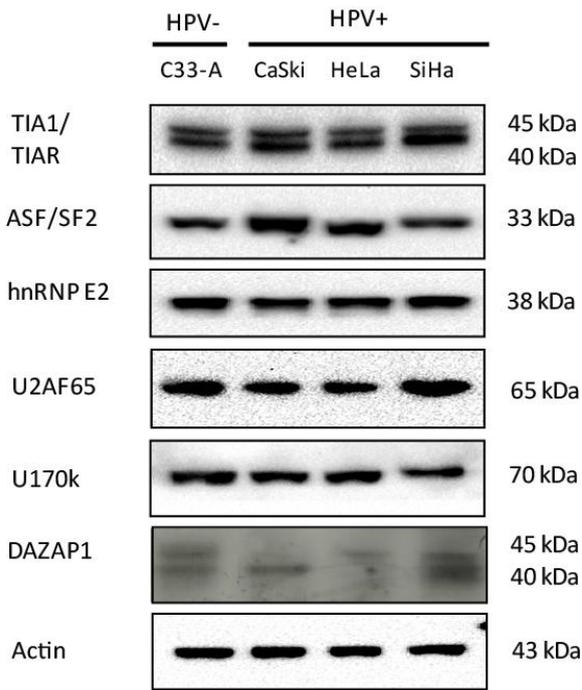


Figura 5. Expresión proteica de los factores de *splicing* TIA/TIAR, ASF/SF2, hnRNP E2, U2AF65, U170k y DAZAP en las diferentes líneas celulares C33A (VPH-), CaSki (VPH-16 +), HeLa (VPH-18) y SiHa (VPH-16 +). Analizada por western blot. Se utilizó β -Actina como control de carga.

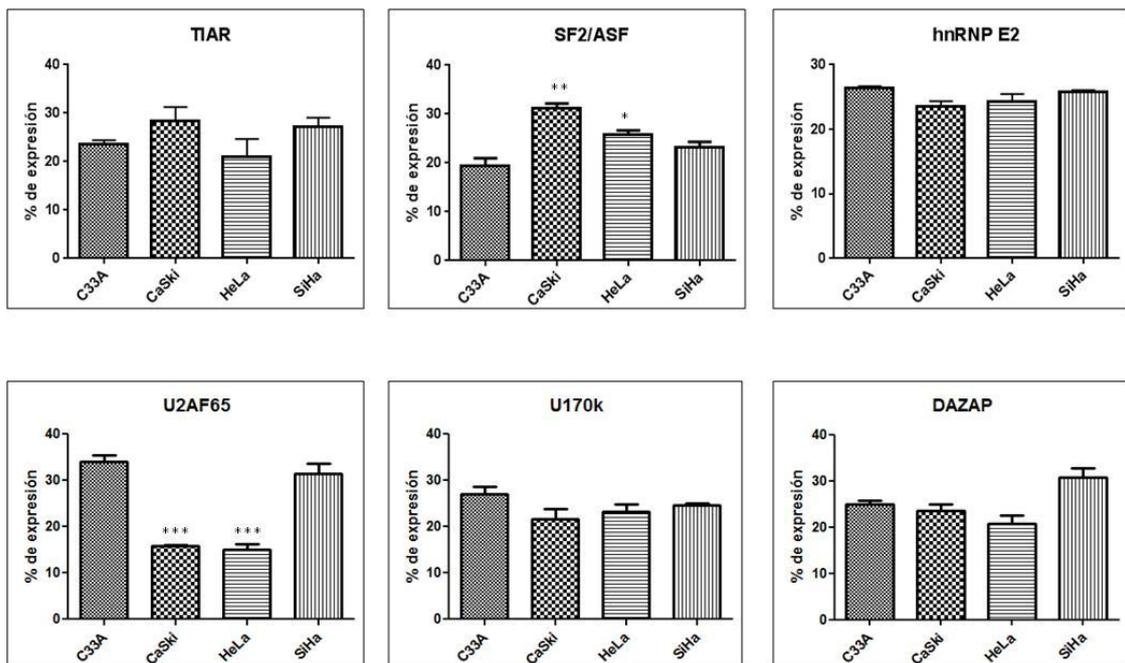


Figura 6. Análisis densitométrico de la expresión proteica de los distintos factores de *splicing* en las líneas celulares. Los valores y desviación estándar fueron calculados de al menos tres experimentos de western blot independientes. Los valores de P fueron calculados usando el análisis estadístico ANOVA y son indicados arriba de las barras: (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$.

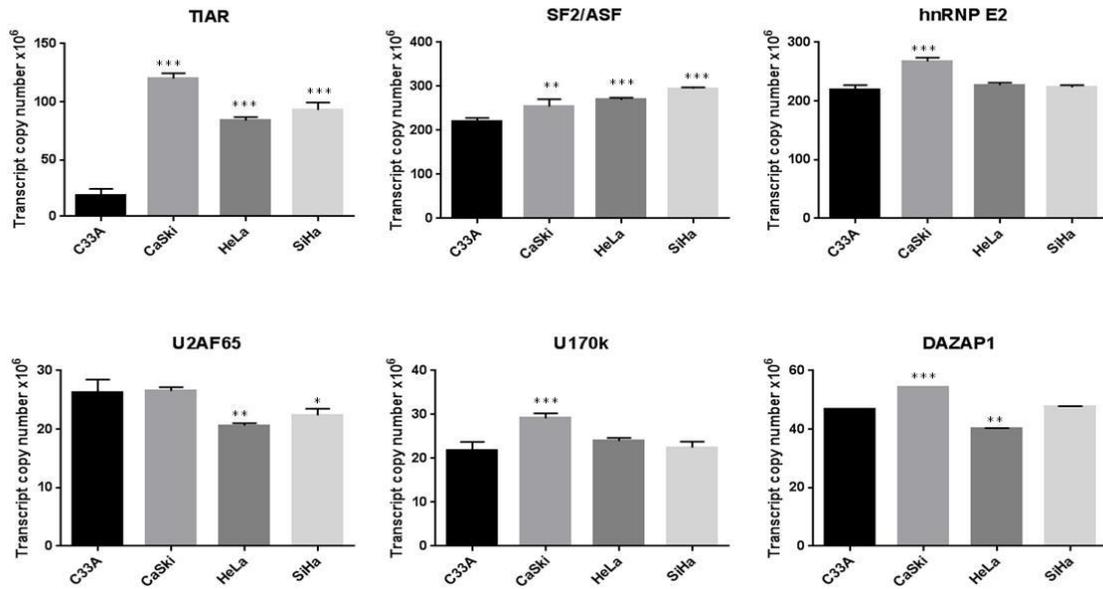


Figura 7. Expresión de mRNA de los distintos factores de *splicing* en las líneas celulares obtenida por qPCR. Los resultados fueron normalizados con la expresión de actina. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de P fueron calculados usando el análisis estadístico ANOVA y son indicados arriba de las barras: (*) P<0.05; (**) P<0.01; (***) P<0.001.

	Transcript copy number x10 ⁶			
	C33A	CaSki	HeLa	SiHa
TIAR	19.86 \pm 5.31	120.1 \pm 4.45	83.80 \pm 3.18	93.01 \pm 6.39
SF2/ASF	220.9 \pm 7.28	254.0 \pm 16.77	269.0 \pm 5.19	294.9 \pm 2.61
hnRNP E2	219.7 \pm 7.22	267.6 \pm 6.31	227.0 \pm 4.18	223.0 \pm 4.16
U2AF65	26.32 \pm 2.13	26.51 \pm 0.66	20.58 \pm 0.43	22.36 \pm 1.12
U170k	21.82 \pm 1.97	29.12 \pm 1.12	23.95 \pm 0.70	22.46 \pm 1.35
DAZAP	46.81 \pm 0.02	54.38 \pm 0.01	40.32 \pm 0.04	47.78 \pm 0.10
Actin	994.8 \pm 41.4	994.8 \pm 38.5	994.8 \pm 4.07	994.8 \pm 9.56

Tabla 3. Valores de la expresión a nivel de mensajero de los factores de *splicing* TIAR, SF2/ASF, hnRNP E2, U2AF65, U170k y DAZAP en las líneas celulares C33A, CaSki, HeLa y SiHa. Las cantidades de mensajero se expresan en millones de copias por 250 ng de mRNA. Se utilizo como control de carga actina y los datos se normalizaron contra su expresión.

Al analizar la expresión proteica del factor SF2/ASF observamos que es mayor expresión en las líneas CaSki y HeLa con respecto a C33A y SiHa, además son estadísticamente significativas estas diferencias, no siendo así para C33A y SiHa las cuales tienen una expresión similar entre ellas. Sin embargo, al analizar los niveles de mensajero de SF2/ASF, notamos que las diferencias estaban bien definidas, mayor cantidad en SiHa (294.9 millones) seguida de HeLa (269 millones), CaSki (254 millones) y por ultimo C33A (219.7 millones), siendo significativas estadísticamente estas diferencias al compararlas con C33A. Por lo que estas cantidades de mensajero correlacionan con los niveles de expresión de proteína solo en CaSki y HeLa.

La expresión a nivel de proteína de hnRNP E2, no mostro diferencias significativas estadísticamente entre las diferentes líneas celulares, pero CaSki posee mayores cantidades del transcrito de hnRNP E2 (277.6 millones) con respecto a C33A, HeLa y SiHa, y esta diferencia es significativa estadísticamente, en cambio las ultimas presentaron cantidades muy similares de mensajero (219.7, 227 y 223 millones, respectivamente); nuevamente no existe correlación entre los niveles de expresión de proteína y mensajero de hnRNP E2.

Para el caso del factor U2AF65 en su análisis a nivel de expresión de proteína observamos niveles similares en las líneas celulares C33A y SiHa, a diferencia de CaSki y HeLa en donde los niveles de expresión son menores con respecto a C33A y SiHa, y además las diferencias son estadísticamente significativas. A diferencia de su expresión a nivel de mensajero, donde las líneas celulares C33A y CaSki tienen las mayores cantidades y salvo HeLa y SiHa tienen disminución en su expresión de transcrito la cual es significativa estadísticamente, nuevamente no hay relación directa entre los niveles de expresión de proteína y del mensajero.

Al analizar los niveles de expresión a nivel de proteína del factor U170k no observamos diferencias significativas entre las diferentes líneas celulares, algo similar se observó respecto a las cantidades de mensajero. A excepción de CaSki en donde se observa un aumento del transcrito de U170k, esta diferencia es estadísticamente significativa, se observa una relación entre los

niveles de mensajero y proteína para este factor entre las diferentes líneas celulares, y la relación es que no hay cambios significativos en ambos niveles de expresión.

Al estudiar la expresión a nivel de proteína del factor DAZAP1 observamos dos bandas en el western blot: una de aproximadamente 45 kDa y otra de aprox. 40 kDa, ambas corresponden a isoformas de DAZAP1, traducidas a partir mensajeros generados por *splicing* alternativo, el anticuerpo usado puede detectar las dos formas. En el caso de las líneas celulares C33A y SiHa podemos observar ambas formas y parece haber mayor expresión en SiHa, en cambio en CaSki solo observamos la forma de 40 kDa y en HeLa la forma de 45 kDa, sin embargo estas diferencias no son significativas estadísticamente. En cambio cuando analizamos los niveles de mensajero de DAZAP1 (El par de oligonucleótidos fue diseñado de forma tal que amplifica ambas formas del mensajero) notamos que tanto C33A y SiHa tienen niveles similares de mensajero con 46.8 y 47.78 millones, a diferencia de CaSki quien tiene mayor cantidad con respecto a las demás líneas celulares con 54.38 millones y HeLa que tiene la menor cantidad de mensajero con respecto a las otras con 40.32 millones, estas últimas dos líneas presentan diferencias significativas estadísticamente en la expresión del transcrito de DAZAP1 versus la expresión del mismo en C33A. Por lo que puede haber una correlación entre los niveles de mensajero y proteína en todas las líneas celulares: C33A y SiHa tienen niveles similares de transcrito, para explicar las diferencias entre CaSki y HeLa, se requieren hacer ensayos que nos permitan diferenciar a nivel de mensajero entre las formas de *splicing* DAZAP1. Por último se muestra actina como control de carga en los experimentos de western blot, y las cantidades de mensajero de actina no muestran diferencias significativas.

Los oncogenes E6/E7 de VPH-16 alteran la expresión de los factores de *splicing*.

Debido a que las diferencias en expresión observadas en los experimentos anteriores, pudieran deberse a las diferencias inherentes a cada una de las líneas celulares y no a la presencia de VPH, se decidió transfectar a la línea celular C33A con un bicistrón de E6/E7 (Díaz Hernández 2011, Tesis de

Maestría) para determinar si las variaciones de expresión de los factores de *splicing* en ambos niveles pudieran ser debidas a la expresión de los oncogenes de VPH-16. En este caso los resultados siguientes son resultado de E6/E7 de VPH-16 proveniente de CaSki, nombrado E6E7C.

Una vez realizados los ensayos para determinar los niveles de proteína y de RNA de cada uno de los genes analizados, decidimos comparar estos parámetros para determinar si existía una correlación entre ellos. La expresión de proteínas obtenida por medio de western blot, de los distintos factores de *splicing* en la línea celular VPH (-) C33A, transfectada con el bicistrón E6E7C y con el vector parental (Mock) se muestra en la figura 8, y la expresión a nivel de mensajero de los distintos factores de *splicing* obtenida por medio de PCR en tiempo real de la línea celular control y las transfectantes se muestra en la figura 10 y tabla 4.

Al analizar la expresión de los diferentes factores observamos que el factor TIA/TIAR mostro un ligero incremento de expresión a nivel de proteína en la transfectada con E6E7C, sin embargo esta diferencia no es significativa estadísticamente (Figura 9); al igual que para los demás factores de *splicing*. Sin embargo en los niveles de mensajero de TIAR y SF2/ASF hay un incremento en las cantidades de transcrito cuando está presente el bicistrón E6E7C y estas diferencias son significativas estadísticamente (Figura 10). En cambio los efectos de los oncogenes en los demás factores de *splicing* no son tan evidentes a nivel del mensajero, al igual que a nivel de proteína para los factores hnRNP E2, U2AF65, U170k y DAZAP1 en las células transfectadas. Es decir la presencia del bicistrón E6E7C no afecta los niveles de expresión de proteína y de mensajero de estos últimos factores.

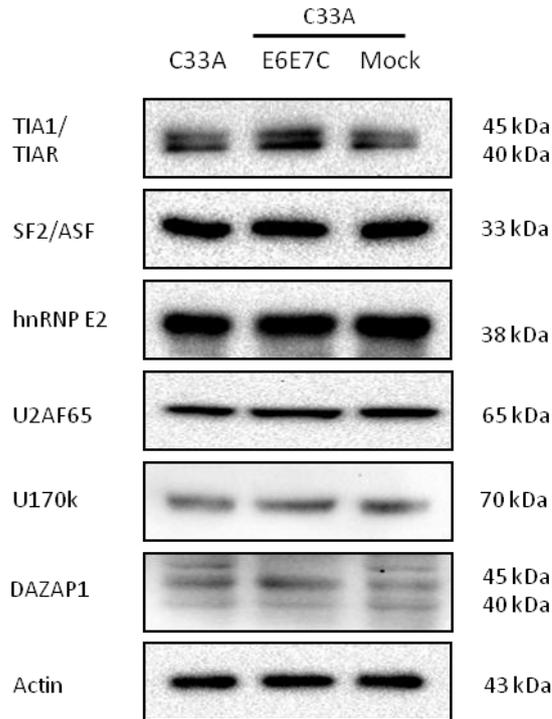


Figura 8. Expresión proteica de los factores de *splicing* TIA/TIAR, ASF/SF2, hnRNP E2, U2AF65, U170k y DAZAP entre la línea celular C33A (VPH-), C33A transfectada con E6/E7C y C33A transfectada con el vector vacío "Mock". Se utilizó β -Actina como control de carga.

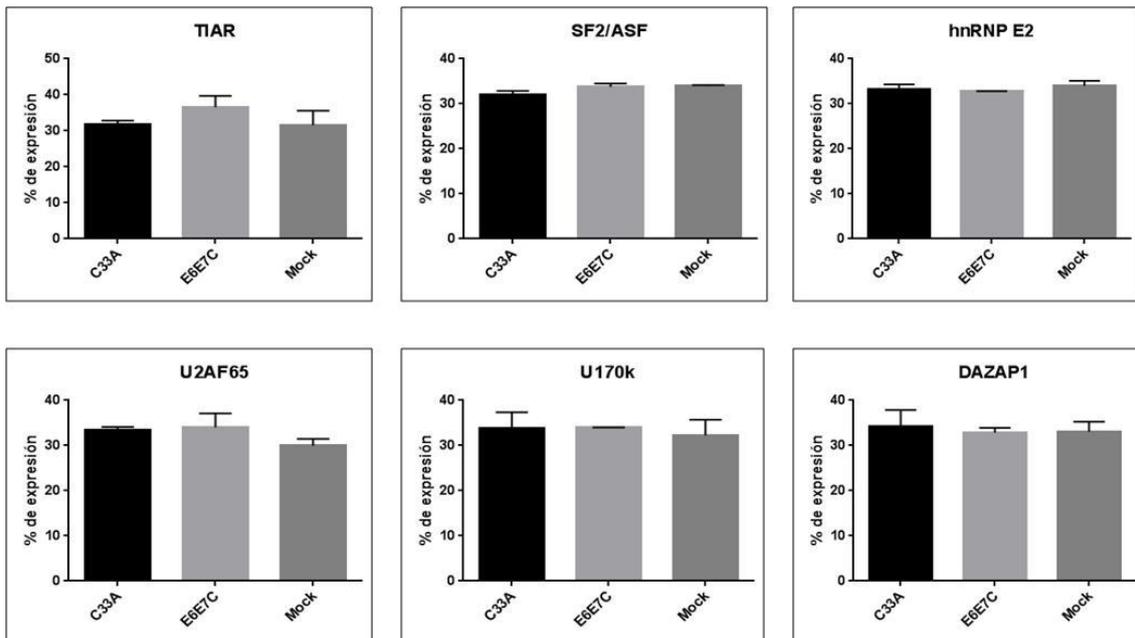


Figura 9. Análisis densitométrico de la expresión proteica de los distintos factores de *splicing* en la línea celular C33A y en ésta transfectada con E6E7C y Mock. Los valores y desviación estándar fueron calculados de al menos tres experimentos de western blot independientes. Los valores de P fueron calculados usando el análisis estadístico ANOVA y son indicados arriba de las barras: (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$.

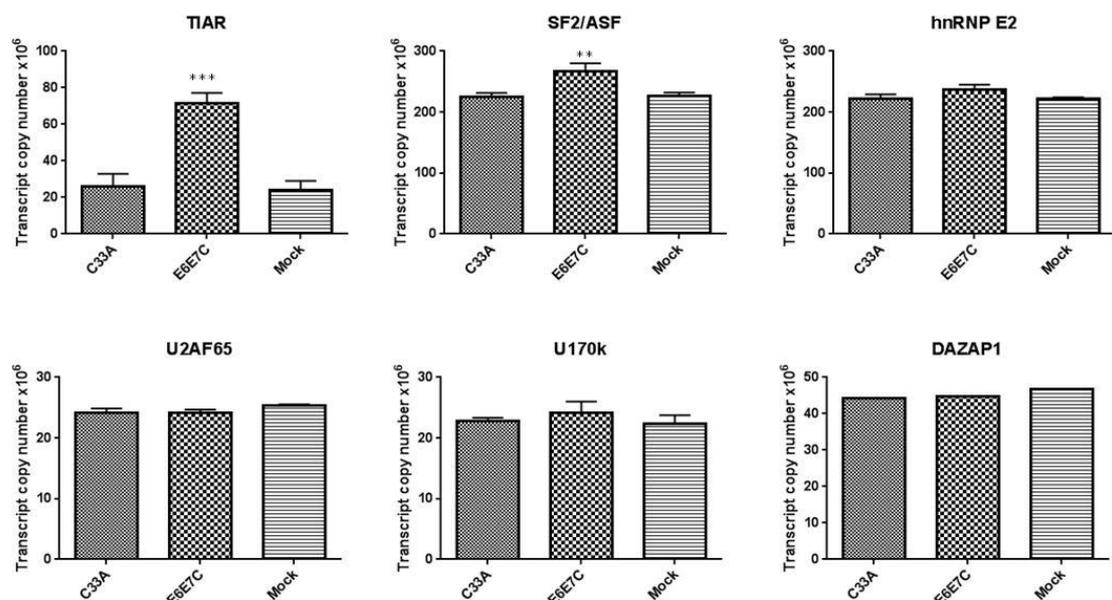


Figura 10. Expresión de mRNA de los distintos factores de *splicing* en las línea celular C33A y ésta transfectada con E6E7C y Mock obtenida por qPCR. Los resultados fueron normalizados con la expresión de actina. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de P fueron calculados usando el análisis estadístico ANOVA y son indicados arriba de las barras: (**) P<0.01; (***) P<0.001.

	Transcript copy number x10 ⁶		
	C33A	E6E7C	Mock
TIAR	26.16 \pm 6.83	71.64 \pm 5.51	23.96 \pm 5.08
SF2/ASF	225.3 \pm 6.2	266.5 \pm 13.71	226.5 \pm 5.75
hnRNP E2	222.0 \pm 7.34	237.6 \pm 7.34	221.6 \pm 2.8
U2AF65	24.09 \pm 0.79	24.12 \pm 0.56	25.35 \pm 0.18
U170k	22.81 \pm 0.53	24.16 \pm 1.85	22.29 \pm 1.48
DAZAP	44.17 \pm 0.05	44.73 \pm 0.06	46.77 \pm 0.06
Actin	994.8 \pm 10.55	994.8 \pm 11.09	994.8 \pm 14.3

Tabla 4. Valores de la expresión a nivel de mensajero de los factores de *splicing* TIAR, SF2/ASF, hnRNP E2, U2AF65, U170k y DAZAP obtenida por medio de qPCR en la línea celular C33A, C33A transfectada con E6E7C y por ultimo transfectada con el vector parental "Mock". Las cantidades de mensajero están expresadas en millones de números de copias por 250 ng de mRNA. Se utilizo como control de carga actina y los datos están normalizados contra la expresión de esta.

Las oncoproteínas E6 y E7 desregulan principalmente a nivel de mRNA a algunos factores de *splicing*.

Debido a que el bicistrón E6/E7C produce a la oncoproteína E6, E7 y además da lugar a las formas de *splicing*: E6**I*, E6**II* y E6^ΔE7, es difícil saber si los efectos observados anteriormente solo para TIAR son atribuibles a alguna de las 5 proteínas producidas por el bicistrón, por lo que es importante determinar cuál es el efecto individual de cada una de las oncoproteínas en la alteración de la expresión de los factores de *splicing*, por lo que se transfectó nuevamente a la línea celular C33A (VPH negativa) con la oncoproteína E6 y con la oncoproteína E7 de manera independiente, para determinar cuál es el papel independiente de cada oncoproteína en la alteración de la expresión de los factores de *splicing*. En la figura 11 observamos la expresión de los distintos factores de *splicing* a nivel de proteína obtenida por medio de western blot y en la figura 12 el análisis densitométrico de los mismos con al menos tres experimentos independientes, en la línea celular C33A transfectada con E6, a la cual se hizo una mutación para suprimir el sitio donador de *splicing*, a la cual llamamos E6SDM y así evitar que produjera las isoformas cortas, E6**I* y E6**II*; y además de C33A transfectada con E7 (Del Moral-Hernández, tesis Doctoral). Y en figura 13 y tabla 5 se muestran las cantidades de mensajeros de los diferentes factores de *splicing* en estas transfectantes obtenidas mediante PCR en tiempo real.

Analizando la expresión a nivel de proteína observamos que los factores TIA/TIAR y SF2/ASF presentaron un incremento a nivel de proteína cuando se transfectaron con cualquiera de los 2 oncogenes: E6mutante o E7 y estas diferencias son significativas estadísticamente, mientras que para hnRNP E2 y U2AF65 se observa un decremento en el nivel de proteína, el cual también es significativo solo en la transfección con E6SDM. En cambio para el factor DAZAP1 no encontramos diferencias significativas a nivel de proteína. Los niveles no cambian cuando se transfecta a C33A con el vector parental (Mock), ver figura 8 y 9.

En contraste cuando se midieron los niveles de mensajero los factores TIA/TIAR, SF2/ASF, hnRNP E2, U2AF65 y DAZAP1 en presencia de las

oncoproteínas E6 y E7, todos estos mostraron un incremento de expresión a nivel del mRNA mensajero y estas diferencias son significativas estadísticamente. Solo el factor U170k no mostro un cambio significativo a nivel de mRNA (Figura 13 y tabla 5). A excepción de los factores TIAR y SF2/ASF no encontramos en los factores restantes relación entre los niveles de expresión de proteína y los niveles de transcrito.

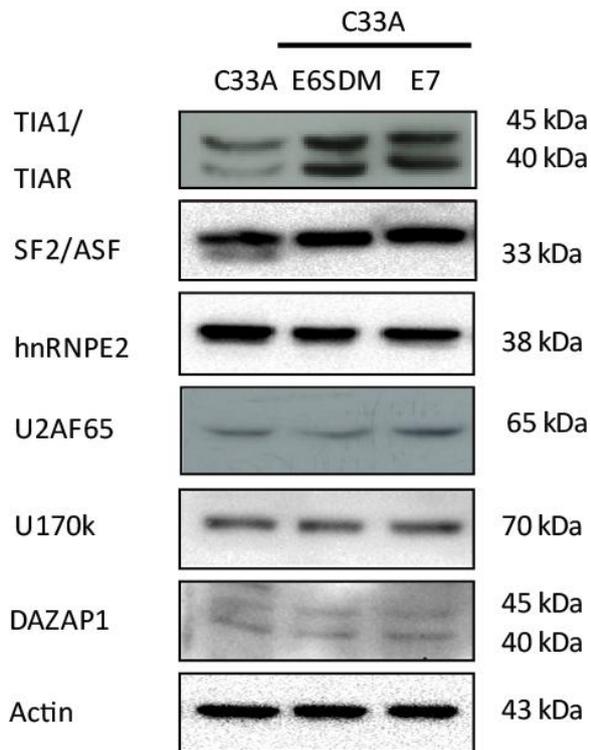


Figura 11. Expresión proteica de los factores de *splicing* TIA/TIAR, ASF/SF2, hnRNP E2, U2AF65, U170k y DAZAP entre la línea celular C33A (VPH-), C33A transfectada con E6SDM y C33A transfectada con E7, Analizados por western blot. Se utilizo β -Actina como control de carga.

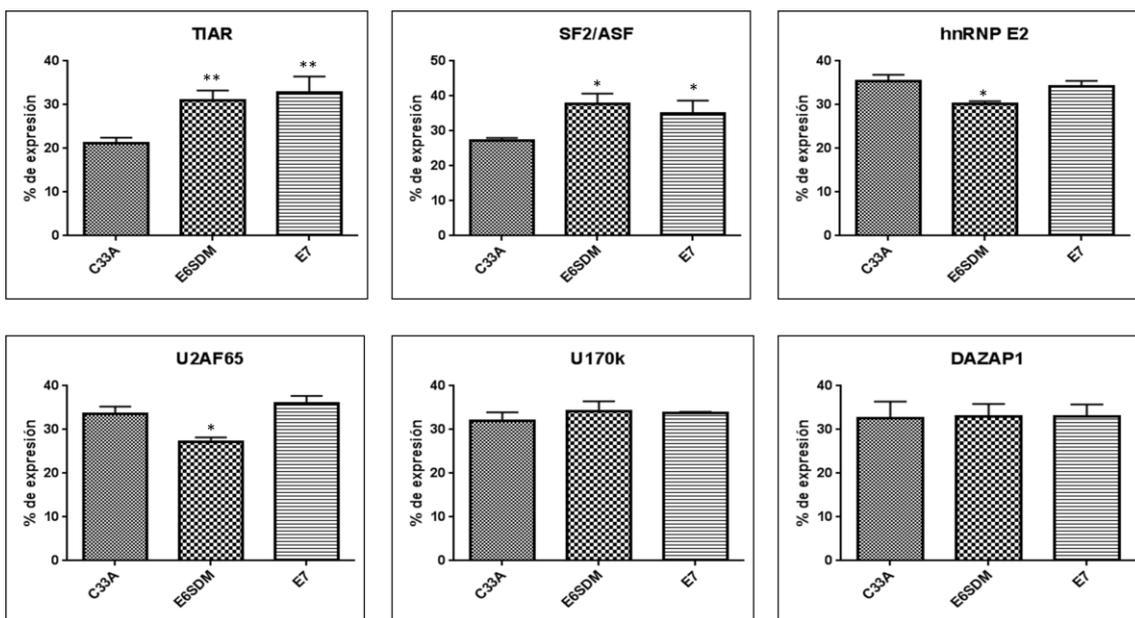


Figura 12. Análisis densitométrico de la expresión proteica de los distintos factores de splicing en la línea celular C33A y en ésta transfectada con E6SDM y E7. Los valores y desviación estándar fueron calculados de al menos tres experimentos de western blot independientes. Los valores de P fueron calculados usando el análisis estadístico ANOVA y son indicados arriba de las barras: (*) P<0.05; (**) P<0.01; (***) P<0.001.

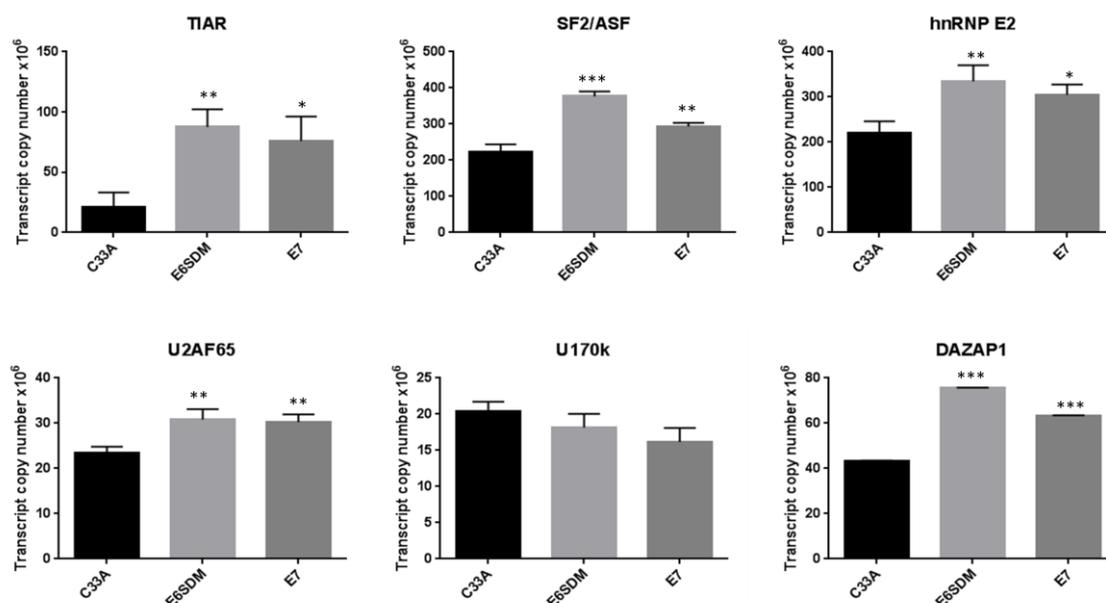


Figura 13. Expresión de mRNA de los distintos factores de *splicing* en las línea celular C33A y ésta transfectada con E6SDM y E7 obtenida por qPCR. Los resultados fueron normalizados con la expresión de actina. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de P fueron calculados usando el análisis estadístico ANOVA y son indicados arriba de las barras: (*) P<0.05; (**) P<0.01; (***) P<0.001.

	Transcript copy number x10 ⁶		
	C33A	E6SDM	E7
TIAR	20.64 \pm 12.6	87.64 \pm 14.67	75.97 \pm 20.18
SF2/ASF	221.3 \pm 22.64	376.5 \pm 13.76	293.3 \pm 10.09
hnRNP E2	220.7 \pm 25.53	334.4 \pm 35.61	304.9 \pm 22.61
U2AF65	23.33 \pm 1.5	30.82 \pm 2.31	30.28 \pm 1.71
U170k	20.33 \pm 1.41	18.17 \pm 1.88	16.18 \pm 1.93
DAZAP1	43.33 \pm 0.207	75.68 \pm 0.11	63.32 \pm 0.24
Actin	994.8 \pm 26.5	994.8 \pm 87.3	994.8 \pm 64.4

Tabla 5. Valores de la expresión a nivel de mensajero de los factores de *splicing* TIAR, SF2/ASF, hnRNP E2, U2AF65, U170k y DAZAP obtenida por medio de qPCR en la línea celular C33A, C33A transfectada con E6SDM y por ultimo C33A transfectada con E7. Las cantidades de mensajero están expresadas en millones de números de copias por 250 ng de mRNA. Se utilizo como control de carga actina y los datos están normalizados contra la expresión de esta.

Las isoformas de E6 (E6*I, E6*II, E6^E7) de VPH-16 también alteran la expresión de los factores de *splicing*.

Debido a que la oncoproteínas E6 genera tres isoformas cortas llamadas E6*I, E6*II y E6^E7, y dado que los efectos que observamos en la transfección con el bicistrón E6/E7C (que produce dichas isoformas) son diferentes a aquellos efectos vistos cuando se transfecta solo E6 o E7, nos pareció importante saber cuál es el efecto que ejercen las isoformas de E6 sobre el perfil de expresión de los factores de *splicing*, por lo que se decidió transfectar a la línea celular C33A (negativa a VPH) con cada una de las tres formas cortas de E6. De esta forma en la figura 14 se observa la expresión a nivel de proteína obtenida mediante western blot de los distintos factores de *splicing* en la línea C33A sin transfectar, y sus transfectantes. En la figura 16 y tabla 6 se muestran los niveles de expresión a nivel de mensajero de los diferentes factores de *splicing* obtenida por medio de PCR en tiempo real de estas diferentes transfectantes.

Al analizar la expresión del factor TIA1/TIAR a nivel de proteína no encontramos diferencias significativas estadísticamente, al igual que para hnRNP E2 y U170k entre las diferentes transfectantes y la línea celular sin transfectar (Figura 15), en cambio para SF2/ASF a nivel de proteína se observa que cuando está presente E6*I y E6*II existe un incremento en sus niveles de expresión y estas diferencias son significativas estadísticamente, tal efecto no ocurre cuando está presente E6^E7 dado que sus niveles son muy semejantes a la línea C33A sin transfectar, caso contrario para el factor DAZAP1 dado que cuando estas presentes E6*I o E6*II se observa una disminución de la expresión de este factor y este cambio es significativo, destacando también la desaparición de la banda de aprox. 40 kDa en la transfección con la isoforma E6*II., por ultimo solo cuando está presente E6*I se observa un aumento

significativo de la expresión del factor U2AF65, no siendo así con las demás isoformas de E6.

En cambio cuando analizamos los niveles de expresión de mensajero observamos que cuando se transfecta la isoforma E6*I, E6*II y E6^E7 hay un incremento a nivel de mensajero en los factores SF2/ASF, hnRNP E2, U2AF65 y DAZAP1 comparados con C33A, y estas diferencias son significativas estadísticamente (Figura 16). Para el caso del factor TIAR solo cuando estas presentes las isoformas E6*I y E6*II se observa un aumento significativo de su transcrito, y para el factor U170k solo con la isoforma E6*I se observa un aumento significativo en los niveles de su transcrito. De tal forma que no encontramos relación entre los niveles de expresión de proteína y de transcrito para los factores TIAR, hnRNP E2 y U170k, con la excepción de los factores SF2/ASF y DAZAP1 que solo en E6*I y E6*II hay una relación entre los niveles de mensajero y los niveles de expresión de proteína. Y en el caso de U2AF65 solo con la isoforma E6*I encontramos este tipo de relación.

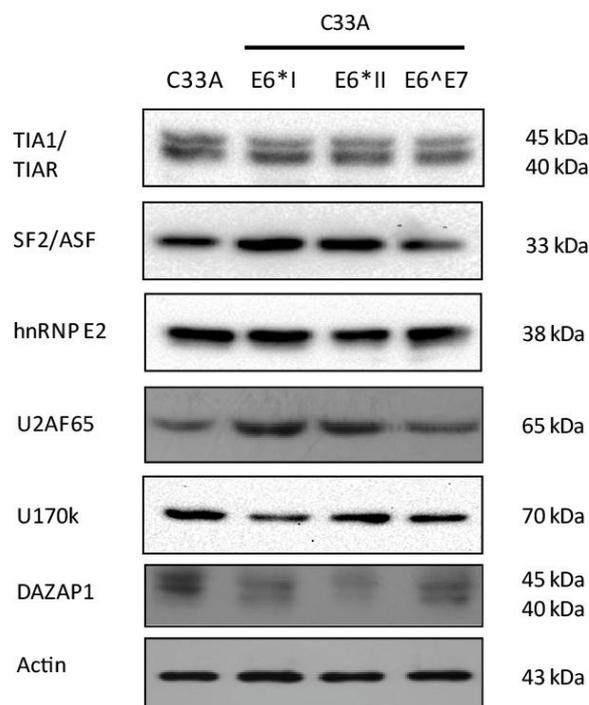


Figura 14. Expresión proteica de los factores de *splicing* TIA/TIAR, ASF/SF2, hnRNP E2, U2AF65, U170k y DAZAP entre la línea celular C33A (VPH-), C33A transfectada con E6*I, C33A transfectada con E6*II y C33A transfectada con E6^E7. Se utilizo β -Actina como control de carga.

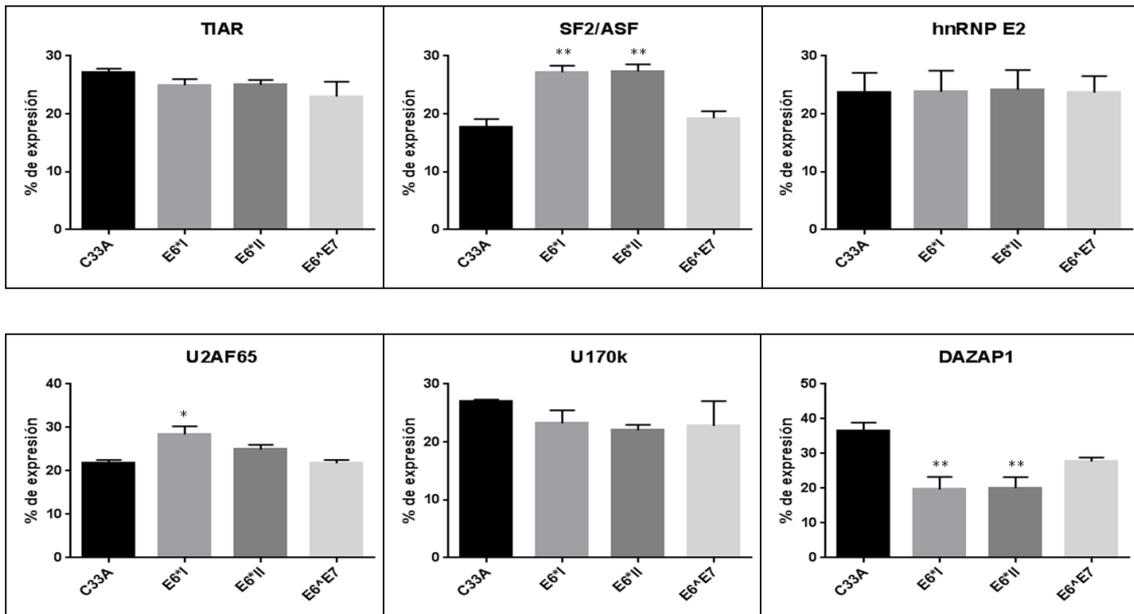


Figura 15. Análisis densitométrico de la expresión proteica de los distintos factores de splicing en la línea celular C33A y en ésta transfectada con E6SDM y E7. Los valores y desviación estándar fueron calculados de al menos tres experimentos de western blot independientes. Los valores de P fueron calculados usando el análisis estadístico ANOVA y son indicados arriba de las barras: (*) P<0.05; (**) P<0.01; (***) P<0.001.

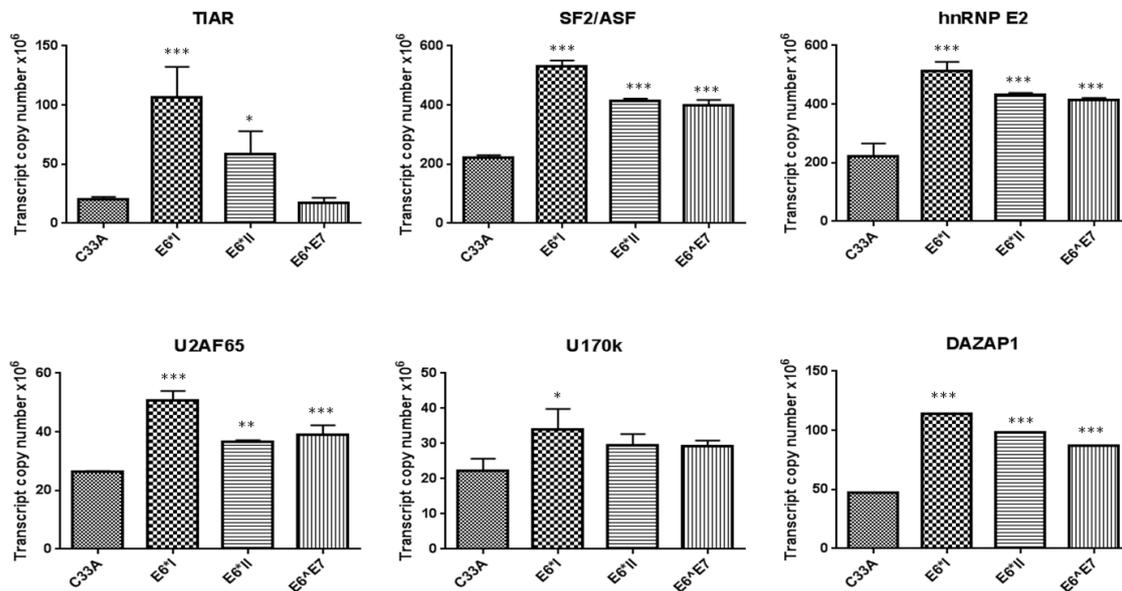


Figura 16. Expresión de mRNA de los distintos factores de *splicing* en las línea celular C33A y ésta transfectada con E6*1, E6*II y E6^E7 obtenida por qPCR. Los resultados fueron normalizados con la expresión de actina. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de P fueron calculados usando el análisis estadístico ANOVA y son indicados arriba de las barras: (*) P<0.05; (**) P<0.01; (***) P<0.001.

	Transcript copy number x10 ⁶			
	C33A	E6*1	E6*II	E6^E7
TIAR	20.32 ± 2.14	106.7 ± 25.5	58.69 ± 19.16	17.61 ± 4.06
SF2/ASF	221.7 ± 9.16	531.8 ± 18.86	412.6 ± 9.13	398.6 ± 18.71
hnRNP E2	220.5 ± 45.3	511.9 ± 31.7	430.6 ± 7.72	414.8 ± 6.46
U2AF65	26.34 ± 0.28	50.56 ± 3.34	36.73 ± 0.44	39.02 ± 3.28
U170k	22.35 ± 3.38	34.08 ± 5.79	29.43 ± 3.26	29.32 ± 1.49
DAZAP	47.43 ± 0.108	113.8 ± 0.09	98.5 ± 0.05	86.74 ± 0.605
Actin	994.8 ± 14.3	994.8 ± 16.8	994.8 ± 28.5	994.8 ± 26.7

Tabla 6. Valores de la expresión a nivel de mensajero de los factores de *splicing* TIAR, SF2/ASF, hnRNP E2, U2AF65, U170k y DAZAP obtenida por medio de qPCR en la línea celular C33A, C33A transfectada con E6*1, C33A transfectada con E6*II y por ultimo C33A transfectada con E6^E7. Las cantidades de mensajero están expresadas en millones de números de copias por 250 ng de mRNA. Se utilizo como control de carga actina y los datos están normalizados contra la expresión de esta.

Los distintos factores de *splicing* son regulados a través de las vías de NF-κB.

Una vez que determinamos que la expresión proteica o de mRNA de algunos de los factores de *splicing* están siendo alterados por E6 y/o E7, nos preguntamos si este es un efecto indirecto o directo, debido a que se sabe que tanto E6 como E7 tienen la habilidad de interactuar con distintos factores de transcripción, una posibilidad es que fuera un efecto indirecto a través de un factor de transcripción conocido, por lo que realizamos un análisis *in silico* a los promotores de los factores de *splicing*, para determinar si estos presentaban algún sitio probable de interacción con p53, E2F y NF-κB (Tabla 7), con estos ensayos determinamos que los factores TIAR, SF2/ASF y hnRNP E2 tienen probables sitios de unión para p53, E2F y NFκB1 (p50), mientras que U2AF65, U170k y DAZAP1 solo tienen probables sitios de unión para p53 y E2F. Dado que los factores de transcripción p53 y de pRB, el inhibidor de E2F, están mutados en las células C33A y son los principales blancos de E6 y E7 respectivamente; Consideramos que no podrían ser los blancos afectados por los oncogenes, por lo que nos preguntamos, si las vías de NF-κB pudieran

influir en tales cambios dado que la vía esta constitutivamente activa en cáncer y tal vez pueda ser un efecto de los oncogenes.

Tabla 7. Resultados del análisis *in silico* donde se muestran los posibles factores de transcripción que pueden unirse a los promotores de los distintos factores de *splicing*.

FACTOR	Probable sitio de unión para:
TIAR	E2F, p53, <i>NFκB1</i> (p50), cRel
SF2/ASF	<i>NFκB1</i> (p50), E2F
hnRNP E2	p53, E2F, <i>NFκB1</i> (p50)
U2AF65	p53, E2F
U170k	p53, E2F
DAZAP	p53, E2F

Para investigar si la vía clásica de NF-κB pudieran influir en la expresión de los factores de *splicing* decidimos utilizar el compuesto BAY-11-7082, el cual inhibe la fosforilación de IκBα. No existe un inhibidor específico para la vía no clásica, por lo que no evaluamos directamente esta vía. Al parecer BAY-11-7082 en concentraciones mayores a 30 μM inhibe la vía no clásica de NF-κB (Rauert-Wunderlich *et al*, 2013), por lo que decidimos utilizar una concentración baja de este compuesto y observar su efecto sobre la expresión de los factores de *splicing*, en las líneas celulares CaSki y SiHa. En la figura 17, observamos la expresión a nivel de proteína de los distintos factores de *splicing* obtenida mediante western blot en CaSki y SiHa sin tratamiento o en presencia de una concentración final de 10 μM de BAY-11-7082 (BAY) por una hora.

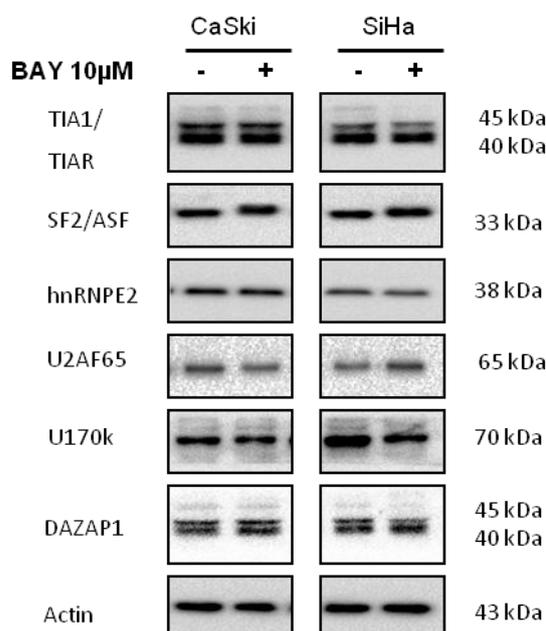


Figura 17. Expresión proteica de los factores de *splicing* TIA/TIAR, ASF/SF2, hnRNP E2, U2AF65, U170k y DAZAP entre la línea celular CaSki y SiHa tratada (+) o no tratada (-) con 10 μM de BAY-11-7082. Se utilizó β-Actina como control de carga.

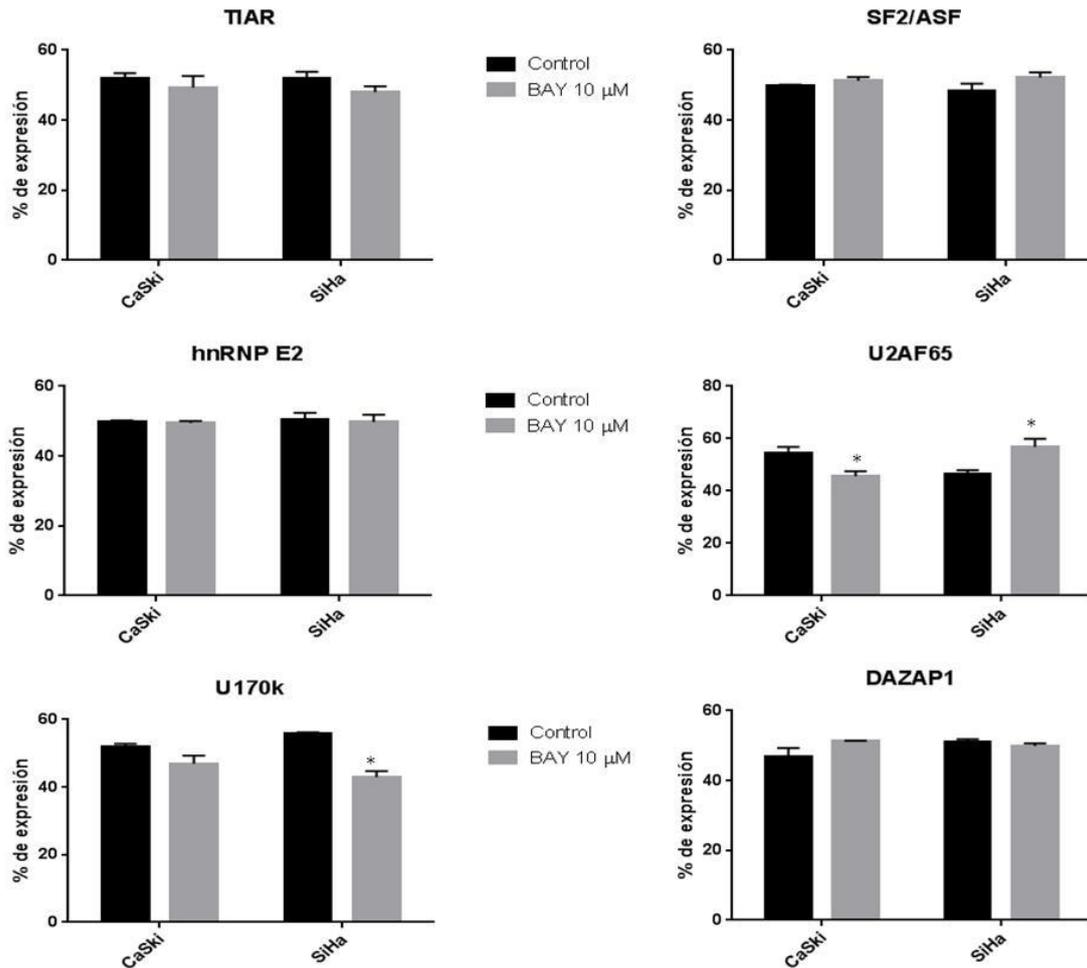


Figura 18. Análisis densitométrico de la expresión proteica de los distintos factores de splicing en las líneas celulares CaSki y SiHa tratadas o no tratadas con 10 μ M del inhibidor BAY 11-7082. Los valores y desviación estándar fueron calculados de al menos tres experimentos de western blot independientes. Los valores de P fueron calculados usando el análisis estadístico múltiple de t y determinando la significancia estadística por el método de Holm-Sidak, y son indicados arriba de las barras: (*) P<0.05.

Al analizar los perfiles de expresión de los factores de *splicing* en las líneas CaSki y SiHa tratadas con 10 μ M de BAY observamos que no hay cambios significativos para la mayoría de los factores de *splicing* (TIA1/TIAR, SF2/ASF, hnRNP E2, y DAZAP1) (Figura 18). En cambio cuando analizamos la expresión del factor U2AF65 observamos que hay una pequeña disminución en CaSki tratada comparándola con la línea sin tratar, y con SiHa en donde vemos un aumento también sutil, pero ambos cambios son significativos estadísticamente. Para el factor U170K en las células tratada con BAY se observa una disminución de la expresión, pero solo en el caso de SiHa este

cambio es significativo. Es decir los factores U2AF65 y U170k podrían estar siendo regulados a través de la vía clásica de NF- κ B. Por último se muestra actina como control de carga.

Ro52 influye probablemente en la vía clásica de NF- κ B de manera positiva.

Al analizar la expresión de diversas proteínas que se unen a RNA, la que presento mayores cambios en los diferentes experimentos fue Ro52, o también llamada TRIM21; nos dimos a la tarea de investigar más acerca de su función y al descubrir que puede tener un papel importante en la vía clásica de NF- κ B, nos intereso investigar cómo se encontraba dicha vía en las líneas celulares C33A, CaSki y SiHa.

Se ha atribuido un papel a Ro52 en la regulación de la cinasa de KB (IKK), Por lo que decidimos analizar los componentes del complejo IKK y a I κ B, así como a la ubiquitin ligasa encargada de marcar a I κ B para que sea degradado vía proteasoma, la cual lleva por nombre β TrCP1. En este análisis Ro52 se expresa mayoritariamente en CaSki a nivel de proteína y además este cambio es significativo estadísticamente, mientras que los niveles en C33A y SiHa son muy similares (Figura 19 y 20), en cambio los niveles de mensajero en las tres líneas se mantienen sin cambios significativos (Tabla 8). Para el caso de las proteínas de IKK; la mayor expresión de IKK α la encontramos en C33A, seguida de SiHa y por último CaSki, las diferencias son significativas cuando las comparamos contra C33A, aunque las diferencias entre CaSki y SiHa son sutiles. Similarmente, en el caso de IKK β la mayor expresión la encontramos en CaSki seguida de SiHa y por ultimo C33A, nuevamente las diferencias para esta proteína cuando la comparamos con C33A son estadísticamente significativas (Figura 20).

En el caso de NEMO o IKK γ la mayor expresión la encontramos en C33A mientras que en CaSki y SiHa los niveles de expresión son similares pero menores que en C33A, sin embargo estas diferencias no son significativas estadísticamente. En cuanto a la expresión de I κ B α tanto CaSki como SiHa tienen niveles de expresión similares y no muestran diferencias significativas. Por último con la proteína β TrCP1, la mayor expresión esta en CaSki y SiHa

con niveles similares y muestran una diferencia significativa estadísticamente al compararlas con la expresión de C33A. En este experimento se utilizó actina como control de carga y parece haber una relación entre los altos niveles de Ro52 en CaSki con altos niveles de IKK β y bajos niveles de IKK α en comparación con las demás líneas celulares.

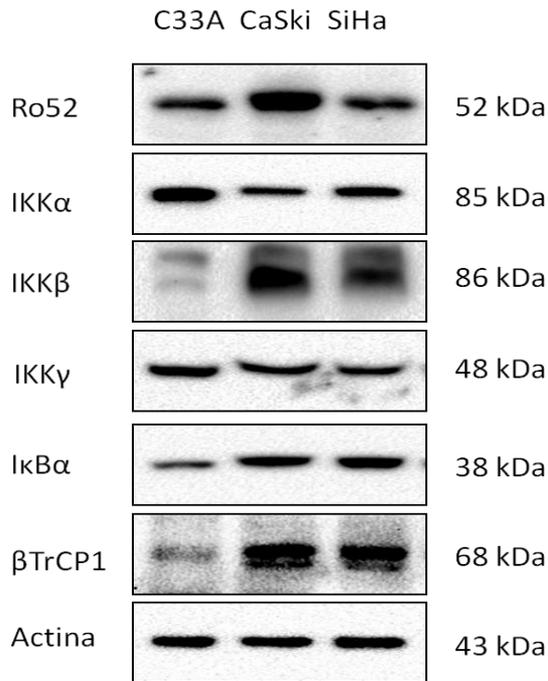


Figura 19. Expresión proteica de factores importantes en la vía clásica de NF- κ B: Ro52, IKK α , IKK β , IKK γ , I κ B α y β TrCP1 en las líneas celulares C33A (VPH-), CaSki (VPH-16 +) y SiHa (VPH-16 +). Se utilizó β -Actina como control de carga.

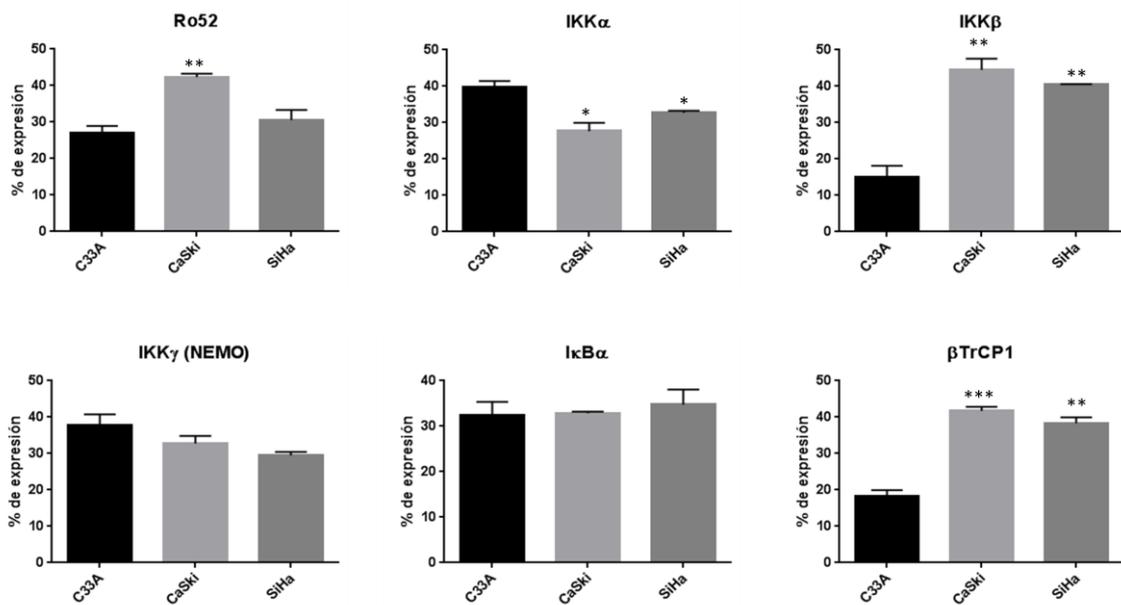


Figura 20. Análisis densitométrico de los distintos componentes de la vía clásica de NF-κB en las líneas celulares. Las barras representan el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de P fueron calculados usando el análisis estadístico ANOVA y son indicados arriba de las barras: (*) P<0.05; (**) P<0.01; (***) P<0.001.

	Transcript copy number x10 ⁶					
	C33A	CaSki	SiHa	E6SDM	E7	Mock
Ro52	20.34 ± 1.41	21.91 ± 1.71	18.43 ± 3.64	22.76 ± 1.79	21.43 ± 1.20	20.23 ± 1.80
Actina	994.8 ± 10.55	994.8 ± 38.5	994.8 ± 9.56	994.8 ± 87.3	994.8 ± 64.4	994.8 ± 14.3

Tabla 8. Expresión a nivel de mensajero de Ro52 obtenida por medio de qPCR en la línea celular C33A, CaSki, SiHa, C33A transfectada con E6SDM, C33A transfectada con E6/ y por ultimo C33A transfectada con el vector vacio "Mock". Las cantidades de mensajero están expresadas en millones de números de copias por 250 ng de mRNA. Se utilizo como control de carga actina y los datos están normalizados contra la expresión de esta.

Por último, dado que la expresión de Ro52 es mayor en las células positivas para VPH-16, decidimos explorar sus cambios de expresión en células C33A transfectadas con los monocistrones de E6 o E7 y analizar los cambios de expresión de los componentes de la vía clásica de NF-κB. Observamos que cuando están presentes dichas oncoproteínas hay un incremento en los niveles de proteína de Ro52 a diferencia de sus niveles de mensajero, los cuales no presentan cambios significativos. (Tabla 8).

En la figura 21 se muestran los niveles de expresión de Ro52 y proteínas importantes en la vía clásica de NF-κB en la línea celular C33A, y las transfectantes de E6SDM, E7 y analizados las diversas proteínas mediante western blot. Cuando analizamos la expresión de Ro52 confirmamos que cuando está presente E6 o E7 hay un incremento en la expresión de esta proteína y estas diferencias son significativas (Figura 22), habiendo un mayor aumento en E6SDM, comparado con C33A; en cambio, cuando analizamos a los componentes del complejo IKK: no observamos cambios significativos en la expresión IKKα entre las transfectantes, caso contrario cuando analizamos la expresión de IKKβ, observamos que cuando hay un aumento en la expresión

de esta proteína está presente E6 o E7, comparado con la expresión en C33A., y estos cambios son significativos estadísticamente, pero no observamos diferencias significativas (Figura 22) entre los niveles de expresión entre C33A, E6SDM o E7 para IKK γ (NEMO) e I κ B α . De manera interesante cuando analizamos a la ubiquitin ligasa β TrCP1 observamos que cuando está presente E6 hay una drástica disminución de la expresión de esta proteína, dado que hemos obtenido una señal cuando damos más tiempo de revelado en comparación con C33A no consideramos que su expresión se abata completamente, y caso contrario cuando está presente E7 hay un aumento de la expresión de esta proteína, en ambos casos las diferencias son significativas estadísticamente. Por lo que se observa una relación entre el incremento de los niveles de expresión de Ro52 y los niveles de IKK β cuando están presentes E6 o E7. Se muestra actina como control de carga.

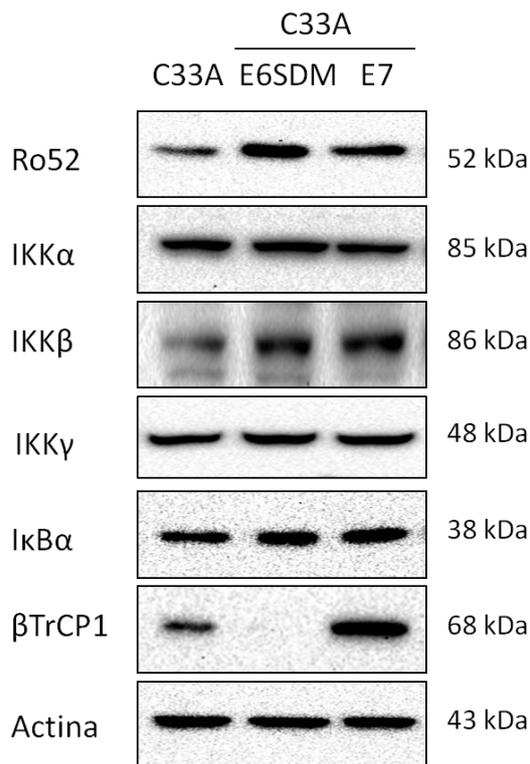


Figura 21. Expresión proteica de factores importantes en la vía clásica de NF- κ B: Ro52, IKK α , IKK β , IKK γ , I κ B α y β TrCP1 en las líneas celulares C33A (VPH-), C33A transfectada con E6SDM y C33A transfectada con E7. Se utilizo β -Actina como control de carga.

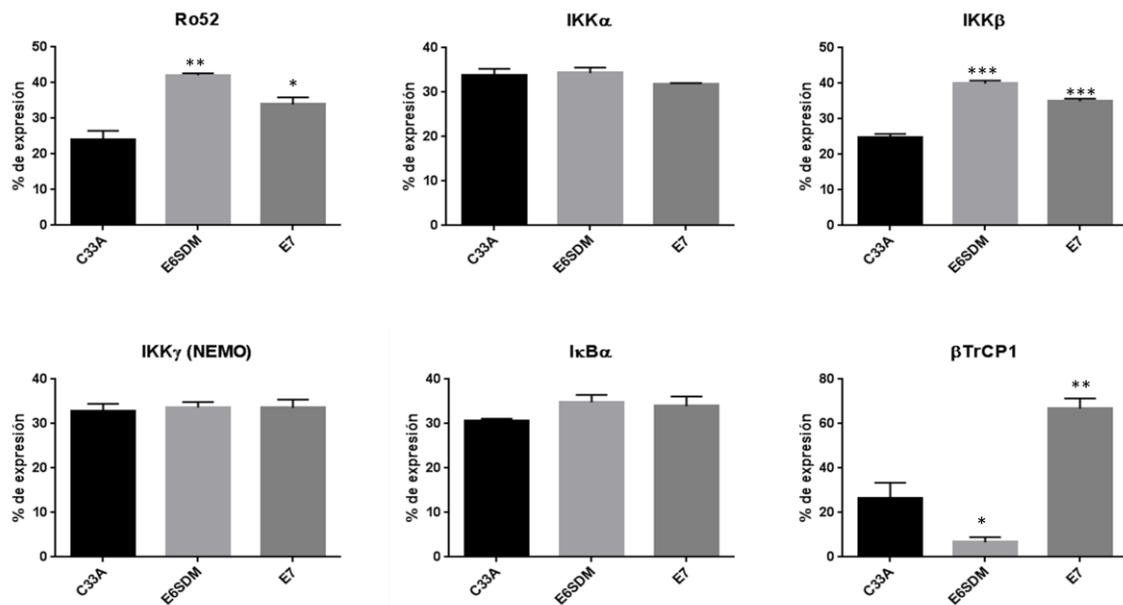


Figura 22. Análisis densitométrico de los distintos componentes de las vía clásica de NF- κ B en la línea celular C33A y ésta transfectada con E6SDM y E7. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de P fueron calculados usando el análisis estadístico ANOVA y son indicados arriba de las barras: (*) P<0.05; (**) P<0.01; (***) P<0.001.

DISCUSION

La transición de un epitelio normal a neoplasia y después produce cáncer representa una selección de múltiples etapas para las células más agresivas, para muchos genes, cambios dramáticos en sus patrones de splicing alternativo son asociados con neoplasia o metástasis (Phililps y Cooper 2000; Nissim-Rafinia y Kerem 2002), además en diferentes tipos de cáncer se ha reportado la desregulación de factores reguladores del *splicing* como proteínas SR y de hnRNPs, (Grosso *et al*, 2008), por lo que se plantea un dicotomía ¿La desregulación de factores de splicing o su actividad contribuyen a la transformación maligna o es una consecuencia del cáncer *per se*? Varios investigadores han reportado la alteración de factores de splicing usando modelos de transformación celular y sugieren que la desregulación de estos influye en el proceso oncogénico (Mole *et al*, 2009; Fay *et al*, 2009), pero también encontramos que dentro de un mismo tipo de cáncer hay variaciones de estos factores de splicing y algunos parecen ser estadio-específicos (Piekielko-Witkowska *et al*, 2010; Stickeler *et al*, 1999), por lo que creemos que si bien la alteración de la expresión de factores de splicing (con sus consecuencias sobre el patrón de splicing alternativo de algunos mensajeros celulares) influye en el proceso oncogénico, pero no en todos los casos es determinante.

En el caso de cáncer cervical asociado a VPH existen varios estudios que muestran a la proteína E2 como la responsable de la alteración de algunos factores de splicing, principalmente proteínas SR como SF2/ASF (Mole *et al*, 2009; Gauson *et al* 2014). Otros donde muestran que VPH-16 altera la expresión de diversos factores de splicing y que influyen sobre el propio splicing alternativo del virus (Cheunim *et al*, 2007; Jia *et al*, 2009; Rosenberger *et al*, 2010), sin embargo, no se ha demostrado un efecto de E6 o E7 en la alteración de la expresión de los factores de splicing y su efecto en el patrón de splicing alternativo de mensajeros celulares. Por lo que decidimos analizar la expresión de los factores de splicing TIAR, SF2/ASF, hnRNP E2, U2AF65, U170k y DAZAP1. Estos factores solo 4 de ellos tienen función conocida en el splicing, TIAR ayuda en el reclutamiento de la subunidad U1 del spliceosoma al sitio donador, SF2/ASF se une a ESEs y ayuda al reclutamiento del

spliceosoma en el reconocimiento del intrón, U170k y U2AF65 son componentes del spliceosoma encargadas del reconocimiento del sitio donador y del sitio aceptor respectivamente (para más información véase Faustino y Cooper, 2003 o Ward y Cooper, 2010), mientras que hnRNP E2 y DAZAP1 tienen funciones en la estabilidad de mensajeros y también a nivel traduccional (Palusa *et al*, 2011; Xin *et al*, 2011; Smith *et al*, 2011). Se ha reportado que también TIAR tiene función en la estabilidad de mensajeros (Delestienne *et al*, 2010; Damgaard *et al*, 2011). Todos ellos se unen diferencialmente al intrón 1 de VHP-16 y alteran el splicing alternativo de los oncogenes E6/E7 (López-Urrutia *et al*, 2012) por lo que decidimos analizar estos factores.

Previamente analizamos las 4 líneas celulares: C33A, CaSki, HeLa y SiHa (Díaz-Hernández, tesis de maestría) para observar cual era el perfil de expresión de los factores de splicing mencionados. Sin embargo, los patrones de expresión fueron muy variados tanto a nivel de proteína como a nivel mensajero y en la mayoría de los casos estos aumentos no muestran relación entre los 2 niveles de expresión. Una razón de esto pudiera ser que las 4 líneas celulares tienen diferentes tipos virales, como el caso de HeLa que contiene un virus tipo 18, y CaSki y SiHa que contienen un tipo 16, además entre estas dos últimas hay diferente número de copias virales: 300 y 2 respectivamente, y C33A es negativa al VPH. Sumado a estas diferencias en datos del laboratorio hemos observado que expresan de manera diferencial marcadores de diferenciación celular, y de apoptosis, entre otros, y además pertenecen a diferentes tipos de cáncer epitelial HeLa es un adenocarcinoma, SiHa es un carcinoma escamoso y CaSki proviene de una metástasis de epiplón de un carcinoma escamoso, lo que podría potenciar esa heterogeneidad. Para reducir todas esas diferencias utilizamos el modelo de células C33-A que provienen de un carcinoma epidermoide pero libre de VPH. Las ventajas de utilizar la línea celular C33A es que contiene tanto a p53 como a Rb mutados (Crook *et al*, 1991; Kilic *et al*, 1999) por lo que los efectos observados no serían vía estos factores. Además de que todo lo reportado hasta el momento sobre E6 y E7 es sobre el proceso de transformación oncogénica; no es claro su efecto en el cáncer propiamente dicho, como lo sería en nuestro modelo experimental.

Para investigar si es el VPH el responsable de la alteración de la expresión de dichos factores en cáncer de cérvix. Decidimos usar un modelo de células de C33-A transfectadas con el bicistrón de E6/E7 y sus distintos monocistrones y evaluar los cambios en el perfil de los factores de splicing, al usar el bicistrón E6E7C, observamos cambios significativos a nivel de mensajero de TIAR y SF2/ASF por lo que sugerimos que son las oncoproteínas del VPH-16 las responsables de tal alteración, en cambio cuando analizamos la expresión de estos factores cuando están transfectadas solo con E6 o E7 solo los factores TIAR y SF2/ASF tienen un incremento tanto a nivel de proteína como de mensajero, mientras que hnRNP E2 y U2AF65 solo hubo incremento en ambos niveles con E6, mientras que DAZAP1 solo muestran un incremento en sus niveles de mensajero, si bien esto nos sugiere que E6 y/o E7 están regulando positivamente a nivel de mensajero de TIAR y SF2/ASF, y E6 a hnRNP E2 y U2AF65, aun se necesitan más experimentos que ayuden a corroborar esta hipótesis. Interesantemente cuando están presentes las isoformas E6*I y E6*II se incrementan los niveles de mensajero de todos los factores de splicing analizados y en el caso de SF2/ASF y U2AF65 también hay incremento en los niveles de proteína pero solo con E6*I, lo cual nuevamente nos sugiere que existe una regulación positiva a nivel de mRNAs. Si bien con respecto a los demás factores observamos cambios opuestos en los cambios a nivel proteico y de mRNA (como el caso de DAZAP1), o cambios sin relación entre ellos, existe la posibilidad de que las alteraciones observadas tanto a nivel de proteína como de mensajero sean sujetos a una regulación postranscripcional e inclusive llevada a cabo por los mismo factores, ya que como lo mencionamos anteriormente muchos de ellos tienen funciones en la estabilidad de mensajeros.

Cuando analizamos los niveles de transcrito de los factores de splicing antes mencionados sobre todo cuando están presentes las oncoproteínas o sus isoformas observamos que en su mayoría hay un incremento en sus niveles de mensajero y en la mayoría no hay correlación con sus niveles de proteína, por lo que al investigar sobre su regulación transcripcional encontramos escasa información, sin embargo encontramos que la mayoría de los factores tienen sitios de unión probables (putativos) para p53, E2F o NF- κ B y dado que tanto

p53 y Rb están mutados en C33A (Por consiguiente E2F esta desregulado), creemos que la alteración de los factores pudiera estar siendo llevada vía NF- κ B, además por datos del laboratorio sabemos que CaSki tiene activas constitutivamente las vías clásica y no clásica, mientras que SiHa solo la no clásica (Sandoval-Basilio, tesis Doctoral). Al usar el inhibidor de la vía clásica BAY solo observamos cambios significativos en U2AF65 y U170k, por lo que suponemos que alguna de las 2 vías de NF- κ B regula la transcripción de algunos factores de splicing, dado que el inhibidor BAY 11-7082 no es específico y puede inhibir ambas vías (Rauert-Wunderlich *et al*, 2013), en la literatura no existen reportes sobre la regulación de los factores de splicing analizados vía NF- κ B. No podemos descartar tampoco regulación a otros niveles por NF- κ B.

Por último en datos del laboratorio (Díaz-Hernández, tesis de Maestría) observamos de entre los factores analizados, la proteína Ro52 fue la que mostró un mayor cambio en su expresión en las líneas CaSki y SiHa al igual que cuando se transfectaba con E6 o E7, por lo que posteriormente analizamos sus niveles de mensajero, sin embargo no encontramos diferencias significativas, al investigar acerca de la función de Ro52 encontramos que esta pertenece a la familia TRIM (Motivo tripartito) las cuales se caracterizan por tener un dominio RING, el cual es muy común en ubiquitin ligasas (Wada y Kamitani, 2005); dentro de sus funciones como ubiquitin ligasa esta regular la degradación de Bcl-2 (Aisyah-Jauharoh *et al*, 2011), p27 (Sabile *et al*, 2006), IRF-3 (Yang *et al*, 2009), IRF-8 (Jeong-Kong *et al*, 2007), regulando de esta manera procesos tan diversos como apoptosis, ciclo celular e respuesta inmune innata (McEwan *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2012), de hecho Ro52 es regulada también por IRFs o IFN (Jeong-Kong *et al*, 2007; Sjöstrand *et al*, 2013). Una de las funciones de Ro52 que nos interesa es que promueve la ubiquitilación de IKK β (no la lleva a degradación vía proteasoma) alterando la vía clásica de NF- κ B (Wada *et al*, 2009), por lo que decidimos analizar algunos componentes de esta vía.

Al analizar diversos componentes de la cinasa que regula la vía clásica de NF- κ B, como IKK α , IKK β , IKK γ (componentes del complejo IKK), I κ B α (inhibidor de los dímeros p50/RelA) y β TrCP1 (ubiquitin ligasa encargada de ubiquitilar a

I κ B α fosforilada y promover su degradación vía proteosoma (Wu y Gosh, 1999; Shirane *et al*, 1999)), observamos que la mayoría de estas proteínas no presentan cambios en su expresión al comparar CaSki y SiHa, a diferencia de IKK α la cual se expresa más en SiHa que en CaSki, esto creemos es normal dado que en la vía no clásica de NF- κ B las señales de activación recaen en IKK α . Por otro lado también observamos diferencias en la expresión de IKK β (quien participa en la regulación de la vía clásica) en CaSki que presenta mayor expresión que SiHa y esto correlaciona con una mayor expresión de Ro52 en CaSki, por lo que sugerimos que Ro52 puede estar participando en la ubiquitilación de IKK β promoviendo la estabilidad de esta proteína y dado que IKK γ (NEMO) es conocido por ser el regulador del complejo IKK y de tener un dominio de unión a ubiquitinas que se ha demostrado ser importante para la activación de la vía clásica de NF- κ B (Wu *et al*, 2006; Ea *et al*, 2006), creemos que NEMO reconoce a IKK β ubiquitilada y promueve la activación de la vía clásica de NF- κ B. Sin embargo esta hipótesis deberá ser demostrada.

Para explorar esta suposición analizamos los mismos componentes de la vía pero en la línea celular C33A transfectada con ESDM y E7, y encontramos como lo habíamos observado anteriormente que E6 y E7 incrementan los niveles de expresión de Ro52; al analizar a IKK β encontramos que también hay una mayor expresión de esta proteína en las transfectantes de E6 o E7 a diferencia de la línea sin transfectar, lo cual nos refuerza la hipótesis de que E6 y/o E7 alteran la expresión de Ro52 y esta a su vez el nivel de IKK β promoviendo la estabilidad de dicha proteína y también sirviendo de anclaje para que NEMO active la vía clásica de NF- κ B (Si bien se ha reportado un efecto distinto al que sugerimos, la diferencia podría estar en que el grupo de Kamitani uso células HEK293T (Células de riñón embrionario humano), por que el efecto puede variar dependiendo de la línea celular). Por otro lado, también notamos que cuando está presente E6 hay una disminución de los niveles de β TrCP1 y pero con E7 hay un incremento en los niveles de esta proteína, si bien suponemos que debido a que tanto como E6 y E7 son adaptadores de ubiquitin ligasas estas oncoproteínas pudieran ser las responsables de tales efectos, pero en niveles de regulación diferentes que β TrCP1 aun pueda ubiquitilar y promover la degradación de I κ B α (paso importante para permitir la

translocación de los dímeros p50/RelA), desconocemos cual podría ser el efecto de la alteración de la expresión por E6. β TrCP1 es una proteína que reconoce sustratos fosforilados para ubiquitarlos y promover su degradación (Wu y Gosh, 1999) y que I κ B α no es su único blanco; β TrCP1 también juega un papel importante en la vía de β -Catenina (Fuchs *et al*, 1999; Hart *et al*, 1999; Kitagawa *et al*, 1999), así como en diversas fases del ciclo celular (Guardavaccaro *et al*, 2003; Margottin-Goguet *et al*, 2003), y en respuesta a daño al DNA (Jin *et al*, 2003). El hecho de que E6 y E7 alteren su expresión diferencialmente podría repercutir en diversos procesos celulares, por lo que sería importante investigar más acerca de este fenómeno.

Si bien en las figuras 19 y 21, encontramos datos que nos sugieren la hipótesis de que E6 y E7 desregulan la vía clásica de NF- κ B mediante la expresión alterada de Ro52 y se necesitan experimentos que nos permitan corroborar esta hipótesis, pero de hacerlo sería la primera vez que se reporte un mecanismo por el cual E6 y/o E7 activan diferencialmente alguna de las vías de NF- κ B. También es necesario realizar más experimentos que nos permitan corroborar la regulación que sufren los factores de *splicing* cuando están presentes E6 o E7 o cuando están presentes las isoformas E6**I*, E6**II* y E6 \wedge E7.

CONCLUSIONES

Los factores TIA1/TIAR y SF2/ASF son aumentados a nivel de mRNA y proteína con las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16 lo cual sugiere una regulación positiva de la transcripción.

Las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16 alteran la expresión de los factores de splicing hnRNP E2, U2AF65 y DAZAP1 solo a nivel de mensajero.

Los factores SF2/ASF y U2AF65 son aumentados a nivel de mRNA y proteína con las isoformas E6*I de VPH-16 lo cual sugiere una regulación positiva de la transcripción.

Las isoformas E6*I y E6*II de VPH-16 alteran la expresión de los factores de splicing TIA1/TIAR, hnRNP E2, U170k y DAZAP a nivel de mensajero.

Los factores de splicing U2AF65 y U170k probablemente están siendo regulados por alguna vía de NF- κ B.

Sugerimos que E6 y/o E7 de VPH-16 activan la vía clásica de NF- κ B a través de la alteración de la expresión de Ro52.

E6 y E7 de VPH-16 alteran la expresión de β TrCP1, aunque desconocemos el efecto de tal alteración.

PERSPECTIVAS

Analizar cuál es la repercusión de la alteración de los factores de splicing por E6 y/o E7 en el perfil del splicing alternativo de algunos mensajeros celulares.

Realizar co-transfecciones entre E6, E7, E6*I, E6*II y E6^E7 para determinar cuál es efecto de la co-expresión de estas oncoproteínas sobre la expresión de los factores de splicing.

Determinar a qué nivel están siendo regulados los factores de splicing.

Determinar si algunos factores de splicing están siendo regulados a través de la vía no clásica de NF- κ B.

Corroborar que E6 y/o E7 activan la vía de NF- κ B a través de la alteración de la expresión de Ro52 y a qué nivel se da dicha alteración.

Analizar cuál es el efecto de la alteración de β TrCP1 por E6 y/o E7 en la vía de NF- κ B y en otras vías importantes para la célula.

REFERENCIAS

- Aisyah-Jauharoh SN, Saegusa J, Sugimoto T, Ardianto B, Kasagi S, Daisuke Sugiyama et al. SS-A/Ro52 promotes apoptosis by regulating Bcl-2 production. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012; 417: 582–587
- Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* 2004; 382: 393–409
- Ben-Chetrit E, Chan EK, Sullivan KF, Tan EM. A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J Exp Med* 1988; 167: 1560e71
- Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 2003; 72: 291-336
- Bonizzi, G. and Karin, M. The two NF-kB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; 25: 280–288
- 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
- Bridge E, Xia DX, Carmo-Fonseca M, Cardinali B, Lamond AI and Pettersson U. Dynamic organization of splicing factors in adenovirus-infected cells. *J Virol* 1995, 69(1):281-290
- Cheunim T, Zhang J, Milligan SG, McPhillips MG, Graham SV. The alternative splicing factor hnRNP A1 is up-regulated during virus-infected epithelial cell differentiation and binds the human papillomavirus type 16 late regulatory element. *Virus Res* 2008; 131 (2-5): 189-198
- Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappaB2 in maturing B cells. *Nat Immunol* 2002; 3: 958–965
- Coope HJ, et al. CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J* 2002; 15: 5375–5385
- Crook T, Wrede D, Vousden KH. p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene*. 1991 May; 6(5): 873-5
- Damgaard CK and Lykke-Andersen J. Translational coregulation of 5' TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR. *Genes Dev* 2011; 25: 2057-2068

- De la Rosa-Rios MA, Martínez-Salazar M, Martínez-García M, Gonzalez-Bonilla C, Villegas-Sepulveda N. The intron 1 of VPH 16 has a suboptimal branch point at a guanosine. *Virus Res* 2006; 118: 46–54
- De Villiers E, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27
- Dejardin E, et al. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 2002; 17: 525–535
- Del Moral-Hernández O, López-Urrutia E, Bonilla-Moreno R, Martínez-Salazar M, Arechaga-Ocampo E, Berumen J, Villegas-Sepúlveda N. The VPH-16 E7 oncoprotein is expressed mainly from the unspliced E6/E7 transcript in cervical carcinoma C33-A cells. *Arch Virol* 2010
- Del Moral-Hernández. 210. Participación del splicing alternativo en la regulación de la expresión de la oncoproteína E7 del VPH-16. Tesis Dr en C. CINVESTAV-IPN
- Delestienne N, Wauquier C, Soin R, Dierick J, Gueydan C, Kruys. The splicing factor ASF/SF2 is associated with TIA-1-related/TIA-1-containing ribonucleoproteic complexes and contributes to post-transcriptional repression of gene expression. *FEBS Journal* 2010; 277: 2496-2514
- Díaz-Hernández JA. 2011. Efecto de la participación de los factores de splicing celulares sobre el patrón de splicing alternativo del bicistrón E6/E7C de VPH-16. Tesis M en C. CINVESTAV-IPN
- Dowling D, Nasr-Esfahani S, Tan CH, O'Brien K, Howard JL, Jans DA, et al. HIV-1 infection induces changes in expression of cellular splicing factors that regulate alternative viral splicing and virus production in macrophages. *Retrovirology* 2008, 5:18
- Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G, Chen ZJ. Activation of IKK by TNF α Requires Site-Specific Ubiquitination of RIP1 and Polyubiquitin Binding by NEMO. *Molecular Cell* 2006; 22: 245–257
- Faustino NA and Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 2003 17: 419-437
- Fay J, Kelehan P, Lambkin H and Schwartz S. Increased Expression of Cellular RNA-Binding Proteins in HPV-Induced Neoplasia and Cervical Cancer. *Journal of Medical Virology* 2009; 81: 897–907
- Fedor MJ. Alternative splicing minireview series: combinatorial control facilitates splicing regulation of gene expression and enhances genome diversity. *J Biol Chem* 2008; 283: 1209-1210

Filippova M, et al. The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity. *J Virol* 2007; 81: 4116-4129

Fischer DC, Noack K, Runnebaum IB, Watermann DO, Kieback DG, Stamm S, et al. Expression of splicing factors in human ovarian cancer. *Oncol Rep* 2004; 11: 1085–1090

Fuchs SY, Chen A, Xiong Y, Pan ZQ and Ronai Z. HOS, a human homolog of Slimb, forms an SCF complex with Skp1 and Cullin1 and targets the phosphorylation-dependent degradation of I κ B and β -catenin. *Oncogene* 1999; 18: 2039–2046

Gauson EJ, Windle B, Donaldson MM, Caffarel MM, Dornan ES, Coleman N, Herzyk P, Henderson SC, Wang X, Morgan IM. Regulation of human genome expression and RNA splicing by human papillomavirus 16 E2 protein. *Virology* 2014; 10(8): 468-470

Grosso AR, Martins S, Carmo-Fonseca M. The emerging role of splicing factors in cancer. *EMBO reports* 2008; 9: 1087-1093

Guardavaccaro D, Kudo Y, Boulaire J, Barchi M, Busino L, Donzelli M, Margottin-Goguet F, Jackson PK, Yamasaki L and Pagano M. Control of meiotic and mitotic progression by the F box protein beta-Trcp1 in vivo. *Dev. Cell* 2003; 4: 799–812

Hart M, Concordet JP, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H, Perret C, Rubinfeld B, Margottin F, Benarous R and Polakis P. The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* 1999; 9: 207–210

Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B in immunobiology. *Cell Res* 2011; 21: 223–244

Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008; 132: 344–362

Heissmeyer V, Krappmann D, Hatada EN, Screidereit C. Shared Pathways of I κ B Kinase-Induced SCF β TrCP-Mediated Ubiquitination and Degradation for the NF- κ B Precursor p105 and I κ B α . *Mol Cell Biol* 2001; 21(4): 1024-1035

Ho L, Chan S, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icengole JP, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol* 1993 67(11): 6413-6423

Howley PM, DR Lowy. Papillomaviruses and their replication. Fundamental virology. PM Howley D M Knipe. Filadelfia, E.U. Lippincott Williams and Wilkins 2001: 1019-1051

Itoh K, Itoh Y, Frank MB. Protein heterogeneity in the human Ro/SSA ribonucleoproteins. the 52- and 60-kD Ro/SSA autoantigens are encoded by separate genes. J Clin Invest 1991; 87: 177e86

Jeong-Kong H, Anderson DE, Lee CH, Jang MK, Tamura T, Tailor P, et al. Autoantigen Ro52 Is an Interferon Inducible E3 Ligase That Ubiquitinates IRF-8 and Enhances Cytokine Expression in Macrophages. The Journal of Immunology 2007; 179: 26–30

Jia R, Liu X, Tao M, Kruhlak M, Guo M, Meyers C, Baker CC, Zheng Z. Control of the papillomavirus early-to-late switch by differentially expressed SRp20. J virol 2009; 83: 167-180

Jin J, Shirogane T, Xu L, Nalepa G, Qin J, Elledge SJ, et al. SCF β -TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. Genes Dev 2003; 17: 3062–74

Joazeiro, C. A., S. S. Wing, H. Huang, J. D. Levenson, T. Hunter, and Y. C. Liu. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. Science 1999; 286: 309–312

Jones DL, Thompson DA, Munger K. Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to VPH type 16 E7-induced apoptosis. Virology 1997; 239: 97–107

Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a protooncogene. Nat Struct Mol Biol 2007;14:185–193

Kashima T, Rao N, David CJ, Manley JL. hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. Hum Mol Genet 2007;16:3149–3159

Kayagaki N, et al. BAFF / BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2. Immunity 2002; 17: 515–524

Kilic G, Cardillo M, Ozdemirli M, Arun B. Human papillomavirus 18 oncoproteins E6 and E7 enhance irradiation and chemotherapeutic agent-induced apoptosis in p53 and Rb mutated cervical cancer cell lines. Eur J Gynaecol Oncol 1999; 20(3): 167-71

Kitagawa M, Hatakeyama S, Shirane M, Matsumoto M, Ishida N, Hattori K, Nakamichi I, Kikuchi A and Nakayama K. An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of β -catenin. *EMBO J* 1999; 18: 2401–2410

Krawczak M, Thomas NS, Hundrieser B, Mort M, Wittig M, Hampe J, et al. Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. *Hum Mutat* 2007;28:150–158

Ling L, Cao Z, Goeddel DV. NF- κ B inducing kinase activates IKK α phosphorylation of Ser-176. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998, 95: 3792–3797

López-Urrutia E1, Valdés J, Bonilla-Moreno R, Martínez-Salazar M, Martínez-García M, Berumen J, Villegas-Sepúlveda N. A few nucleotide polymorphisms are sufficient to recruit nuclear factors differentially to the intrón 1 of HPV-16 intratypic variants. *Virus Res* 2012; 166(1-2): 43-53

Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6307–6311

Margottin-Goguet F, Hsu JY, Loktev A, Hsieh HM, Reimann JD and Jackson PK. Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Dev Cell* 2003; 4: 813–826

McEwan WA, Tam JCH, Watkinson RE, Bidgood SR, Mallery DL & James LC. Intracellular antibody-bound pathogens stimulate immune signaling via the Fc receptor TRIM21. *Nature immunology* 2013; 14(4): 327-336

McFarlane M, MacDonald AI, Stevenson A, Graham SV. Human Papillomavirus 16 Oncoprotein Expression Is Controlled by the Cellular Splicing Factor SRSF2 (SC35). *J Virol* 2015; 89(10): 5276-87

Mole S, McFarlane M, Chuen-Im T, Milligan SG, Millan D and Graham SV. RNA splicing factors regulated by VPH16 during cervical tumour progression. *J Pathol* 2009; 219: 383–391

Mole S, Milligan SG and Graham SV. Human Papillomavirus Type 16 E2 Protein Transcriptionally Activates the Promoter of a Key Cellular Splicing Factor, SF2/ASF. *J Virol* 2009; 83(1): 357-367

Muñoz N, Castellsagué X, Berington de González A, Gissmann L. Chapter 1: VPH in the ethiology of human cáncer. 2006. *Vaccine* 24S3: S3/1-S3/10

Munroe ME, Bishop GA. Role of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 2 (TRAF2) in distinct and overlapping CD40 and TNF

receptor 2 / CD120b-mediated B lymphocyte activation. *J Biol Chem* 2004; 279: 53222–53231

Napolitano, L. M., and G. Meroni. TRIM family: pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation. *IUBMB Life* 2012; 64: 64–71

Niida M, Tanaka M, Kamitani T. Downregulation of active IKK β by Ro52 mediated autophagy. *Molecular Immunology* 47, 2010: 2378-2387

Nissim-Rafinia, M. and Kerem, B. Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends Genet* 2002; 18: 123–127

Novack DV, et al. The IkappaB function of NF-kappaB2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis. *J Exp Med* 2003; 198: 771–781

Olopade OI, Adeyanju MO, Safa AR, Hagos F, Mick R, Thompson CB, et al. Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J Sci Am* 1997;3:230–237

Palusa S, Ndaluka C, Bowen RA, Wilusz CJ, Wilusz J. The 3' untranslated region of the rabies virus glycoprotein mRNA specifically interacts with cellular PCBP2 protein and promotes transcript stability. *Plos one* 2012; 7 (3): e33561

Peng, H., G. E. Begg, D. C. Schultz, J. R. Friedman, D. E. Jensen, D. W. Speicher, and F. J. Rauscher, III. Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* 2000; 295: 1139–1162

Philips, A.V. and Cooper, T.A. RNA processing and human disease. *Cell Mol. Life Sci.* 2000; 57: 235–249

Piekielko-Witkowska A, Wiszomirska H, Wojcicka A, Poplawski P, Boguslawska J, et al. Disturbed Expression of Splicing Factors in Renal Cancer Affects Alternative Splicing of Apoptosis Regulators, Oncogenes, and Tumor Suppressors. *PLoS ONE* 2010; 5(10): e13690

Pim D, Banks L. VPH-18 E6*1 protein modulates the E6-direct degradation of p53 by binding to full length VPH-18 E6. *Oncogene* 1999; 18: 7403-7408

Ramakrishnan P, Wang W, Wallach D. Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF-kappaB activation pathways by NF-kappaB-inducing kinase. *Immunity* 2004; 21: 477–489

Rauert H, et al. Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). *J Biol Chem* 2010; 285: 7394–7404

Rauert-Wunderlich H, Siegmund D, Maier E, Giner T, Bargou RC, Wajant H, Stühmer T. The IKK inhibitor bay 11-7082 induces cell death independent from inhibition of activation of NF κ B transcription factors. *Plos one* 2013; 8 (3): e59292

Reymond, A., G. Meroni, A. Fantozzi, G. Merla, S. Cairo, L. Luzi, D. Riganelli, E. Zanaria, S. Messali, S. Cainarca, et al. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J* 2001; 20: 2140–2151.

Roden R, Wu TC. How will VPH vaccines affect cervical cancer? *Nature* 2006; 6:753-763

Rosenberger S, De-Castro Arce J, Langbein L, Steenbergen RDM, Rösl F. Alternative splicing of human papillomavirus type-16 E6/E6* early mRNA is coupled to EGF signaling via Erk 1/2 activation. *PNAS* 2010; 107: 7006-7011

Sabile A, Meyer AM, Wirbelauer C, Hess D, Kogel U, Scheffner M, Krek W. Regulation of p27 Degradation and S-Phase Progression by Ro52 RING Finger Protein. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 2006; 26(16): 5994–6004

Sandoval-Basilio JL. 2012. Alteracion de la expresión y activación de NF- κ B y su efecto en cáncer cervico uterino. Tesis Dr en C. CINVESTAV-IPN

Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., et al. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* 2001; 293: 1495–1499

Shirane, M., S. Hatakeyama, K. Hattori, and K. Nakayama. Common pathway for the ubiquitination of I κ B α , I κ B β , and I κ B ϵ mediated by the F-box protein FWD1. *J Biol Chem* 1999; 274:28169–28174

Sjöstrand M, Ambros A, Brauner S, Sullivan J, Malin S, Kuchroo VK, Espinosa A, Wahren-Herlenius M. Expression of the Immune Regulator Tripartite-Motif 21 Is Controlled by IFN Regulatory Factors. *The Journal of Immunology* 2013; 191: 3753–3763

Smith RW, Anderson RC, Smith JW, Brook M, Richardson WA, Gray NK. DAZAP1, an RNA-binding protein required for development and spermatogenesis, can regulate mRNA translation. *RNA* 2011; 17 (7): 1282-95

Smotkin D, Prokoph H, Wettstein FO. Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J Virol* 1989; 63: 1441-1447

Staley JP, Guthrie C. Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 1998; 92: 315-26

Stickeler E, Kittrell F, Medina D, Berget SM. Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumorigenesis. *Oncogene* 1999; 18: 3574-3582

Stöppler MC, Ching K, Stöppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* 1996; 70(10): 6987-6993

Sumantran VN, Ealovega MW, Nunez G, Clarke MF, Wicha MS. Overexpression of Bcl-XS sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1995;55:2507–2510

Sun SC. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res* 2011; 21: 71–85

Swan DC, Rajeevan M, Tortolero-Luna G, Follen M, Tucker RA, Unger ER. Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants. *Gynecol Oncol* 2005; 695-700

Tu Y, Renner S, Xu F, Fleishman A, Taylor J, Weisz J, et al. BCL-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance. *Cancer Res* 1998;58:256–262

Valadkhan S. The spliceosome: caught in a web of shifting interactions. *Curr Opin Struct Biol* 2007; 17: 310-315

Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 693–733

Verma D, Bais S, Gaillard M and Swaminathan S. Epstein-Barr virus SM protein utilizes cellular splicing factor SRp20 to mediate alternative splicing. *J Virol* 2010, 84(22):11781-11789

Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer FX, Shah KV, Snijders PJF, Peto J, Meijer CJLM, Muñoz N. Human papillomavirus is necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-19

Ward AJ and Cooper TA. The pathobiology of splicing. *J Pathol* 2010; 220: 152–163

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76–79

Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW. The SCF β -TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I κ B α and β -catenin and stimulates I κ B α ubiquitination in vitro. *Genes Dev* 1999; 13: 270–83

Wu CJ, Conze DB, Li T, Srinivasula SM, Ashwell JD. Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF- κ B activation. *Nature Cell Biology* 2006; 8(4): 398-406

Wu JY, Maniatis T. Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* 1993; 75: 1061–1070

Wu, C., and S. Ghosh. β -TrCP mediates the signal-induced ubiquitination of I κ B β . *J Biol Chem* 1999; 274: 29591–29594

Xi LF, Koutsky LA, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Winer RL, Ho J, Kiviat N. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(1): 4-10

Xin Z, Han W, Zhao Z, Xia Q, Yin B, Yuan J, Peng X. PCBP2 enhances the antiviral activity of IFN- α against HCV by stabilizing the mRNA of STAT1 and STAT2. *Plos one* 2011; 6 (10): e25419

Yang K, Shi HX, Liu XY, Shan YF, Wei B, Chen S, and Wang C. TRIM21 Is Essential to Sustain IFN Regulatory Factor 3 Activation during Antiviral Response. *The Journal of Immunology* 2009; 182: 3782–3792

Zamore PD, Green MR. Identification, purification, and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9243–9247

Zehbe I, Richard C, De Carlo CA, Shai A, Lambert PF, Lichtig H, Tommasino M, Sherman L. Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology* 2009; 283: 69-77

Zehbe I, Tachezy R, Mytilineos J, Voglino G, Mikyskova I, Delius H, Marongiu A, Gissmann L, Wilander E, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. *Int J Cancer* 2001; 94: 711-716

Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* 1998; 58: 829-833

Zhang T, Krays V, Huez G, Gueydan C. AU-rich element-mediated translational control: complexity and multiple activities of trans-activating factors. *Biochemical Society Transactions* 2002; 30 (6): 952-958

Zhang Z, Bao M, Lu N, Weng L, Yuan B & Liu YJ. The E3 ubiquitin ligase TRIM21 negatively regulates the innate immune response to intracellular double-stranded DNA. *Nature Immunology* 2013; 14(2): 172-8

Zheng Z, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 2006; 11: 2286-302

Zheng, N., P. Wang, P. D. Jeffrey, and N. P. Pavletich. Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* 2000; 102: 533–539

Zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochem Biophys* 1996; *Acta* 1288: F55-F78

Zur Hausen H. Papillomavirus-to vaccination and beyond. *Biochemistry* 2008; 73: 498-503