

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“Efecto de la proteína E2 de VPH-11 en los procesos de diferenciación y auto-renovación de las subpoblaciones de la línea celular HaCaT”

Tesis que presenta

Q.F.B. DIANA LEMUS HERNÁNDEZ

para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

en la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de la Tesis

Dr. José Efraín Garrido Guerreo

México, D.F.

Septiembre, 2015

Este trabajo se desarrolló en el *Laboratorio de Investigación en Biología Molecular y Celular del Cáncer* (Lab. No. 1) del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. José Efraín Garrido Guerreo y con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), mediante los fondos del proyecto 105174 y con el número de apoyo 368269 del Programa de Becas Nacionales.

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	3
<i>Ciclo viral</i>	4
<i>Clasificación por incidencia</i>	5
PROTEÍNA E2	6
E2 DE VPH 16 PROMUEVE LA DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR HACAT.....	8
EPITELIO	9
<i>Marcadores de superficie de las subpoblaciones de la capa basal</i>	12
ANTECEDENTES	14
EFECTO DE LA PROTEÍNA E2 DE VPH-16 EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA CAPA BASAL.....	14
E2 DE VPH-16 ALTERA LA UNIÓN DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL TAF-1 A PROMOTORES CELULARES DE GENES DE DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN.....	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
METODOLOGÍA	21
LÍNEAS Y CULTIVOS CELULARES.....	21
CLONACIÓN DEL TRANSGEN E2-11 EN EL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN pSIN-EF2-PUR	21
<i>PCR con enzima de alta fidelidad Pfx y purificación del amplicón</i>	21
<i>Restricción doble con BamHI y EcoRI y ligación</i>	23
<i>Transformación de bacterias quimiocompetentes DH5α</i>	24
<i>Caracterización de los plásmidos</i>	24

PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES E2-11 Y E2-16	26
<i>Concentración de partículas virales</i>	26
<i>Titulación de partículas virales</i>	27
INFECCIÓN DE CÉLULAS HACAT CON PARTÍCULAS LENTIVIRALES	28
RNA	29
<i>Extracción de RNA</i>	29
<i>RT-PCR</i>	29
<i>PCR cuantitativa (qPCR)</i>	31
PROTEÍNAS.....	31
<i>Extracción</i>	31
<i>Western Blot</i>	32
CITOMETRÍA DE FLUJO	33
RESULTADOS	35
CLONACIÓN PSIN-EF2-E211-PUR.....	35
EXPRESIÓN DE E2 DE VPH-11 EN HACAT EMPLEANDO UN SISTEMA LENTIVIRAL	39
CAMBIOS EN LA ABUNDANCIA RELATIVA DE LAS SUBPOBLACIONES A6	
INTEGRINA/CD71 AL EXPRESAR LA PROTEÍNA E2 DE VPH-11.....	41
ALTERACIÓN EN LOS NIVELES DE MRNA DE GENES INVOLUCRADOS EN LOS	
PROCESOS DE DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR AL EXPRESAR LA	
PROTEÍNA E2 DE VPH-11.....	44
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVAS	52
BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXO 1 INDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA E211 AU1 EN BACTERIAS	
BL21(DE3).....	60

Resumen

La proteína E2 del Virus del Papiloma Humano (VPH) es un factor transcripcional que además de regular los genes virales, también altera la expresión de genes celulares. Esta función la realiza debido a que además de poseer un dominio de unión a DNA, también es capaz de interactuar con proteínas celulares, entre ellas diversos factores transcripcionales, logrando así la modificación de la expresión génica celular. Es ya conocido que al expresarse la proteína E2 de VPH-16 no sólo se altera la abundancia relativa de transcritos de diferenciación y proliferación celular, sino que también hay cambios a nivel proteico que favorecen el proceso de diferenciación celular.

Estas observaciones han sido realizadas durante la diferenciación terminal del epitelio, es decir observando el incremento de marcadores de diferenciación de la capa supra-basal, sin embargo se desconocen los efectos de esta proteína viral en las células componentes de la capa basal del epitelio. Por esta razón, el objetivo principal de este trabajo fue determinar los efectos de la expresión de la proteína E2 de los VPHs 11 y 16, sobre los eventos tempranos de la diferenciación de las células de la capa basal del epitelio, así como sobre la expresión de algunos genes celulares implicados en este proceso.

Nuestros resultados indicaron que al expresarse cualquiera de las proteínas E2, ocurre un incremento en la diferenciación celular; sin embargo, los cambios en las subpoblaciones suceden de manera diferente. De la misma manera, la expresión de los genes que codifican para proteínas involucradas en los procesos de proliferación y diferenciación celular son modificados de manera distinta por la proteína E2 de VPH 16 que por la de VPH 11.

Summary

The Human Papillomavirus (HPV) E2 protein is a transcriptional factor that regulate viral genes, but also could alter the expression of cellular genes This activity is possible due to the structure of the protein, since it not only has a DNA domain, besides it could also interact with cellular proteins, including cellular transcriptional factors, making possible to modify the expression of cellular genes. It is known that when the HPV-16 E2 protein is expressed the cellular differentiation and proliferation genes are altered not only at transcriptional level, but also there are changes in a protein level, resulting in an increase in cellular differentiation.

These observations have been made during terminal differentiation of the epithelium, i.e. observing the increase in the differentiation markers of the supra-basal layer, however the effects of this viral protein are unknown in the cells of the basal layer of the epithelium. Therefore, the main objective of this study was to determine the effects of the expression of the E2 protein from the HPV's 11 and 16 on early events in the differentiation process of cells from the epithelial basal layer, as well as the expression of some cellular genes involved in this process.

Our results indicated that the expression of E2 proteins from both viral types increase the cell differentiation; however, changes in the subpopulations occur differently. Similarly, the expression of genes encoding proteins involved in cell proliferation and differentiation processes are modified differently by the E2 protein of HPV 16 or HPV 11.

Introducción

Virus del Papiloma Humano

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus envuelto, cuyo genoma es circular y de doble cadena. Su genoma es de longitud variable según el tipo de VPH, en promedio tiene un tamaño de ocho kilobases (kb) [1].

El genoma viral consta de 6 marcos de lectura abierta (ORF's) que dan lugar a proteínas tempranas (E1, E2, E4-E7) y 2 ORF's que dan lugar a las proteínas tardías (L1 y L2), las cuales forman parte de la estructura del virion maduro [1]. La expresión de las proteínas virales está regulada por la región larga de control (LCR), la cual cuenta con sitios de unión para la proteína E2, regulando así la expresión génica viral (Figura 1)

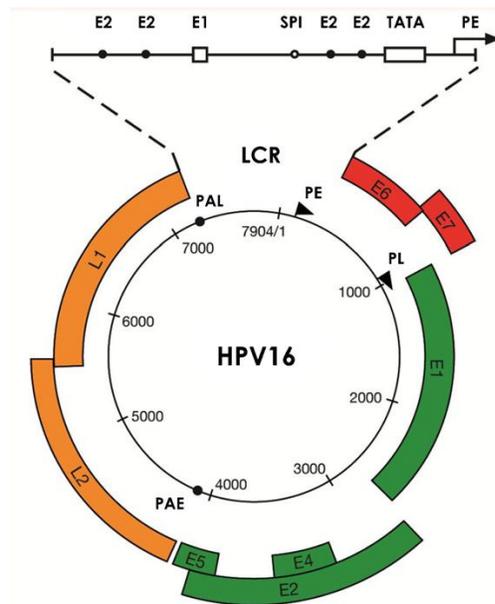


Figura 1. Mapa genético de HPV16. Se muestran las regiones de los 8 ORF's además de la región LCR y los sitios de unión a E2.

Las funciones generales descritas para las ocho proteínas virales se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Funciones descritas de las proteínas virales.

Proteína	Función
E1	Helicasa, ATPasa, replicación del DNA
E2	Factor de transcripción viral
E4	Interactúa con proteínas del citoesqueleto permitiendo el ensamblaje viral
E5	Sobre-expresión del EGFR
E6	Se une a p53 promoviendo su degradación
E7	Se une a Rb, desregulando el "checkpoint" G1/S
L1	Proteína mayor de la cápside
L2	Proteína menor de la cápside

Tomado de [2].

La expresión de cada una de las proteínas virales sucede en puntos específicos del ciclo viral, por lo que es conveniente mencionar algunos aspectos de éste.

Ciclo viral

Se sabe que el ciclo viral es dependiente del estadio de diferenciación celular [3], en la figura 2 se muestra la expresión proteica viral en cada capa epitelial. Las proteínas tempranas del virus se expresan desde la capa basal del epitelio, donde se encuentran las células que son blanco de la infección viral. Las proteínas tardías se expresan en las capas mas superficiales del epitelio, lo que asegura que la progenie viral sea liberada.

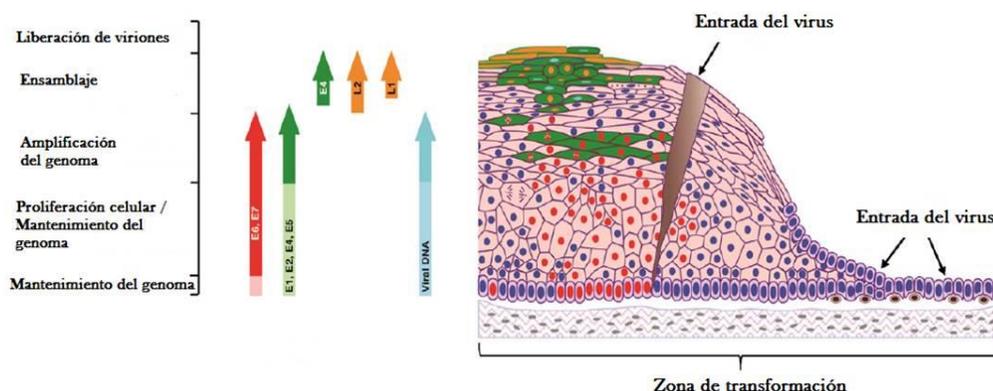


Figura 2. Expresión de las proteínas virales según el estadio de diferenciación epitelial. Se muestra tanto la expresión de las diferentes proteínas como los sitios de entrada virales. Tomado de [1].

El VPH es el principal agente etiológico del cáncer cérvico-uterino, de ahí su importancia y se clasifican en base a su incidencia.

Clasificación por incidencia

Los papillomavirus se dividen en cinco géneros, siendo aquellos que pertenecen al género alfa los que son capaces de infectar mucosas y epitelio. Dentro de estos a su vez se clasifican en bajo o alto riesgo según su incidencia en cáncer cérvico-uterino [1]. Los virus del tipo 16 y 18 son los de mayor incidencia en cáncer cérvico-uterino, por lo que son los prototipos del grupo de virus clasificado como de alto riesgo [4]–[6], mientras que los tipos 6 y 11 no se han asociado a cáncer siendo considerados virus de bajo riesgo [5], [7], [8].

Se ha reportado que la célula hospedera responde de manera diferente si se trata de un virus de alto o de bajo riesgo [9], [10]. Una de las diferencias más importantes entre los papilomavirus de alto y bajo riesgo es la afinidad de sus oncoproteínas por sus blancos celulares. Se sabe que las proteínas E6 y E7 de los virus de alto riesgo presentan una mayor afinidad por las proteínas p53 y Rb respectivamente, con respecto a las proteínas de virus de bajo riesgo [1], [11], [12]. Dicha afinidad provoca que las proteínas E6 y E7 de los tipos virales de alto riesgo sean las únicas capaces de transformar a las células [2], [13], [14]. Sin embargo estas proteínas virales no son las únicas que presentan diferencias entre los virus de alto y bajo riesgo, ya que también se ha reportado que la proteína E2 presenta importantes diferencias tanto en su secuencia como en su estructura deducida *in silico* [15]. También se han reportado diferencias en su unión al DNA [16], [17] que repercuten en su función como regulador transcripcional [18], [19] y de igual manera diferencias en las interacciones que puede llevar a cabo con diferentes proteínas celulares [20], [21].

Proteína E2

Como se mencionó anteriormente, la proteína E2 es una proteína temprana codificada por el gen del mismo nombre, con aproximadamente 360 aminoácidos (aa) y, un peso de 42-50 kDa.

La proteína E2 consta de tres dominios; en la figura 3 se esquematizan dichos dominios, las funciones de cada uno se describen a continuación [22]:

- Dominio de transactivación (TAD): Dominio conformado por aproximadamente 200 aa, se encuentra en la región amino-terminal. Se sabe que tiene la capacidad de interactuar con diferentes proteínas celulares y con la proteína viral E1.
- Dominio bisagra: Es el dominio de unión entre los dominios funcionales TAD y DBD, tiene una región de longitud variable.
- Dominio de unión a DNA (DBD): Dominio de aproximadamente 100 aa, se encuentra en el extremo carboxilo. Se sabe que reconoce la secuencia ACCGN₄CGGT en el DNA, sitio de unión a E2 (E2BS).



Figura 3. Esquema de los dominios de la proteína E2. Se muestran los tres dominios y en rojo se hace alusión a la secuencia de localización nuclear (NLS) del dominio bisagra, así como la posible extensión del mismo. Tomado de [22].

La proteína E2 interactúa con la proteína Brd4 ayudando a la correcta segregación del genoma viral [23], [24]. Además junto con la proteína viral E1, E2 es la encargada de la replicación viral [22]. Una vez replicado el genoma, E2 asegura la correcta segregación del mismo a las células hijas de la hospedera, lo cual logra al interactuar con proteínas celulares como Mklp2 [25].

Las diferencias funcionales entre las proteínas E2 de los virus de alto y bajo riesgo son debidas en gran parte a las interacciones que llevan a cabo con

proteínas celulares [20], principalmente debido a su localización celular. . Las proteínas E2 de los VPH de alto riesgo se localizan tanto en citoplasma como en núcleo, mientras que las proteínas E2 de los VPH de bajo riesgo son de localización nuclear únicamente [26]. Esto es debido a que las proteínas de los virus de alto riesgo cuentan únicamente con una secuencia de localización nuclear (NLS) en el DBD y una de exporte (NES) en el TAD, mientras que las proteínas de virus de bajo riesgo cuentan con tres NLS, una en cada dominio, además de que carecen de NES [26]. Dentro de las tres NLS de las proteínas del virus de bajo riesgo, se ha identificado que la secuencia más fuerte es la de la región bisagra [27], la cual se marca en rojo en la figura 3. Se sabe que debido a su localización citoplasmática la proteína E2 de alto riesgo es capaz de interactuar con la caspasa 8, provocando apoptosis [26].

Sin embargo, a pesar de que ambas proteínas pueden localizarse en el núcleo, siendo su función principal la de actuar como un factor transcripcional, es en éste compartimento celular donde se destacan sus principales diferencias. Entre estas se encuentra su diferente capacidad de interacción con p53, ya que mientras las proteínas E2 de virus de alto riesgo interactúan fuertemente con ella e inducen apoptosis a través de esta vía, las proteínas E2 de los virus de bajo riesgo no pueden realizar esta actividad [21]. La actividad como regulador transcripcional también varía según el tipo de VPH del que se trate [19].

La proteína E2 de los virus de alto riesgo interactúa con diversos factores transcripcionales como CBP [28] y TAF1 [29] y altera la transcripción celular, afectando la expresión de algunos genes celulares implicados en apoptosis, proliferación celular y diferenciación [30] .

E2 de VPH 16 promueve la diferenciación de la línea celular HaCaT.

Se ha demostrado que la línea celular HaCaT que proviene de queratinocitos inmortalizados, tiene la capacidad de diferenciarse en cultivo *in vitro* [31], lo cual la hace un excelente modelo de estudio, ya que al tratarse de una línea de origen epitelial carente de VPH, ya sea de forma episomal o integrada, es posible estudiar el efecto que provocan en ellas cada una de las proteínas virales, sin el efecto de las demás proteínas codificadas por el genoma viral, o bien hacer comparaciones sobre los efectos provocados por los genomas de diferentes VPH bajo las mismas condiciones de estudio, como ha sido reportado en Kaczkowski [9] y Dreher [10].

Ya que la línea celular HaCaT representa un buen modelo de estudio para la diferenciación epitelial, en 2010 se reportó que la expresión de E2 de VPH-16 en estas células induce un incremento en los niveles de marcadores de diferenciación como son las citoqueratinas 1 y 10, involucrina y filagrina [32]; los cuales son marcadores de diferenciación epitelial. En la figura 4, se observan las inmunocitoquímicas en donde se demuestra el incremento en la expresión de los diversos marcadores de diferenciación en el cultivo heterogéneo.

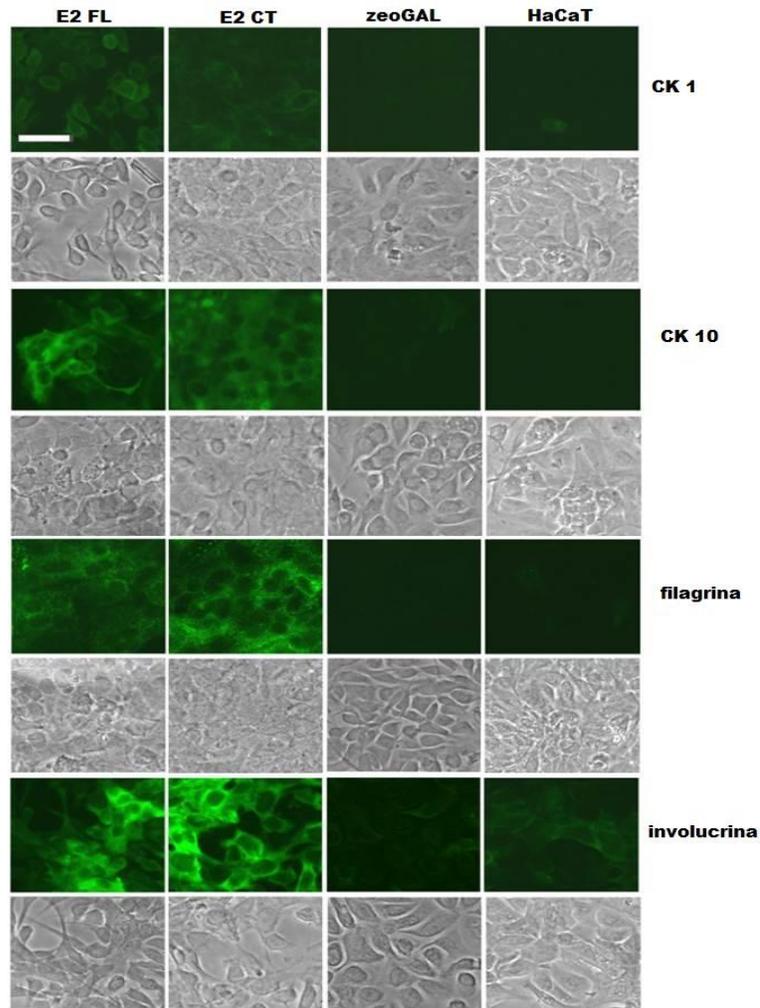


Figura 4. Efecto de E2 completa y únicamente el DBD en la línea celular HaCaT. Se observa un incremento de los cuatro diferentes marcadores de diferenciación en presencia de E2 y DBD; citoqueratina 1 (CK 1), citoqueratina 10 (CK 10), filagrina e involucrina. Tomado de [32].

Como ya se ha dicho, estos virus tienen tropismo por el epitelio y dada su íntima relación entre su ciclo replicativo y la diferenciación del tejido epitelial, es importante conocer a detalle dicho tejido.

Epitelio

El epitelio es un tejido que se encuentra estratificado; compuesto de una capa basal y una capa suprabasal; ésta última se divide en estrato córneo, capa espinosa y capa granular. Dado que este tejido se encuentra estratificado, existe un patrón diferencial de expresión de proteínas, en

especial de las queratinas que son las proteínas más abundantes en el epitelio [33]. En la tabla 2 se muestran algunas de las características de las capas epiteliales.

Tabla 2. Características de las capas epiteliales.

		Características	Queratinas
Capas suprabasales	Estrato córneo	Células muertas y queratinizadas. Capa más superficial.	
	Capa granular	Síntesis de filagrina, la cual agrupa a los filamentos de queratina en agregados más grandes los cuales le confieren protección contra ataques proteolíticos y la vuelven una capa rígida. La adhesión celular está dada por lípidos intercelulares.	Queratina 1 y 10
	Capa espinosa	Las uniones intercelulares, son dependientes de calcio y son muy estrechas	
Capa basal	Capa basal	Los filamentos de queratina son dispersos, sin embargo las uniones intercelulares son muy estrechas y estables.	Queratina 5 y 14

Dada la diferencia en expresión proteica por las células del epitelio según su estado de diferenciación, no todas son blanco de infección por VPH y como ya se ha mencionado la infección viral sucede en células de la capa basal [34].

La capa basal del epitelio se encuentra compuesta de tres subpoblaciones celulares: células de diferenciación temprana (DT), células de amplificación transitoria (TA) y células madre epiteliales (ESC) [35]. Las células TA son las que soportan todo el recambio normal de la epidermis, sin embargo en las ocasiones en que se presenta una herida en el epitelio, las células madre (ESC) salen de su estado de quiescencia para dividirse asimétricamente y poder regenerar el epitelio [36]. Se ha observado que al ser aisladas tanto las TA como las ESC, son capaces de iniciar la regeneración de tejidos; sin

embargo, las ESC son capaces de regenerarlo completamente, mientras que las TA no dan lugar a una diferenciación completa [37].

Mientras que las células localizadas en los estratos de la capa suprabasal no son proliferativas y presentan menor adhesión, las células de la capa basal se encuentran adheridas a la lámina basal, por lo que la expresión de diversas moléculas de adhesión y receptores sucede en ellas y varía según el estado de diferenciación de cada subpoblación de la misma [35], [38]. Es por esto que se han empleado este tipo de moléculas de adhesión y receptores para poder identificar y separar a las diferentes poblaciones celulares epiteliales. Uno de los más reportados es la integrina $\alpha 6$, la cual se sabe que es expresada en grandes cantidades por las células TA y ESC [35], [37], [39].

Como ya se ha mencionado no todas las células epiteliales son blanco de infección por VPH y se sabe que la infección viral debe darse en células de la capa basal [34]. Sin embargo, se desconoce si existen diferencias en el desarrollo de una neoplasia o una infección efectiva si la infección sucede en una célula TA o en una célula madre epitelial. Existe la teoría de que las células madre son el agente iniciador de diversas neoplasias [40], e incluso en la actualidad se reconoce que diversas líneas celulares provenientes de muestras tumorales poseen una población con características de troncalidad [41], [42]; la teoría se soporta entre otras evidencias, en el hecho de que las células madre, al poseer un mayor tiempo de vida media, son capaces de acumular diversas mutaciones que podrían dar como resultado el desarrollo de la neoplasia.

Además se sabe que en muestras tumorales no todas las células aisladas son capaces de generar una masa tumoral, ya que sólo una pequeña población posee dicha capacidad. Interesantemente dentro de las que poseen esta capacidad se encuentran aquellas que expresan marcadores de troncalidad [42].

Marcadores de superficie de las subpoblaciones de la capa basal

Como ya se mencionó se han empleado marcadores de superficie para identificar y separar a las subpoblaciones de la capa basal epitelial, entre ellos se encuentran el par $\alpha 6$ integrina/MHC-I. El patrón de expresión $\alpha 6^+/\text{MHC-I}^-$ se presenta en células con características de troncales, mientras que en células con mayor proliferación (TA) se identifican como $\alpha 6^+/\text{MHC}^+$ [43]. Otra molécula de adhesión empleada es la Desmogleina 3 (Dsg3); para dicha proteína se ha descrito que el fenotipo Dsg3 disminuida (Dsg3^{dim}) corresponde a células con potencial de troncalidad [44], [45]. Otro par de marcadores empleado con frecuencia es $\alpha 6$ integrina/CD71. En este caso se sabe que las células ESC y TA expresan $\alpha 6$ integrina y que se pueden diferenciar unas de otras por que las primeras no expresan CD71, mientras las últimas si [39].

El uso de los marcadores $\alpha 6$ integrina y CD71, ha permitido identificar en la capa basal del epitelio una población poco abundante $\alpha 6$ integrina^{bri}/CD71^{dim} que tiene características de multipotencialidad y que son capaces de regenerar en su totalidad un tejido; la subpoblación $\alpha 6$ integrina^{bri}/CD71^{bri} también posee esta capacidad, pero no lo hace de manera completa. A su vez se ha observado que una subpoblación $\alpha 6$ integrina^{dim} que se encuentra ya en diferenciación temprana y no es capaz de regenerar un tejido [35]. El análisis del transcriptoma de estas subpoblaciones celulares ha demostrado diferencias que corresponden a diferentes estadios de diferenciación del tejido [37].

En la figura 5, se muestra un esquema de la capa basal en donde se hace alusión a los marcadores de superficie y expresión de citoqueratinas de las diversas subpoblaciones celulares que residen en dicha capa.

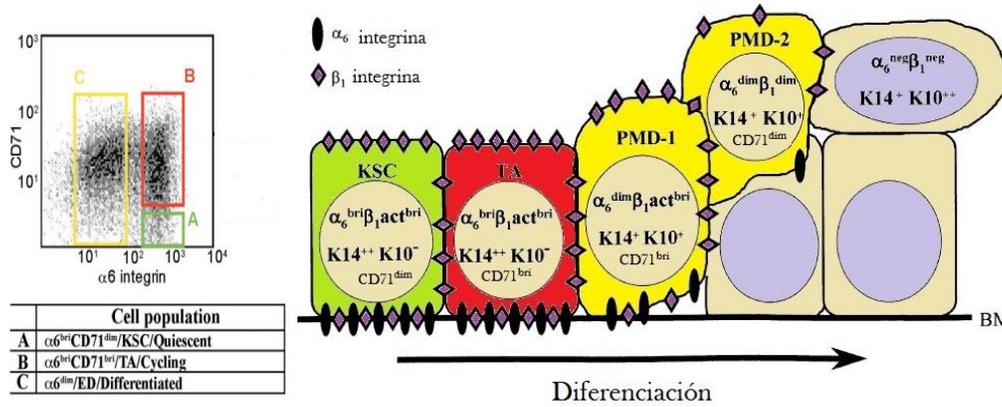


Figura 5. Esquema de diferenciación en la capa basal y los diversos marcadores en las diferentes subpoblaciones celulares. Se muestra Dot Plot para los marcadores de superficie CD71 y α_6 integrina de células de la capa basal (izquierda) y se correlaciona con el esquema de diferenciación en la capa basal (derecha) en donde se muestran otros marcadores de diferenciación como las citoqueratinas.

Aunque se sabe que la proteína E2 de VPH-16 es capaz de inducir diferenciación en un cultivo heterogéneo de la línea celular HaCaT [32], se desconocen sus efectos de diferenciación sobre las diferentes subpoblaciones componentes de la capa basal, la cual recordemos es el sitio blanco de infección del VPH. Es por esta razón, que en el equipo de trabajo se ha iniciado el estudio de los efectos de la expresión de estas proteínas virales sobre las subpoblaciones componentes de la línea celular HaCaT.

Antecedentes

Efecto de la proteína E2 de VPH-16 en la diferenciación de las células de la capa basal.

En nuestro grupo de trabajo, Domínguez-Catzín caracterizó el perfil de subpoblaciones celulares presentes en la línea celular HaCaT en base a los niveles de expresión de los marcadores $\alpha 6$ integrina y CD71 [46], estableciéndose el mismo patrón de tres subpoblaciones reportado para un cultivo primario de queratinocitos [35], [37].

Estas tres subpoblaciones son: Células epiteliales troncales ($\alpha 6$ integrina^{bri}/CD71^{dim}), Células transitoriamente amplificadas ($\alpha 6$ integrina^{bri}/CD71^{bri}) y células diferenciadas tempranas ($\alpha 6$ integrina^{dim}/CD71+), como se observa en la figura 6A. Además para hacer la correlación entre el fenotipo y el estado de diferenciación, se realizaron ensayos de formación de clonas, determinación de los niveles de expresión de marcadores de troncalidad y enriquecimiento de cada subpoblación, lo cual permitió por un lado, confirmar que cada subpoblación componente, se encuentra en un distinto grado de diferenciación, y por otro, confirmar que las células con inmunofenotipo $\alpha 6$ integrina^{bri}/CD71^{dim}, poseen capacidad de auto-renovación y de diferenciación en las otras dos subpoblaciones [46]. Estos marcadores han sido también empleados por otros grupos para separar células de la capa basal de otros tipos epiteliales, respetando siempre el patrón de expresión con el de diferenciación [47], [48].

Por otro lado, nuestro grupo de investigación también ha analizado el efecto de la expresión de la proteína E2 de VPH16 en el cultivo de células HaCaT, y hemos observado (figura 6D) que aún permite la detección de las tres subpoblaciones en el cultivo, pero que de manera interesante sus proporciones se modifican [46]. La expresión de E2 de VPH16 induce un

incremento en las subpoblaciones más diferenciadas, observando además una disminución en la población de células troncales. Un aspecto notable en este efecto es que el patrón de subpoblaciones celulares observado es muy semejante al patrón observado al diferenciar a las células mediante un estímulo con Calcio (CaCl_2)(Figura 6 E).

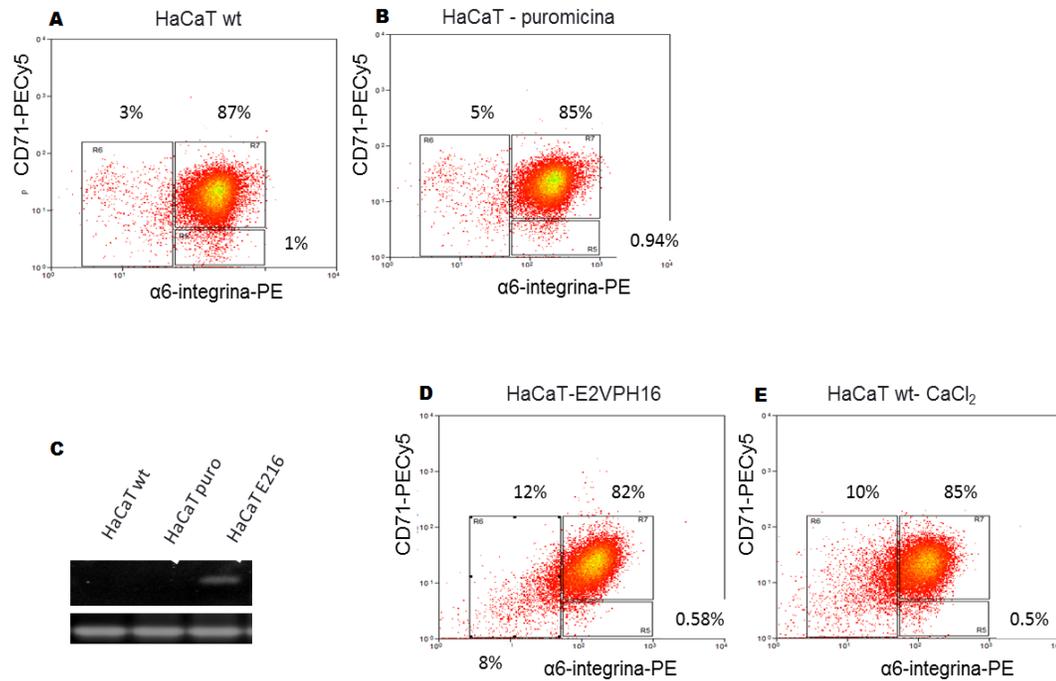


Figura 6. Efecto de la expresión de E2 de VPH-16 sobre la abundancia relativa de las diversas subpoblaciones celulares ($\alpha 6$ integrina⁺/CD71⁺) de la línea celular HaCaT. Se observa que la línea celular HaCaT posee las tres subpoblaciones con los marcadores $\alpha 6$ integrina/CD71 (A), se observa que el porcentaje de estas poblaciones no cambia en el control de transducción (B). En C se observa la expresión de la proteína E2 de las células transducidas con el mismo gen. Efecto de la proteína E2 en la abundancia relativa de las tres subpoblaciones (D), abundancia relativa de las tres subpoblaciones al inducir diferenciación con cloruro de calcio (E).

Aunque se comienza a dilucidar el papel que la proteína E2 de los VPHs de alto riesgo puede jugar en la diferenciación de las células epiteliales, existen pocos trabajos que permitan conocer el efecto que la expresión de E2 de los papilomavirus de bajo riesgo.

E2 de VPH-16 altera la unión del factor transcripcional TAF-1 a promotores celulares de genes de diferenciación y proliferación.

Como ya se ha mencionado, al expresar la proteína E2 de VPH-16 se han observado alteraciones en la abundancia relativa de transcritos de proliferación y diferenciación celular [30].

En nuestro equipo de trabajo, se demostró que esta alteración puede ser debida en parte a la interacción que sucede entre la proteína E2 de VPH-16 con el factor transcripcional TAF1 [29], ya que al expresarse la proteína E2 se observa una alteración de la unión de TAF1 a los promotores celulares, dando como resultado una alteración en la transcripción de dichos genes [49].

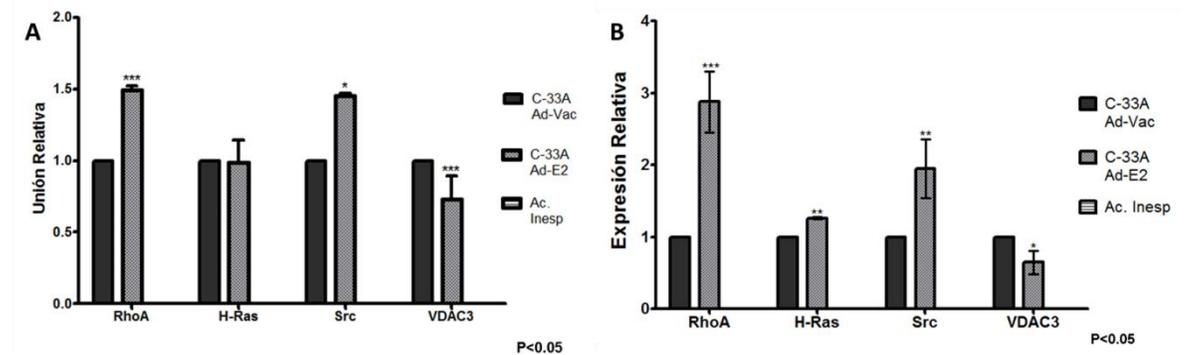


Figura 7. Efecto de E2 sobre promotores celulares. Se muestra el efecto que tiene la expresión de E2 de VPH-16 sobre la unión de TAF1 a promotores de ciertos genes celulares (A) y el cambio en la expresión de dichos genes al expresarse la proteína E2 de VPH-16 (B). Tomado de [49].

Algunos de los genes que son afectados por la expresión de E2 mediante esta interacción con TAF1, están implicados en la diferenciación, como es el caso de los genes RhoA y Src. El papel que juegan tanto Src como RhoA en el proceso de diferenciación epitelial es bien conocido [50], y el incremento en la expresión del primero de ellos (Src) se ha asociado con procesos de hiperproliferación que dan lugar a enfermedades epiteliales [51].

La expresión de E2 de VPH16 indujo un aumento en la unión de TAF1 a estos promotores (figura 7A) que se ve reflejado también en un incremento en su transcripción (Figura 7B).

Justificación

Es bien sabido que la capacidad de la proteína E2 para interactuar con proteínas celulares varía dependiendo del tipo de papilomavirus. Sin embargo dada la relación del ciclo viral con la diferenciación epitelial, es probable que, la proteína E2 sea capaz de inducir diferenciación celular, independientemente del tipo de VPH del que se trate.

Considerando la escasez de datos sobre los efectos de la expresión de la proteína E2 de los VPHs de bajo riesgo en este proceso celular, es importante comenzar a estudiar de manera comparativa las modificaciones en el proceso de diferenciación que provocan una proteína E2 de VPH de alto riesgo (VPH-16) y una de bajo riesgo (VPH-11) al ser expresadas bajo las mismas condiciones de estudio.

Hipótesis

La proteína E2 de VPH-11 afectará los procesos de diferenciación y autorenovación de las subpoblaciones de la línea celular HaCaT.

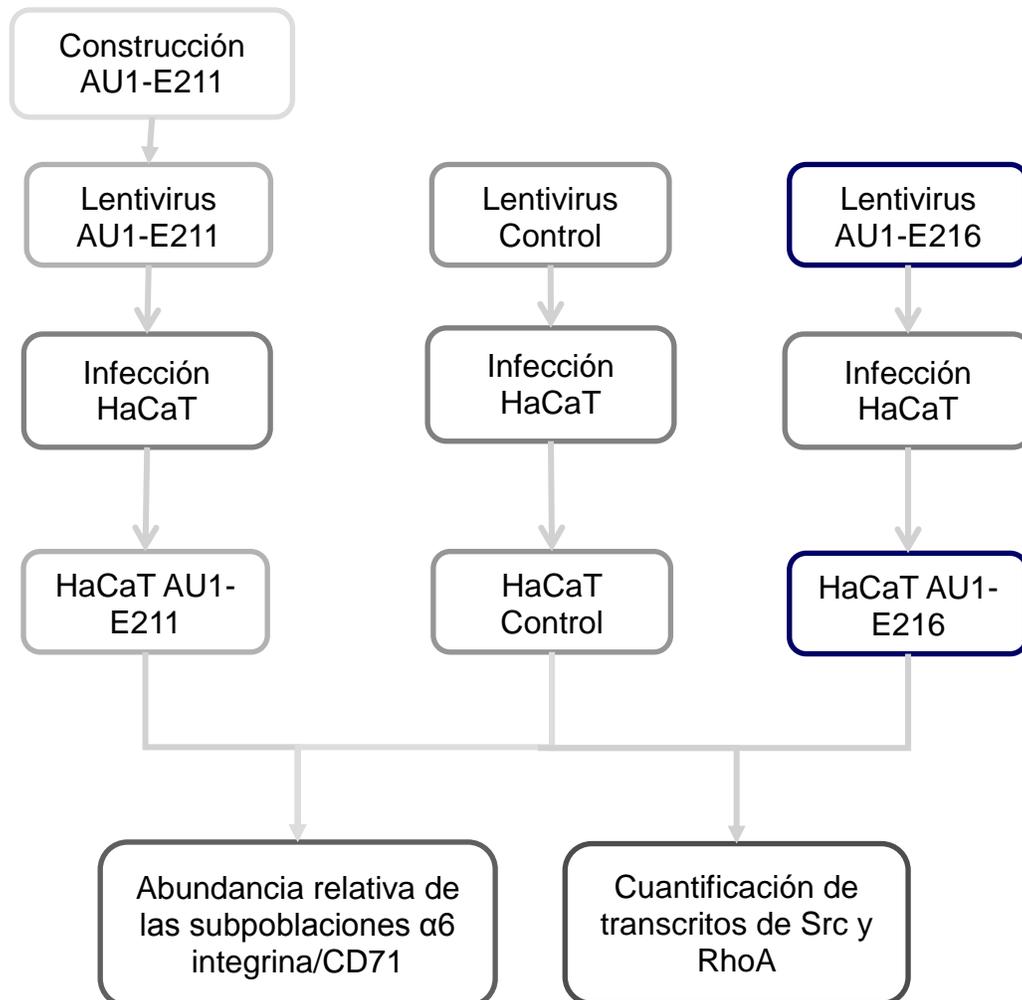
Objetivo general

Evaluar el efecto de la proteína E2 de VPH-11 en las subpoblaciones de la línea celular HaCaT.

Objetivos particulares

- Expresar la proteína E2 de VPH-11 a través de un sistema lentiviral, en la línea celular de queratinocitos inmortalizados HaCaT (HaCaT-E211).
- Determinar la abundancia relativa de las subpoblaciones celulares en la línea celular HaCaT-E211.
- Determinar la abundancia relativa de transcritos de genes implicados en los procesos de diferenciación y/o proliferación de la línea celular HaCaT-E211

Estrategia experimental



Metodología

Líneas y cultivos celulares

Durante la realización de este trabajo, se emplearon dos líneas celulares, HEK-293FT y HaCaT.

La línea celular HaCaT proviene de queratinocitos humanos inmortalizados, y fue cultivada en medio DMEM alto en glucosa (Sigma) suplementado con 2 mM de L-Glutamina, 0.5 mM de Piruvato de sodio, Penicilina 25 U/mL, Estreptomicina 25 µL/mL y 10 % suero fetal bovino (SFB). Las células se incubaron a 37°C con 5% CO₂.

La línea celular HEK-293FT proviene de células de riñón de embrión humano, es una clona de rápido crecimiento, y fue cultivada en medio DMEM (Gibco) suplementado con 4 mM de L-Glutamina, 1 mM de Piruvato de sodio, Penicilina 50 U/mL, Estreptomicina 50 µL/mL y 10% Suero de Neonato Bovino (SNB). Las células se incubaron a 37°C con 5% CO₂.

Clonación del transgen E2-11 en el plásmido de expresión pSin-EF2-pur

El transgen E2-11 fue clonado adicionando una bandera (AU1), para su localización a nivel proteico. Dicha bandera consta de 6 aminoácidos (DTYRYI) en el extremo amino. El molde del que se partió ya contenía la secuencia AU1 (pGEMT-E211AU1).

PCR con enzima de alta fidelidad Pfx y purificación del amplicón

Se realizó la amplificación del DNA molde con la enzima de alta fidelidad Platinum Pfx de Invitrogen. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: Buffer de Amplificación 1x, Buffer Potenciador 0.5x, MgCl₂ 1.25

mM, dNTP's 1.2mM, Oligonucleótidos E211KAU1Fw 0.8 μ m, Oligonucleótidos E211KAU1Rv 0.8 μ m, DNA templado 70 ng. En la tabla 3 se enlistan los oligonucleótidos utilizados durante la realización de éste trabajo, así como la secuencia de los mismos y el tamaño de los amplicones esperados.

Tabla 3. Lista de oligos empleados. Se muestra tanto el nombre, secuencia y tamaño del amplicón.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Tamaño del amplicón (nt)
E211KAU1Fw	TCAGAATTCATTGCCACCATGGACACC	1150
E211KAU1Rv	GTCATTACATTTATTGTAAGGATCCCGAA	
RTActinaFw	GCGGGAAATCGTGCGTGACATT	250
RTActinaRv	GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG	
RTRhoAFw	GTCAAGCATTCTGTCCCAA	203
RTRhoARv	ACCTCTCTCACTCCATCTTT	
RTSrcFw	TTCTACATCACCTCCCGCA	215
RTSrcRv	ATCCACACCTCGCCAAAG	
RTE211Fw	ATGGAAGCAATAGCCAAGC	180
RTE211Rv	TGGTACTACTTGTAACCCGA	
RTE216Fw	TTGGGGATCCGTGTTTAGCAGCAACGAACTAT	200
RTE216Rv	ATCCGAATTCTCAGTTAATCCGTCCTTTGTGTGAGC T	
pSinFw	TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC	
LacZFw	GAGAGAATTCATGGACACCTATCGCTATATAGTCGT TTTACAACGTCGTGACT	300
LacZRv	GAGAGGATCCTTAGTGCATCTGCCAGTTTGAGG	

Las condiciones de amplificación fueron las mencionadas en la figura 8. El oligonucleótido sentido utilizado para la PCR contiene la secuencia de reconocimiento para la enzima EcoRI, mientras que el oligonucleótido anti-

sentido contiene la secuencia para la enzima BamHI, lo que permitió la clonación del amplicón en el vector pSin-EF2-pur.

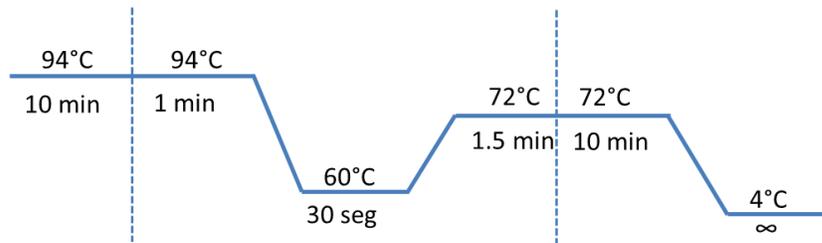


Figura 8. Condiciones de amplificación del transgen E2-11AU1. Se muestran las condiciones de desnaturalización, hibridación y amplificación empleadas para el transgen E2-11AU1. Se realizaron 35 ciclos de amplificación.

Se procedió a observar el producto de la reacción migrando electroforéticamente un 10% de la reacción en un gel de agarosa al 1% el cual fue teñido con Bromuro de Etidio (0.001 %). El amplicón se visualizó en el gel con ayuda del transiluminador Gel Doc 1000 de Bio-Rad, se cortó la banda del amplicón esperado (1150 nt), y se procedió a purificarlo empleando el Kit Wizard SV gel and PCR clean-up (Promega).

Restricción doble con BamHI y EcoRI y ligación.

Una vez purificado se realizó una restricción doble, con las enzimas EcoRI (Thermo Scientific) y BamHI (Thermo Scientific), empleando Buffer BamHI 1x, BamHI 1 unidad, EcoRI 2 unidades, DNA 700 ng, incubadas a 37°C por una hora (h). Posteriormente se realizó la reacción de ligación en el vector pSin-EF2-pur linearizado y previamente defosforilado, empleando 1 µL de enzima fosfatasa alcalina por 70 ng de plásmido, se incubó por 2 h a 37°C; pasado el tiempo de incubación se inactivó por 20 min a 65°C. La ligación se realizó empleando la T4 ligasa de Promega, en una relación 3:1 (inserto:vector), 200 ng de vector y 88 ng de inserto. Buffer T4 ligasa 1X, T4 ligasa 1 unidad, en un volumen final de 15 µL; se incubó a temperatura (T) ambiente toda la noche.

Transformación de bacterias quimiocompetentes DH5α

Con el producto de ligación se realizó la transformación de Bacterias quimiocompetentes DH5α por choque térmico empleando el siguiente protocolo: a 200 µL de células competentes se les adicionó 5 µL del producto de ligación y se incubaron por 30 min a 4°C. Pasado el tiempo, se dió un choque térmico de 90 seg a 42°C, se pasaron a 4°C y se incubaron por 2 min. Se adicionaron 800 µL de medio SOC y se incubaron a 37°C por 1 h en agitación a 200 rpm. Pasado el periodo de incubación se plaquearon 100 µL en medio LB + ampicilina (100 µg/mL). El resto del cultivo se centrifugó a 2,500 rpm por tres minutos, se decantó el sobrenadante y se re-suspendió en el volumen restante. El volumen total se plaqueó en cajas LB + ampicilina (100 µg/mL). Las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

Caracterización de los plásmidos

De las colonias observadas en las placas, se realizó una reacción de PCR por grupos de colonias candidatas con las mismas condiciones que se muestran en la figura 8. Se empleó la enzima GoTaq (Promega), empleando las siguientes concentraciones finales: Buffer 1X, MgCl₂ 1.5mM, dNTP's 0.4 mM, Oligos 0.4 mM cada uno, enzima 1 unidad por reacción, H₂O cbp 25 µL.

De las colonias positivas para la PCR, se realizó un cultivo líquido de 3 mL de LB+ ampicilina (100 µg/mL), el cultivo se incubó por 16 h a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se realizó la purificación de plásmidos por lisis alcalina. El cultivo se empastilló (2,500 rpm por 10 min) y se resuspendió en 300 µL de Buffer de resuspensión (Tris-HCl 50mM pH=8.0, EDTA 10 mM, 100 µg/mL RNasa A). Se transfirió a un tubo de microfuga de 1.5 mL y se añadieron 300 µL de Buffer de Lisis (NaOH 200 mM, SDS 1%), se incubó 5 min a T ambiente. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron 300 µL de Solución Neutralizadora (Acetato de potasio 3 M pH=5.0) y se incubaron a 4°C por 20 min. Posteriormente se centrifugó por 30 min a 12,500 rpm. El sobrenadante se recuperó y se le agregó 1 volumen (vol) de Polietilenglicol (PEG), se incubó 10 min a T ambiente. Se centrifugó durante 3 min a 12,500

rpm. La pastilla se re-suspendió en 100 μ L de H₂O desionizada estéril y se procedió a realizar la purificación por el método Fenol-Cloroformo.

Una vez purificados por el método fenol-cloroformo, los plásmidos se cuantificaron en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se realizó una restricción con la enzima Eco81I (Thermo Scientific). El vector pSin posee un sitio de corte para esta enzima, mientras que el inserto posee otro, , lo que permitió verificar que los plásmidos de las colonias positivas para la PCR contuvieran el inserto. Se colocaron 700 ng de DNA, 1 unidad de enzima, Buffer Tango 1x, se incubó a 37°C toda la noche y al día siguiente se migró electroforéticamente un 10% de la reacción en un gel de agarosa al 1.5% para verificar el patrón de restricción.

Los plásmidos cuyo patrón de restricción con ésta enzima mostró dos fragmentos, fueron secuenciados (MACROGEN), empleando los oligonucleótidos pSin Fw y E211KAU1Rv, cuya secuencia se muestra en la tabla 3.

Obtenidas las secuencias, se alinearon con la secuencia esperada. Verificando de ésta manera la secuencia del transgen, se emplearon los programas Ridom Trace Edit y Geneious. Verificada la integridad de las secuencias se procedió a la producción y purificación de plásmido pSin-EF2-E211-pur para la producción de las partículas lentivirales.

Se seleccionó una de las colonias (colonia 15A) para iniciarr un cultivo de 200 mL de LB+Ampicilina, bajo las condiciones previamente descritas y realizar la purificación del DNA plasmídico empleando el método de maxipreparación de plásmido y su purificación mediante columnas de intercambio iónico de QIAGEN Plasmid Maxi Kit, siguiendo el protocolo que indica el proveedor.

Producción de partículas lentivirales E2-11 y E2-16

Una vez purificado el plásmido pSin-EF2-E211-pur, se procedió a la producción de partículas lentivirales empleando a la línea celular empaquetadora HEK293FT. Se realizó una co-transfección de los siguientes plásmidos: plásmido de empaquetamiento (psPAX2), envoltura (pMD2.G) y transgen (pSin-E211, pSin-E216, pSin-LacZ α) en una relación 1:1.5:2.

Se sembraron 5×10^6 células HEK293FT en placas p-100 (Corning), 24 horas antes de la transfección. El día de la transfección se cambió el medio de las células por medio OPTIMEM (Gibco), en el cuál se llevó a cabo la transfección.

Se colocaron los plásmidos con 1.5 mL de OPTIMEM (Tubo A) y por otro lado 42 μ L de Lipofectamina (Lifetechnologies) con 1.5 mL de OPTIMEM (Tubo B), se dejaron incubar por 15 minutos a T ambiente. Transcurrido el tiempo se transfirió el contenido del tubo A al tubo B y se incubó por 45 minutos. Al finalizar el periodo de incubación, la mezcla se colocó en las cajas de cultivo y se adicionaron 2 mL de OPTIMEM por caja. Las cajas se incubaron a 37°C con 5% CO₂.

Transcurridas 12 h, se cambió el medio de las células por medio DMEM (Gibco), se adicionó Butirato de Sodio 4mM y se incubaron bajo las mismas condiciones por 24 h.

Transcurridas 24 h se procedió a realizar la cosecha de las partículas virales. Se recolectaron los sobrenadantes de las cajas de cultivo en tubos de fondo cónico de 15 mL (Axygen), se centrifugaron a 500 g por 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se filtraron por una membrana de 0.45 μ m (Millipore) y se recibieron en tubos de ultracentrífuga de polialómero de pared delgada (Beckman Coulter).

Concentración de partículas virales

Se realizó la concentración de las partículas virales mediante ultracentrifugación de 2 h, 4°C y 25,000 rpm. Finalizada la corrida, el

sobrenadante se decantó y se adicionaron 30 μL de PBS+0.1 % albúmina sérica bovina (BSA) por cada tubo de ultracentrífuga utilizado. Los tubos fueron almacenados a 4°C por 24 h. Pasado el tiempo se hicieron alícuotas de 10 μL y se realizó la titulación de las partículas virales.

Titulación de partículas virales

Para la titulación de las partículas virales se sembraron 6000 células/cm² HaCaT en placas de seis pozos. Después de 24 h de incubación se procedió a cambiar el medio a las células e incubarlas con diluciones virales, las cuales fueron preparadas como se presentan en la figura 9; a cada pozo se le adicionó Polybrene a una concentración final de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La infección fue retirada 24 h después y se realizó el cambio de medio. La selección con 0.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puomicina se realizó a los 2, 4, 6 y 8 días post-infección. El día 11 post-infección, los pozos fueron teñidos con 1 mL de colorante cristal violeta 1% en Etanol al 70%, por 10 min a T ambiente. Transcurrido el periodo de incubación, se realizaron tres lavados con PBS 1x y un lavado final con agua bidestilada estéril. Se realizó el conteo de colonias en las diluciones más altas.

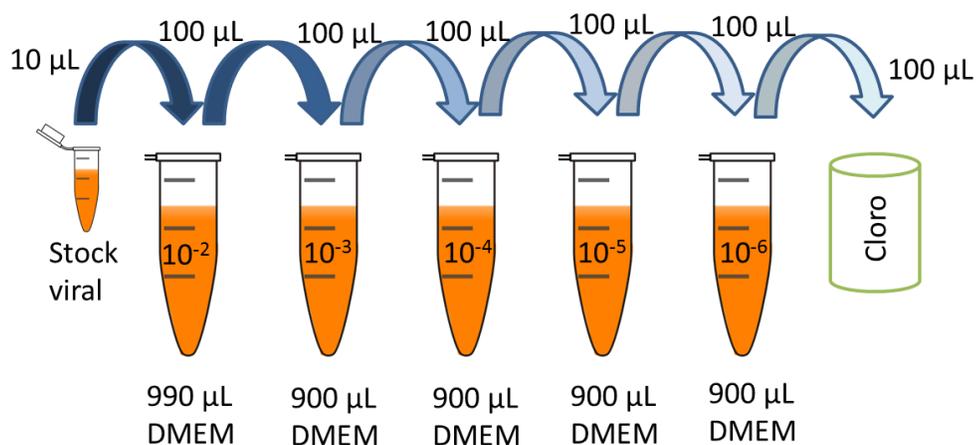


Figura 9. Diluciones para titulación de partículas virales. Se esquematizan las diluciones realizadas para la titulación de partículas virales.

Una vez contado el número de colonias en las dos últimas diluciones, se procedió a determinar el número de partículas virales (unidades de transducción) por mL con la fórmula representada en la ecuación 1.

$$UT_{stock} = \frac{\#colonias}{dilución * Volumen}$$

Ecuación 1. Unidades de transducción. # colonias es el número de colonias contada en la última dilución. Dilución es la dilución viral a partir del stock. Volumen=0.9 mL.

Obtenido en número de unidades de transducción (UT) por mL, se procedió a determinar el volumen de stock viral requerido para infectar la cantidad de células sembradas con una multiplicidad de infección (MDI) de 0.5, en la ecuación 2 se muestra el cálculo empleado.

$$mLdeUT_{stock} = \frac{\#células * MDI}{UT_{stock}} = mLstock$$

Ecuación 2. Unidades de transducción necesarias para infectar células a una MDI de 0.5. # Células es el número de células que se desea infectar. MDI= 0.5. UT_{stock} es el resultado de lo obtenido en la ecuación 1.

Infección de células HaCaT con partículas lentivirales

La línea celular HaCaT, así como las líneas resultantes de las transducciones se mantuvo en medio DMEM alto en glucosa (Sigma) suplementado como previamente se había descrito. Se sembraron 5×10^5 células/cm² 24 h antes de la infección, se procedió a infectar cada caja con una MDI=0.5, se adicionó Polybrene a una concentración final de 8 µg/mL. La infección se retiró a las 24 h y 24 h después de retirada la infección, se comenzó la selección con Puomicina a una concentración final de 0.3 µg/mL.

RNA

Extracción de RNA

Para la extracción de RNA, las células se sembraron en cajas p-100, cuando el cultivo llegó a un 80% de confluencia, se colocó un mL de Trizol directamente sobre la monocapa celular y se raspó con ayuda de un fragmento de hule (gendarme). El mL de Trizol se recuperó en un tubo de microfuga de 1.5 mL. Se adicionaron 200 μ L de cloroformo y se incubó por 10 min a T ambiente, transcurrido el tiempo se centrifugó 15 min a 13,000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 400 μ L de Isopropanol, se incubó a T ambiente por 20 min. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 40 min. Se decantó el contenido y a la pastilla se le adicionó 1 mL de EtOH 70%, se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm por 15 min. La pastilla se dejó secar por 10 min y se re-suspendió en 17 μ L de H₂O desionizada estéril. El RNA se descontaminó de DNA con ayuda del kit RQ1 RNA-DNA free (Promega), empleando las siguientes concentraciones finales: Buffer RQ1 1x, DNase 1 unidad, se incubó 42°C por 45 min, pasado el tiempo se adicionaron 2 μ L de solución de paro y se incubó 15 min a 60°C. Finalmente las muestras se cuantificaron con ayuda del equipo NanoDrop 2000.

RT-PCR

Una vez cuantificado el RNA, se realizó la síntesis de cDNA, empleando las siguientes concentraciones finales de reactivos: 1 μ L de Oligo dT, 2 μ g de RNA y H₂O cbp 5 μ L, se incubó en el termociclador por 5 min a 70°C. Seguida de una incubación a 4°C por 10 min, después de la cual se adicionaron: 5 μ L de Buffer MMLV-RT, 5 μ L dNTP's (2 mM), 1 unidad de MMLV-RT (Promega), 0.6 μ L RNAsin (Promega), H₂O cbp 25 μ L. La reacción se llevó a cabo por 90 min a una T de 42°C.

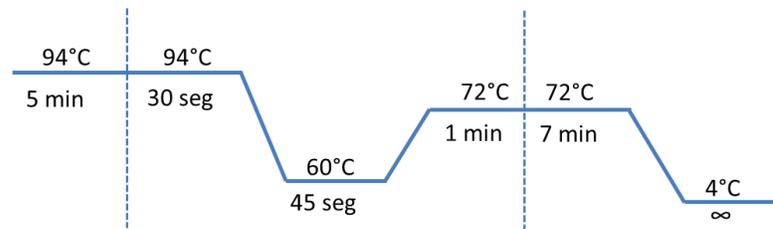


Figura 10. Condiciones de amplificación de los transcritos de estudio. Se muestran las condiciones de desnaturalización, hibridación y amplificación empleadas para los siguientes genes: Actina, E2-11, LacZ α . Los ciclos de amplificación son 30.

Para verificar la pureza del RNA, se realizó un ensayo de PCR para Actina empleando el par de oligonucleótidos RTActinaFw/Rv (Tabla 3) y las mismas concentraciones de reactivos que las especificadas en la PCR de colonia. Debido a que el par de oligonucleótidos se encuentra diseñado entre dos exones, si en la muestra únicamente existiera RNA, ya convertido en cDNA, se generaría un amplicón de 250 pb. Mientras que si en la muestra de RNA se encontraran aún trazas de DNA habría un amplicón de 400 pb. Las condiciones de PCR, se ilustran en la figura 10.

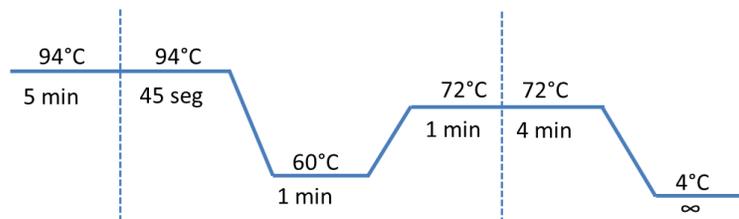


Figura 11. Condiciones de amplificación de los transcritos de E2-16. Se muestran las condiciones de desnaturalización, hibridación y amplificación empleadas para los transcritos de E2-16. Los ciclos de amplificación son 35.

En el caso de las células infectadas con los lentivirus E2-11, E2-16 y Control (LacZ α), se comprobó también la presencia de los mensajeros de los transgenes por PCR en punto final para poder continuar con el análisis del resto de los genes. Las condiciones del programa se muestran en las figuras 10 y 11, las concentraciones finales de reactivos fueron similares a los especificados en la PCR de colonia. En el caso de los transcritos de E2-11 se detectaron con los oligonucleótidos RTE2-11Fw/Rv, los transcritos de E2-16 con los oligonucleótidos RTE2-16Fw/Rv y finalmente para el transgen

control (LacZ α) se emplearon los oligonucleótidos LacZ α Fw/Rv. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados son mostradas en la tabla 3.

PCR cuantitativa (qPCR)

Asegurada la integridad y pureza del RNA, se procedió a realizar la PCR cuantitativa, con ayuda del Kit SYBR-green (Thermo Scientific). Las cantidades empleadas de cada reactivo fueron las siguientes: SYBR-Green 7.5 μ L, Oligonucleótido Fw 0.2 μ L, Oligonucleótido Rv 0.2 μ L, cDNA 1 μ L, se llevaron a un volumen final de 15 μ L con agua incluida en el Kit. Con los pares de oligonucleótidos correspondientes, se determinó el nivel de los transcritos de Actina, Src y RhoA. Todos se detectaron bajo las condiciones que se ilustran en la Figura 12.

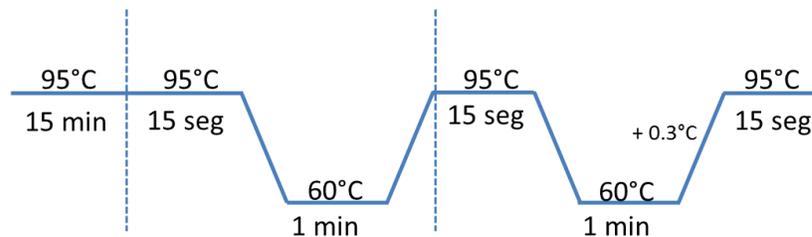


Figura 12. Condiciones empleadas para la PCR cuantitativa. Se muestran las condiciones empleados para la amplificación y determinación de las curvas de disociación para los genes Actina, RhoA y Src.

Proteínas

Extracción

Se realizó la extracción de proteínas de la siguiente manera. Se sembraron las diferentes líneas celulares transducidas en cajas p-100, una vez alcanzada una confluencia del 80% las células se lavaron y se adicionó directamente a la caja 150 μ L de Buffer de Lisis (Buffer RIPA (0.6mM Tris-HCl pH=7.6, 11.25 mM NaCl, 0.05mM EDTA, 1% Tritón X-100, 0.1% SDS, 24 mM Desoxicolato de sodio) + 1X Inhibidores de proteasas) y se cosecharon con ayuda de un gendarme y el contenido fue pasado a un tubo de microfuga de 1.5ml, la suspensión celular se disgregó con ayuda de una jeringa con

aguja de calibre 21 y posteriormente con una de calibre 25 (10 veces con cada aguja). Se incubó una hora con el Buffer para permitir una lisis completa y pasado el tiempo se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm. El lisado se cuantificó con ayuda del kit Dc protein Assay Bio-Rad, la cuantificación se realizó por triplicado en una placa de 96 pozos, se siguió el protocolo de la casa comercial.

Western Blot

Se preparó un gel de poliacrilamida-SDS, Gel Separador 10% (Acrilamida 10%, 0.1% SDS, 0.1% Persulfato de amonio (PSA), 0.1% Tetrametiletilendiamina (TEMED), RGB 4X (Tris base 1.5 M pH=8.8, SDS 0.4%) 2.5 mL) y Gel Concentrador 5% (Acrilamida 5%, 0.1% SDS, 0.1% PSA, 0.2% TEMED, SGB 4X (Tris base 0.5 M pH=8.8., SDS 0.4%) 1.25 mL). Se cargaron 70 µg de cada muestra adicionando Buffer Laemli (Glicerol 40%, SDS 4%, 0.2 M tris base pH=6.8, 4% β-mercaptoetanol). Las muestras fueron migradas electroforéticamente a 25mA por 2 horas en una cámara BioRad. Como Marcador de Peso Molecular se empleó Dual Color (BioRad). Para asegurar una correcta detección de las proteínas con el epítipo AU1 se incorporó un carril en el que se cargó proteína AU1-E211 recombinante obtenida en Bacterias BL21(DE3), el protocolo de inducción se especifica en el anexo 1. Una vez terminada la electroforesis las proteínas fueron electrotransferidas a Nitrocelulosa para realizar en ella la inmunodetección. Tanto la membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) como el gel se equilibraron por 30 min en Buffer de transferencia (Tris-Base 24.26 mM, Glicina 191.2 mM y 20% Metanol), pasado el tiempo, se realizó la transferencia a voltaje (V) constante, 90 V durante 90 min. Se verificó que la transferencia fuera exitosa, así como la integridad de las proteínas al teñir la membrana con Rojo de Ponceau, verificada la integridad de las proteínas, la membrana se destiñó con lavados en Buffer de fosfatos (PBS). La membrana se bloqueó con leche al 10% durante 1 h y se incubó toda la noche a 4°C con anticuerpo anti-AU1 (Covance) 1:3000 en leche al 10%. Se dieron tres lavados de 10 min cada uno con PBS + 0.2% Tween 20 y un último lavado con PBS, se

incubó el anticuerpo secundario anti-mouse acoplado a la enzima peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) 1:5000 en leche 5% por 2 h. Pasado el tiempo de incubación se dieron dos lavados con PBS + 0.2% Tween 20 y un último lavado con PBS.

La membrana se reveló con ayuda del reactivo ECL (Thermo Scientific) con una exposición de 15 min. Las placas fueron revelada y fijadas con los productos de Kodak y fotografiadas en el transiluminador Gel Doc 1000.

Citometría de flujo

Cultivos celulares a un 80% de confluencia fueron tratados con tripsina para recuperar las células. Se contaron con ayuda de azul tripano y una cámara de Neubauer, se colocaron 5×10^5 células por tubo de microfuga de 1.5 mL (cuatro tubos por línea celular), se aforaron a 500 μ L con PBS. Se centrifugaron a 4°C por 5 min a 3000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 mL de Solución de bloqueo (PBS 1x+ 2% BSA+ 2% SFB). Los tubos se incubaron por 15 min a 4°C, pasado el tiempo de incubación se centrifugaron nuevamente por 5 min a 3000 rpm a 4°C. La pastilla se re-suspendió en 100 μ L de solución de marcaje (PBS 1x+ BSA 1%). Se adicionaron los anticuerpos (Beckton Dickinson) como se indica en la tabla 4 y se incubaron los tubos por 45 min a 4 °C agitándolos cada 15 min. Pasado el tiempo de incubación se adicionó un mL de PBS+ (PBS + 1% HEPES) frío a cada tubo y se centrifugaron por 5 min a 3000 rpm, la pastilla se resuspendió en 1 mL de PBS+ y se centrifugaron nuevamente. Finalmente la pastilla se resuspendió en 500 μ L de PBS+ y se transfirieron a tubos de FACS.

Las muestras se leyeron en el citómetro Cyan ADP Analyzer de Beckman Coulter empleando el láser de 488 nm, se leyeron 20 000 eventos y los datos fueron analizados con ayuda del programa Summit 4.3 de Beckman Coulter.

Tabla 4. Anticuerpos

Tubo	Nombre	PE-Cy 5 Mouse Anti-Human CD71	PE Rat Anti-Human CD49f (α 6 integrina)
1	Sin teñir	-	-
2	CD71	0.4 μ L	-
3	α 6 integrina	-	1 μ L
4	Doble	0.4 μ L	1 μ L

Resultados

Clonación pSin-EF2-E211-pur

Para obtener la construcción con la que se trabajó, primeramente se amplificó el transgen de interés (AU1-E211) con la enzima Pfx, a partir del plásmido pGEMT-E211 previamente generado en el grupo de investigación, y se verificó que se hubiese amplificado el fragmento de la longitud esperada como se muestra en la figura 13. Una vez obtenido el producto, se purificó y se realizaron las reacciones de restricción con las enzimas EcoRI y BamHI. Posterior a esto se realizó la reacción de ligación y la transformación de bacterias quimiocompetentes DH5 α . A las colonias bacterianas que crecieron después de la transformación se les realizó una PCR de colonia, por grupos de colonias, como se muestra en la figura 14.

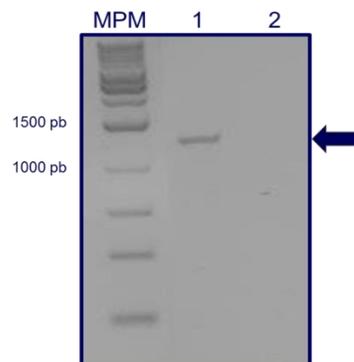


Figura 13. Producto de PCR de E2-11 con Pfx. Se muestra el producto de PCR empleando la enzima Pfx. En el primer carril de izquierda a derecha se muestra el marcador de peso de 1 kb, en el segundo carril el producto de PCR de 1150 nt y en el último carril se muestra el control de reacción (control negativo).

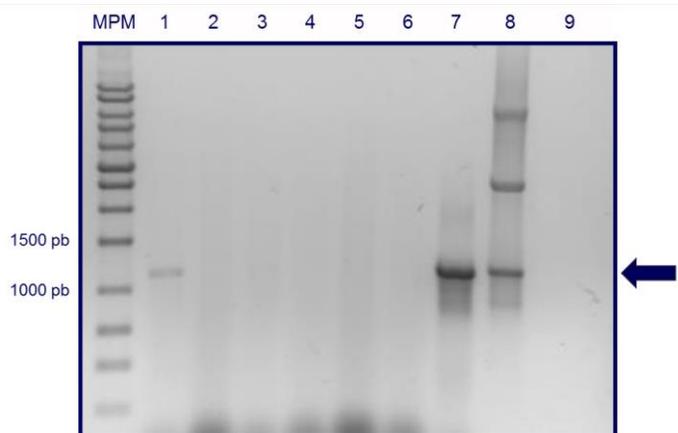


Figura 14. PCR de grupo de colonias. Se muestra el producto de PCR por grupo de colonias, en el primer carril de izquierda a derecha, se muestra el marcador de 1kb, en los carriles 2 y 8 se muestran los grupos de colonias que amplificaron para el transgen E2-11. En el carril 9 se muestra el control positivo el cual consiste en el plásmido pGEMT-E2-11 como templado. En el carril 10 se muestra el control de reacción.

De las colonias que por los criterios anteriores se consideraron positivas se sembró un cultivo líquido de 3 mL, se extrajo el DNA plasmídico y se realizó un ensayo de restricción con la enzima Eco81I. Esta enzima fue seleccionada debido a que la construcción pSin-EF2-E211-pur cuenta con dos sitios de reconocimiento para la misma, ya que posee un sitio dentro del transgen de interés y otro dentro de la secuencia del esqueleto del plásmido. Por lo tanto esta enzima nos permitió distinguir las colonias que tuvieran el plásmido con el inserto de interés y no el plásmido re-ligado, ya que si el plásmido contaba con el transgen se obtendrían dos fragmentos, mientras que si se encontraba re-ligado únicamente se linearizaría el plásmido. Como se muestra en la figura 15, se observan dos colonias candidatas nombradas 15a y 16a, que al restringir el plásmido con Eco81I generan los dos fragmentos esperados.

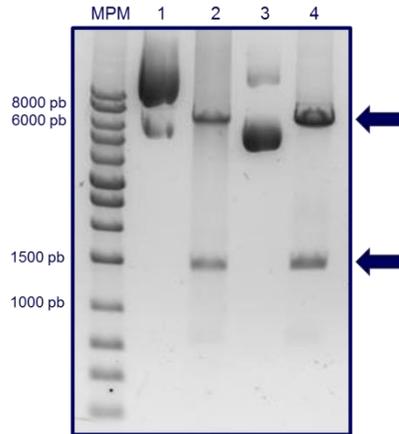


Figura 15. Restricción con Eco81I de las colonias 15 y 16. Se muestra gel de agarosa al 1%, en dónde se observa el plásmido sin restringir de las colonias 15 y 16 en los carriles 2 y 4 respectivamente. En los carriles 3 y 5 se muestran los fragmentos liberados de 1502 nt y 7139 nt al ser restringido el plásmido con Eco81I.

Los plásmidos purificados a partir de estas colonias fueron secuenciados (MACROGEN). Obtenidas las secuencias se alinearon con la secuencia esperada, observándose la integridad de las mismas (Figura 16). Se decidió utilizar la colonia 15a, por lo que se realizó un cultivo de 200 mL y se purificó el DNA plasmídico para utilizarlo en la producción de partículas lentivirales.

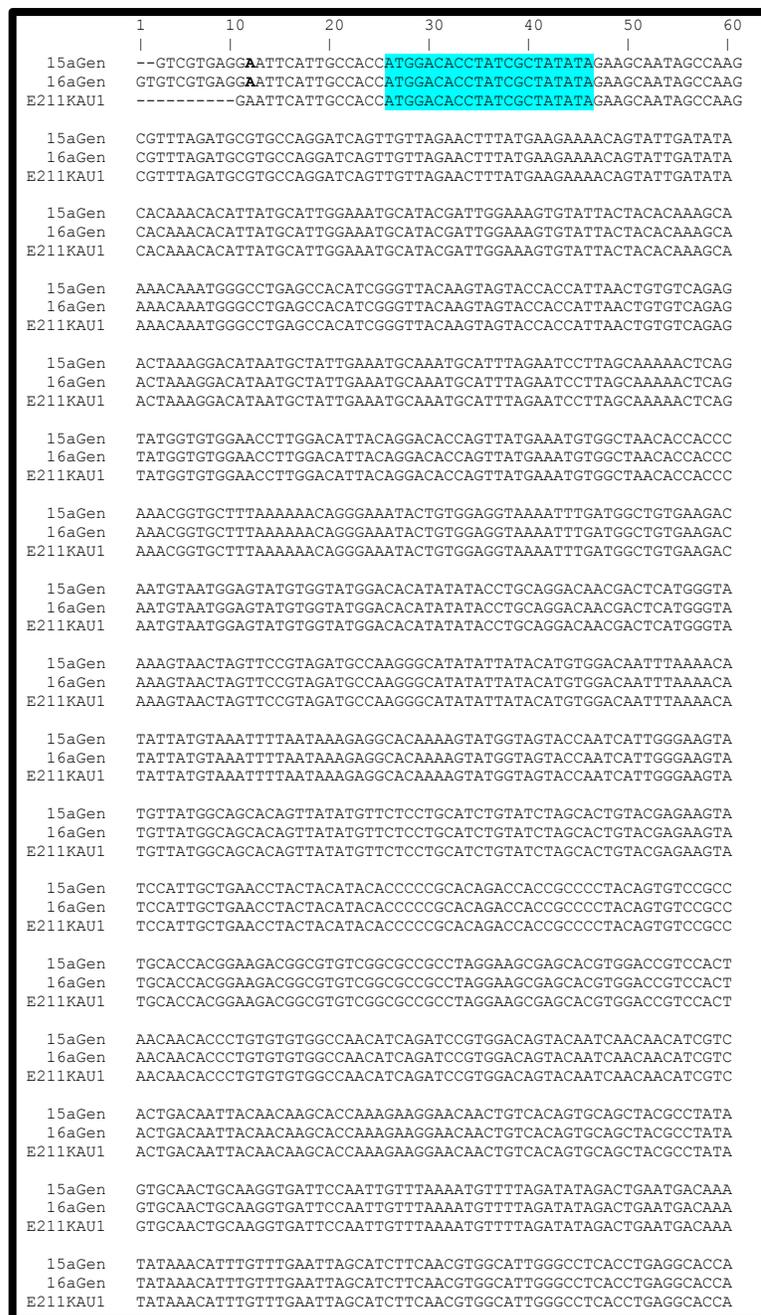


Figura 16. Alineamiento de las secuencias obtenidas de las colonias 15 y 16. Se muestra el alineamiento de las secuencias de las colonias 15 y 16 contra la secuencia teórica. Se muestra la secuencia del epítipo AU1 sombreada con color azul.

Expresión de E2 de VPH-11 en HaCaT empleando un sistema lentiviral

Una vez obtenidas las partículas virales y tituladas, se procedió a infectar a la línea celular HaCaT con una MDI de 0.5 partículas virales por célula. Las células transducidas fueron seleccionadas durante cinco días con Puromicina. Una vez seleccionadas, se realizó tanto la extracción de RNA como de proteínas. Primeramente se verificó que hubiese transcritos del transgen de interés, por lo que se realizó la retrotranscripción y una vez obtenido el cDNA se realizó una PCR para amplificar el gen control (Actina) que nos permitió asegurarnos de que las muestras no estuvieran contaminadas con DNA. Esto se infiere del hecho de que los oligonucleótidos utilizados como cebadores (primers) para amplificar el gen de β -Actina se encuentran en dos exones diferentes, por lo que si la muestra estuviera contaminada con DNA se obtendría un amplicón de 400 nt (amplificando parte de dos exones y un intron), mientras que en el caso de una amplificación exclusiva de cDNA se obtendría un amplicon de 250 nt, ya que no se amplificaría el intron.

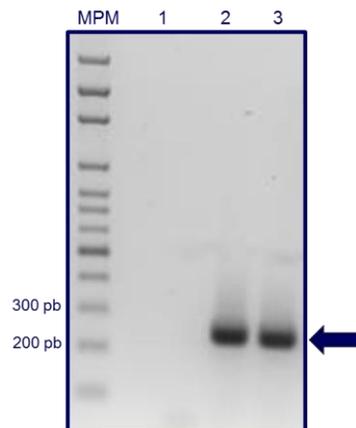


Figura 17. Producto de RT-PCR de Actina. Se muestra el producto de PCR de Actina, previa retro-transcripción. En el primer carril de izquierda a derecha se muestra el marcador de peso molecular de 100pb, en el segundo se muestra el control negativo de reacción. En el tercer y cuarto carril se muestra el amplicón obtenido a partir de RNA de HaCaT y HaCaT-E211, en ambos casos se observa el amplicón esperado de 250 nt.

En la figura 17 se observa un amplicon único de 250 nt tanto en la muestra en la que se utilizó cDNA de HaCaT como en la de HaCaT-E211, lo que indica que las muestras únicamente contienen cDNA (obtenido del RNA) y no existe DNA genómico contaminante. Una vez verificada la integridad del RNA, se procedió a hacer una PCR para amplificar el transgen E211. Como se observa en la figura 18 únicamente se observa el amplicón esperado en HaCaT-E211 y no así en HaCaT.

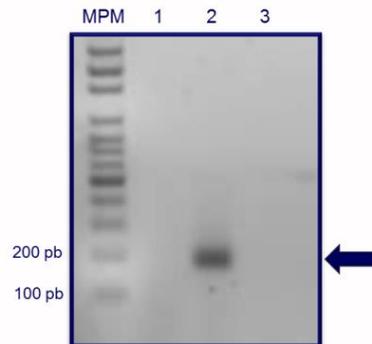


Figura 18. Producto de RT-PCR del transgen E2-11. Se muestra el producto de PCR de E2-11. De izquierda a derecha en el primer carril se muestra el marcador de peso molecular de 100 pb; en el segundo carril se muestra el control negativo obtenido a partir de RNA de HaCaT, en el tercer carril se muestra el amplificado obtenido a partir de RNA de HaCaT E2-11 y en el último carril el control de reacción.

Una vez verificada en la línea celular transducida la presencia de transcritos del gen E2-11 se procedió a verificar la expresión de la proteína, mediante inmunodetección en fase sólida (Western Blot, WB) empleando un anticuerpo que reconociera la secuencia de la bandera AU1. En la figura 19 se observa una banda que corresponde a la proteína E2-11 con el epítopo AU1, la cual únicamente se encuentra presente en los lisados proteicos HaCaT-E211.

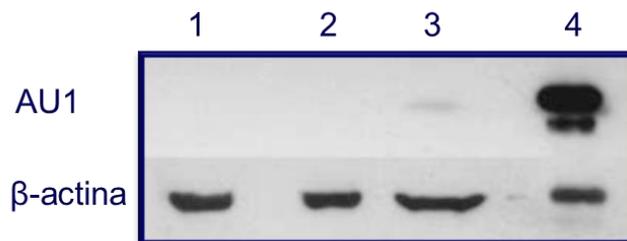


Figura 19. Inmunodetección en fase sólida empleando los anticuerpos anti-AU1 y anti- β actina. Se muestra la detección de AU1 y β -actina en los lisados proteicos de HaCaT, HaCaT-Ctrl, HaCaT-E211 y Control positivo (Inducción de E2-11 en BL21(DE3)).

Verificada la expresión proteica se analizaron los efectos de la misma sobre las subpoblaciones $\alpha 6$ integrina/CD71.

Cambios en la abundancia relativa de las subpoblaciones $\alpha 6$ integrina/CD71 al expresar la proteína E2 de VPH-11.

Para determinar los cambios en las abundancias relativas de las subpoblaciones $\alpha 6$ integrina/CD71 se realizó una doble inmunotinción con anticuerpos primarios acoplados a los fluorocromos Ficoeritrina y Ficoeritrina-Cy5 respectivamente.

Tabla 5. Subpoblaciones celulares por expresión de $\alpha 6$ integrina y CD71.

Intensidad		Subpoblación
$\alpha 6$ integrina	CD71	
Brillante	disminuido	BriDim Progenitores Tempranos
Brillante	brillante	Amplificación Transitoria
Disminuido	Brillante o disminuido	Diferenciación temprana

Mediante citometría de flujo y utilizando el software Summit 4.3, se determinó el porcentaje de células que expresaran los marcadores en cuestión de las intensidades representadas en la tabla 5, lo cual permitió separar a la población celular en tres subpoblaciones las cuales como ya se había mencionado, tienen diferentes características.

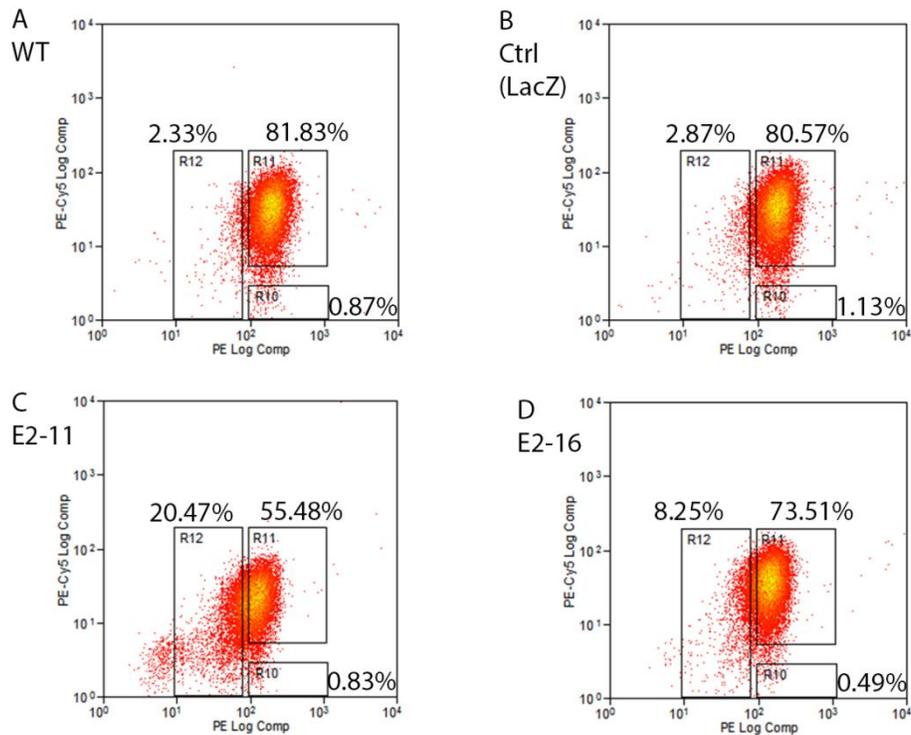


Figura 20. Subpoblaciones celulares de HaCaT WT, Control (Ctrl), E2-11 y E2-16 empleando los marcadores $\alpha 6$ integrina y CD71. Se muestra un dot-plot representativo del porcentaje de células que forman las subpoblaciones celulares observadas al realizar la inmunotinción con $\alpha 6$ integrina y CD71 en las diferentes líneas celulares. En el cuadrante R10 se muestra a la subpoblación de células progenitoras tempranas (denominadas BriDim), en el R11 a la subpoblación que corresponde a células de amplificación transitoria y en el R12 a la subpoblación de células en diferenciación temprana.

En la figura 20 se muestra un dot-plot representativo de las diferentes subpoblaciones observadas después de la inmunotinción con los anticuerpos contra los marcadores ya mencionados. Se realizó el ensayo por quintuplicado y en la figura 21 se muestran las gráficas de barras obtenidas con el programa GraphPad Prism 5, con el que también se realizó el análisis estadístico de los datos (ANOVA y Bonferroni test). Como se observa en la figura 21, en el caso de la línea HaCaT-WT y la línea Control (LacZ α), la abundancia relativa de las subpoblaciones celulares en ellas es muy similar.

Sin embargo, para el caso de las células HaCaT que expresan E2-11, existe un incremento de la subpoblación celular considerada de diferenciación temprana, así como una disminución en la subpoblación de amplificación transitoria, lo que podría significar que la expresión de E2-11 induce diferenciación.

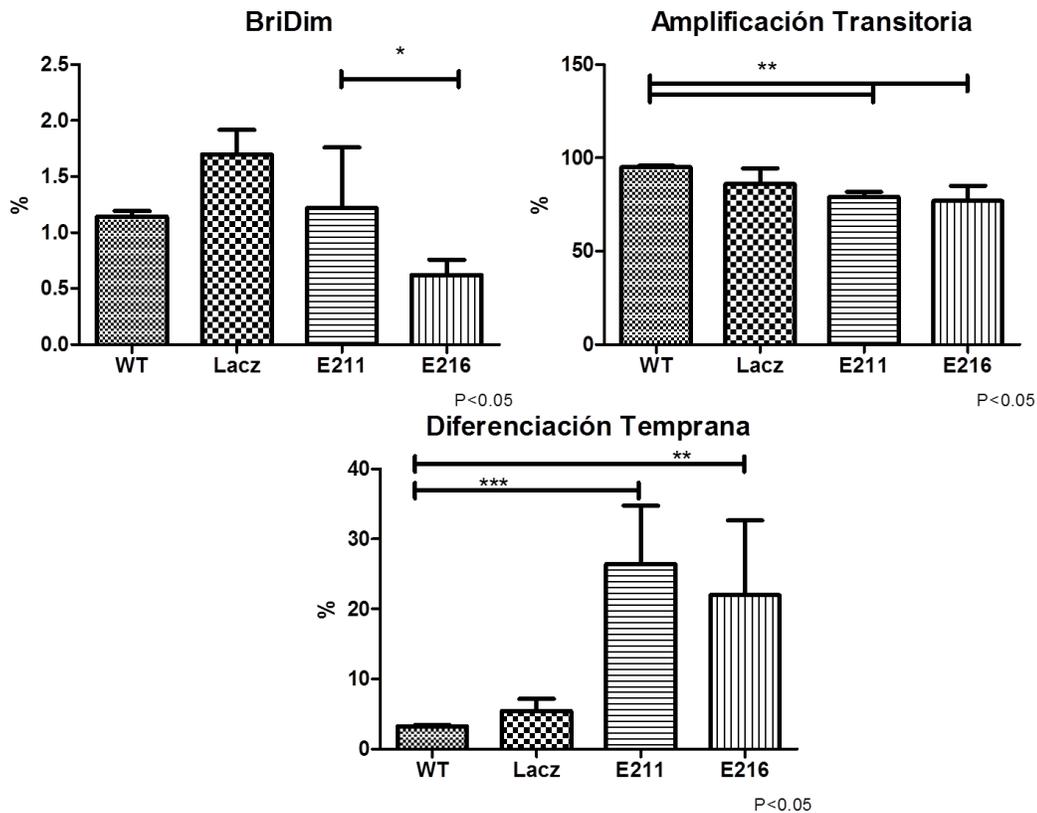


Figura 21. Gráficas de subpoblaciones BriDim, Amplificación Transitoria y Diferenciación Temprana de las diferentes líneas celulares. Se muestra gráfica de barras con Media \pm Desviación estándar de cada subpoblación $\alpha 6$ integrina/CD71 en cada una de las líneas celulares.

Por otro lado, el patrón que induce en las subpoblaciones celulares la expresión de E2-16 en apariencia es similar al inducido por E2-11. Sin embargo al analizar con detalle estas subpoblaciones, se observaron diferencias significativas entre ellas, ya que en el caso de E2-16 la subpoblación BriDim es menor que aquella observada en las células que expresan E2-11. Este fenómeno podría deberse a una salida de la

quiescencia hacia la diferenciación. Dadas las diferencias en las abundancias relativas de las subpoblaciones, se procedió a analizar los niveles de expresión de dos de los genes cuyos productos proteicos se saben se encuentran involucradas en el proceso de diferenciación.

Alteración en los niveles de mRNA de genes involucrados en los procesos de diferenciación y proliferación celular al expresar la proteína E2 de VPH-11.

Después de analizadas las abundancias relativas, se procedió a analizar algunos transcritos de genes celulares que en nuestro grupo de trabajo se había demostrado previamente que sufren alteraciones cuando es expresada la proteína E2 de VPH-16, como son Src y RhoA. Se sabe que dichos genes participan en la diferenciación del epitelio.

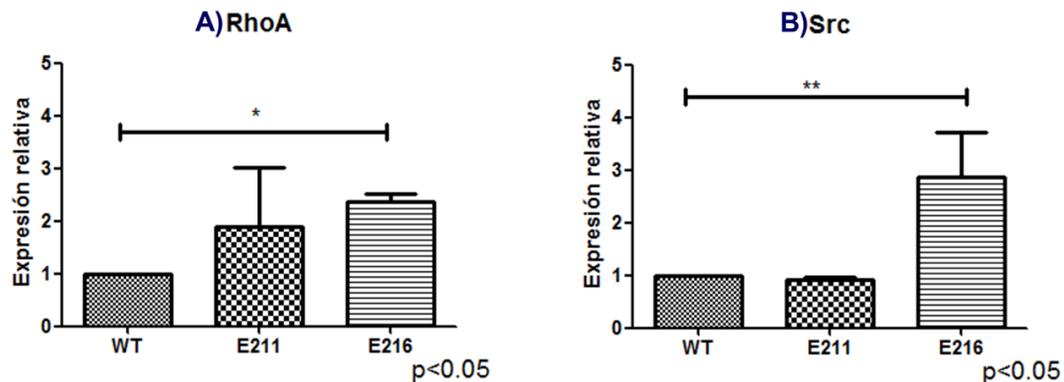


Figura 22. Expresión relativa de Src y RhoA en las líneas E2-11 y E2-16 con respecto a HaCaT. Se muestra la expresión relativa de RhoA (A) y la de Src (B) en las líneas E2-11 y E2-16.

Como se muestra en la figura 22, existen alteraciones en la expresión de los niveles de los transcritos de Src y RhoA. En el caso de RhoA, se observa que la expresión de la proteína E2 de ambos tipos virales induce un incremento en su expresión. Sin embargo aunque los incrementos son claros, no existen diferencias significativas en el caso de E2-11 no así en el caso de E2-16. Interesantemente para el caso de Src se observaron efectos contrastantes,

ya que mientras que E2-11 no parece inducir ningún cambio en los niveles de mRNA, E2-16 indujo un incremento significativo.

Discusión

Como es bien sabido, la proteína E2 de VPH-16 es capaz de inducir en la línea celular HaCaT diferenciación terminal [32], sin embargo las consecuencias de la expresión de esta proteína en la capa basal del epitelio no han sido descritas con claridad. Domínguez-Catzín [46], demostró que la expresión de $\alpha 6$ Integrina y CD71 en la línea celular HaCaT, permite identificar en ella tres subpoblaciones celulares que presentan las mismas características que las reportadas para cultivos primarios de queratinocitos [35], [37], [47], [48].

De esta forma, se procedió a determinar el efecto que pudiera tener la expresión de la proteína E2 de VPH 16 sobre la abundancia relativa de las tres subpoblaciones celulares que poseen marcadores de la capa basal en esta línea celular [46].

En el presente trabajo se analizó comparativamente el efecto de la expresión de las proteínas E2 tanto de VPH-16 como de VPH-11, sobre las abundancias relativas de las subpoblaciones de la línea HaCaT al ser inmunoteñidas con anticuerpos contra $\alpha 6$ integrina y contra CD71. Nuestros resultados indican que existen efectos diferentes sobre estas subpoblaciones al expresar una proteína de un virus de alto riesgo (VPH-16) y una de un virus de bajo riesgo (VPH-11). En el caso del virus de bajo riesgo no hay una modificación en la abundancia relativa de la subpoblación BriDim, sin embargo existe una disminución significativa en la subpoblación correspondiente a las células de amplificación transitoria y de manera simultánea se observa un incremento en aquellas células de diferenciación temprana. El fenómeno observado nos indica un incremento en la diferenciación de la línea celular. Aunque cuando se expresa la proteína E2 de VPH-16 se observa también una disminución en la subpoblación de amplificación transitoria y un incremento en la subpoblación de diferenciación

temprana, la subpoblación BriDim, es reducida importantemente y esa disminución no es apreciada al expresar la proteína de VPH-11. Lo anterior sugiere que ambas proteínas podrían favorecer la diferenciación celular, lo que refleja la estrecha relación entre el ciclo viral y la diferenciación epitelial. Esto podría significar que la proteína E2 en los papilomavirus (independientemente del tipo viral) podría tener también algunas funciones que favorecerían la diferenciación de las células epiteliales para de ésta manera asegurar un ciclo viral exitoso.

Sin embargo aunque ambas proteínas parecerían inducir la diferenciación, aparentemente no lo hacen de la misma manera, ya que E2 de VPH-16 disminuye a la población BriDim, lo que podría indicar que promueve su salida del reposo, mientras que al expresar la proteína E2 de VPH-11 no se observa el mismo fenómeno.

Cabe mencionar que existen diferencias estructurales entre ambas proteínas [15], que repercuten en su localización celular [26] y en la interacción que pueden llevar a cabo con diferentes proteínas celulares [20]. Se ha reportado que la proteína E2 de otro papilomavirus de alto riesgo (VPH-8) es capaz de inducir alteraciones en la expresión de la integrina $\beta 4$ [52], ya que reprime su transcripción. Esto podría ayudar a entender la razón por la que se observa una disminución en la subpoblación BriDim, ya que uno de los primeros pasos requeridos para que suceda la diferenciación epitelial es la pérdida de la adhesión celular.

Dada la disminución de la subpoblación BriDim al expresar a la proteína E2 de VPH-16, se esperaría un marcado incremento en la población de células de Diferenciación temprana, sin embargo el efecto observado es distinto, ya que la subpoblación que en realidad se enriquece es la de Amplificación transitoria, que está constituida por células que se encuentran en replicación constante y que aparentemente en este caso, no avanzan al siguiente paso de diferenciación de una manera acelerada. Interesantemente este efecto no

ocurre con E2 de VPH-11 por lo que sería muy interesante estudiar a fondo el mecanismo.

Es bien sabido que E2 de VPH-16 interactúa con diferentes factores transcripcionales [29], [53], [54] y muy posiblemente algunas de estas interacciones podrían tener como consecuencia el incremento en la diferenciación celular.

Dadas las diferencias obtenidas al expresar a las diversas proteínas E2 se procedió a determinar la expresión de dos genes cuyos productos proteicos juegan un papel importante ya sea en la proliferación, ó en el paso a la diferenciación de las células de amplificación transitoria [50]. En nuestro grupo de investigación García-Venzor [49] demostró que la expresión de algunos promotores celulares regulados por TAF-1 son alterados por la expresión de E2 de VPH-16 en células C-33A. Entre estos genes se encuentran Src y RhoA [30], [49].

Es conocido que un incremento en los niveles de proteína RhoA favorece el proceso de diferenciación [55] ya que esta proteína participa en el reacomodo de las uniones intercelulares, que es un evento requerido para el inicio de la diferenciación epitelial [56]. Se observó un incremento en los niveles de mRNA de RhoA en células que expresan la proteína E2 tanto de VPH-11 como de VPH-16, sin embargo aunque el incremento fue importante, únicamente se observaron diferencias significativas en el caso de E2-16. La elevación en los niveles de mRNA de esta proteína podrían no verse reflejados en el proceso biológico si el producto proteico no está presente, o si ésta proteína se encuentra en un estado inactivo, por lo que profundizar en su estudio permitiría correlacionar los datos con lo observado en el incremento de la subpoblación de diferenciación temprana.

Se conoce que la cinasa Src posee un papel importante en el proceso de proliferación [50], [51], [57] y en el caso del epitelio las células que proliferan de manera constante aún no inician el proceso de diferenciación. Nuestros

resultados indican que la expresión de este gen es afectada de manera importante al expresar la proteína E2 de VPH-11 y de VPH-16. Sin embargo, de manera muy interesante el efecto de ambas proteínas E2 fue muy distinto, ya que mientras que al expresar la proteína E2 de VPH-11 no se observa un cambio significativo con respecto a los niveles del correspondiente mRNA en células HaCaT, al expresar la proteína E2 de VPH-16 se observó un incremento muy importante en los transcritos de Src.

Como ya se ha mencionado, Src participa en el proceso de proliferación epitelial e inclusive se ha reportado que su expresión se encuentra incrementada en procesos hiper-proliferativos [51]. Los elevados niveles de los productos de este gen podrían ayudar a entender la razón por la que a pesar de haber una disminución en la subpoblación BriDim, la población de células de Diferenciación Temprana en las células que expresan E2 de VPH-16 es menor que aquella observada en las células que expresan E2 de VPH-11. Esto podría significar que en el caso del VPH de alto riesgo, la proteína E2 podría inducir que las células de Amplificación Transitoria permanezcan hiper-proliferando y no permitir que transiten directamente a diferenciación.

Se ha reportado que dentro del proceso de hiper-proliferación la proteína Src activa al transductor de señales STAT3 [58], generando una alteración en los niveles de transcritos de genes responsables de la proliferación celular [59], [60]. Interesantemente se ha reportado la presencia de STAT3 sobre-activado en lesiones cervicales VPH positivas en las que el ORF de E2 se encuentra intacto [61], aunque también en otros estudios en los que no se reporta el estado del ORF [62], por lo que sería interesante conocer el estado de STAT3 al expresar la proteína E2 de VPH-16 y establecer si existe una correlación.

El incremento en la transcripción del gen Src observado cuando se expresa la proteína E2 de VPH-16 podría ser mediada por la interacción de esta proteína viral con el factor transcripcional TAF1, el cual regula la transcripción de dicho gen [49]. Esta posibilidad se ve reforzada por el hecho de que la

proteína E2 de VPH-11 que en nuestro grupo de investigación se ha demostrado no es capaz de interactuar con dicho factor transcripcional, no altera la transcripción del gen Src.

Para el gen de RhoA el mecanismo de regulación podría ser diferente e independiente de TAF1, ya que ambas proteínas E2 alteran la expresión del gen a pesar de que solo una de ellas interactúa con TAF1 (E2-16). El hecho de que ambas proteínas alteren la transcripción del gen RhoA pudiera ser consecuencia de la diferenciación celular, la cuál podría ser provocada por otros mecanismos como sería el caso de la alteración en transcritos de las moléculas de adhesión (integrinas) como se ha observado tras la expresión del gen E2 de VPH 8, que inhibe la transcripción de la integrina $\beta 4$ [52].

Conclusiones

Se demostró que al expresar la proteína E2 tanto de VPH-11 como de VPH-16 ocurren cambios en la abundancia relativa de las subpoblaciones celulares $\alpha 6$ integrina/CD71. Ambas proteínas promueven la diferenciación celular e incrementan los niveles de mRNA de RhoA. A pesar de que ambas proteínas incrementan el porcentaje de células en diferenciación temprana, sólo E2 de VPH-16 produce una disminución en la subpoblación BriDim, la cual no se ve reflejada en un incremento en las células de diferenciación temprana sino en la subpoblación de células de amplificación transitoria. Estas células se encontrarían en proliferación activa tras la expresión de la proteína viral mientras que algunas pocas avanzarían al siguiente paso hacia la diferenciación. Este hecho correlaciona con la observación de un incremento en los niveles de transcritos de Src que es conocido se sobre-expresa en procesos de hiper-proliferación.

Por otro lado, aunque la proteína E2 de VPH-11 no genera una disminución en la subpoblación BriDim, induce una disminución en la subpoblación de células de amplificación transitoria y un incremento en las de diferenciación temprana. El cambio en el proceso de diferenciación podría estar relacionado preferencialmente con el incremento en los niveles de transcritos de RhoA, ya que no se observan cambios significativos en los transcritos de Src.

Perspectivas

Determinar el estado de las proteínas Src, RhoA y STAT3, para poder elucidar un modelo sobre las diferencias en la inducción de señales en la diferenciación de la línea celular HaCaT al expresarse la proteína E2 de VPH-11 y de VPH-16.

Bibliografía

- [1] J. Doorbar, W. Quint, L. Banks, I. G. Bravo, M. Stoler, T. R. Broker, and M. A. Stanley, "The biology and life-cycle of human papillomaviruses.," *Vaccine*, vol. 30 Suppl 5. pp. F55–70, 20-Nov-2012.
- [2] M. A. Stanley, M. R. Pett, and N. Coleman, "HPV: from infection to cancer," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 35, no. 6, pp. 1456–1460, Dec. 2007.
- [3] D. Pyeon, S. M. Pearce, S. M. Lank, P. Ahlquist, and P. F. Lambert, "Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression.," *PLoS Pathog.*, vol. 5, no. 2, p. e1000318, Feb. 2009.
- [4] M. Kalantari, A. Garcia-Carranca, C. D. Morales-Vazquez, R. Zuna, D. P. Montiel, I. E. Calleja-Macias, B. Johansson, S. Andersson, and H. U. Bernard, "Laser capture microdissection of cervical human papillomavirus infections: Copy number of the virus in cancerous and normal tissue and heterogeneous DNA methylation," *Virology*, vol. 390, no. 2, pp. 261–267, 2009.
- [5] N. Velázquez-Márquez, M. A. Paredes-Tello, H. Pérez-Terrón, G. Santos-López, J. Reyes-Leyva, and V. Vallejo-Ruiz, "Prevalence of human papillomavirus genotypes in women from a rural region of Puebla, Mexico.," *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 6, pp. 690–5, Nov. 2009.
- [6] J. Van Der Marel, W. G. V Quint, M. Schiffman, M. M. Van De Sandt, R. E. Zuna, S. Terence Dunn, K. Smith, C. A. Mathews, M. A. Gold, J. Walker, and N. Wentzensen, "Molecular mapping of high-grade cervical intraepithelial neoplasia shows etiological dominance of HPV16," *Int. J. Cancer*, vol. 131, no. 6, pp. 1–16, 2012.
- [7] B. J. Kocjan, K. Seme, and M. Poljak, "Detection and differentiation of human papillomavirus genotypes HPV-6 and HPV-11 by FRET-based real-time PCR.," *J. Virol. Methods*, vol. 153, no. 2, pp. 245–9, Nov. 2008.
- [8] P. a Heinzl, S. Y. Chan, L. Ho, M. O'Connor, P. Balaram, M. S. Campo, K. Fujinaga, N. Kiviat, J. Kuypers, and H. Pfister, "Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 33, no. 7, pp. 1746–54, Jul. 1995.

- [9] B. Kaczkowski, M. Rossing, D. K. Andersen, A. Dreher, M. Morevati, M. A. Visser, O. Winther, F. C. Nielsen, and B. Norrild, "Integrative analyses reveal novel strategies in HPV11,-16 and -45 early infection.," *Sci. Rep.*, vol. 2, p. 515, Jan. 2012.
- [10] A. Dreher, M. Rossing, B. Kaczkowski, D. K. Andersen, T. J. Larsen, M. K. Christophersen, F. C. Nielsen, and B. Norrild, "Differential expression of cellular microRNAs in HPV 11, -16, and -45 transfected cells.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 412, no. 1, pp. 20–5, Aug. 2011.
- [11] S. T. Oh, M. S. Longworth, and L. A. Laimins, "Roles of the E6 and E7 proteins in the life cycle of low-risk human papillomavirus type 11.," *J. Virol.*, vol. 78, no. 5, pp. 2620–2626, Mar. 2004.
- [12] A. C. de Freitas, E. C. Coimbra, and M. D. C. G. Leitão, "Molecular targets of HPV oncoproteins: potential biomarkers for cervical carcinogenesis.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1845, no. 2. pp. 91–103, Apr-2014.
- [13] A. Roman and K. Munger, "The papillomavirus E7 proteins," *Virology*, Oct. 2013.
- [14] S. B. Vande Pol and A. J. Klingelutz, "Papillomavirus E6 oncoproteins," *Virology*, Oct. 2013.
- [15] M. Alemi, H. Mohabtkar, and M. Behbahani, "In silico comparison of low- and high-risk human papillomavirus proteins.," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 172, no. 1, pp. 188–95, Jan. 2014.
- [16] G. Dell, K. W. Wilkinson, R. Tranter, J. Parish, R. Leo Brady, and K. Gaston, "Comparison of the Structure and DNA-binding Properties of the E2 Proteins from an Oncogenic and a Non-oncogenic Human Papillomavirus," *J. Mol. Biol.*, vol. 334, no. 5, pp. 979–991, Dec. 2003.
- [17] C. Brown, K. Campos-León, M. Strickland, C. Williams, V. Fairweather, R. L. Brady, M. P. Crump, and K. Gaston, "Protein flexibility directs DNA recognition by the papillomavirus E2 proteins.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 7, pp. 2969–80, Apr. 2011.
- [18] M. Ottinger, J. A. Smith, M. Schweiger, D. Robbins, M. L. C. Powell, J. You, and P. M. Howley, "Cell-type specific transcriptional activities among different papillomavirus long control regions and their regulation by E2," *Virology*, vol. 395, no. 2, pp. 161–171, 2009.

- [19] S. Y. Hou, S.-Y. Wu, and C.-M. Chiang, "Transcriptional activity among high and low risk human papillomavirus E2 proteins correlates with E2 DNA binding.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 47, pp. 45619–29, Nov. 2002.
- [20] M. Muller, Y. Jacob, L. Jones, A. Weiss, L. Brino, T. Chantier, V. Lotteau, M. Favre, and C. Demeret, "Large scale genotype comparison of human papillomavirus E2-host interaction networks provides new insights for e2 molecular functions.," *PLoS pathogens*, vol. 8, no. 6. p. e1002761, Jan-2012.
- [21] J. L. Parish, A. Kowalczyk, H. Chen, G. E. Roeder, R. Sessions, M. Buckle, and K. Gaston, "E2 proteins from high- and low-risk human papillomavirus types differ in their ability to bind p53 and induce apoptotic cell death.," *J. Virol.*, vol. 80, no. 9, pp. 4580–90, May 2006.
- [22] A. A. McBride, "The papillomavirus E2 proteins.," *Virology*, vol. 445, no. 1–2, pp. 57–79, Oct. 2013.
- [23] M. G. McPhillips, J. G. Oliveira, J. E. Spindler, R. Mitra, and A. A. McBride, "Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses.," *J. Virol.*, vol. 80, no. 19, pp. 9530–43, Oct. 2006.
- [24] C. M. Helfer, R. Wang, and J. You, "Analysis of the papillomavirus E2 and bromodomain protein Brd4 interaction using bimolecular fluorescence complementation.," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, p. e77994, Jan. 2013.
- [25] T. Yu, Y.-C. Peng, and E. J. Androphy, "Mitotic kinesin-like protein 2 binds and colocalizes with papillomavirus E2 during mitosis.," *J. Virol.*, vol. 81, no. 4, pp. 1736–45, Feb. 2007.
- [26] S. Blachon, S. Bellanger, C. Demeret, and F. Thierry, "Nucleocytoplasmic shuttling of high risk human Papillomavirus E2 proteins induces apoptosis.," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 43, pp. 36088–98, Oct. 2005.
- [27] N. Zou, B. Y. Lin, F. Duan, K. Lee, G. Jin, R. Guan, G. Yao, E. J. Lefkowitz, T. R. Broker, and L. T. Chow, "The Hinge of the Human Papillomavirus Type 11 E2 Protein Contains Major Determinants for Nuclear Localization and Nuclear Matrix Association," *J. Virol.*, vol. 74, no. 8, pp. 3761–3770, Apr. 2000.
- [28] A. Valencia-Hernández, C. Cuevas-Bennett, and E. Garrido, "Transcriptional regulation of human papillomavirus type 18 P105

promoter by the co-activator CBP.," *Intervirolology*, vol. 50, no. 6, pp. 418–25, Jan. 2007.

- [29] F. Centeno, E. Ramírez-Salazar, E. García-Villa, P. Gariglio, and E. Garrido, "TAF1 interacts with and modulates human papillomavirus 16 E2-dependent transcriptional regulation.," *Intervirolology*, vol. 51, no. 2, pp. 137–43, Jan. 2008.
- [30] E. Ramírez-Salazar, F. Centeno, K. Nieto, A. Valencia-Hernández, M. Salcedo, and E. Garrido, "HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation.," *Virology*, vol. 8, p. 247, Jan. 2011.
- [31] A. F. Deyrieux and V. G. Wilson, "In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line.," *Cytotechnology*, vol. 54, no. 2, pp. 77–83, Jun-2007.
- [32] J. E. Burns, H. F. Walker, C. Schmitz, and N. J. Maitland, "Phenotypic effects of HPV-16 E2 protein expression in human keratinocytes.," *Virology*, vol. 401, no. 2, pp. 314–21, Jun. 2010.
- [33] E. Fuchs, "Epidermal differentiation.," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 2, no. 6, pp. 1028–35, Dec. 1990.
- [34] F. Stubenrauch and L. a Laimins, "Human papillomavirus life cycle: active and latent phases.," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 379–86, Dec. 1999.
- [35] P. Kaur and A. Li, "Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells.," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 114, no. 3, pp. 413–20, Mar. 2000.
- [36] E. Clayton, D. P. Doupé, A. M. Klein, D. J. Winton, B. D. Simons, and P. H. Jones, "A single type of progenitor cell maintains normal epidermis.," *Nature*, vol. 446, no. 7132, pp. 185–9, 08-Mar-2007.
- [37] H. Schlüter, S. Paquet-Fifield, P. Gangatirkar, J. Li, and P. Kaur, "Functional characterization of quiescent keratinocyte stem cells and their progeny reveals a hierarchical organization in human skin epidermis.," *Stem Cells*, vol. 29, no. 8, pp. 1256–68, Aug. 2011.
- [38] N. Radoja, A. Gazel, T. Banno, S. Yano, and M. Blumenberg, "Transcriptional profiling of epidermal differentiation.," *Physiological genomics*, vol. 27, no. 1, pp. 65–78, 03-Oct-2006.

- [39] a Li, P. J. Simmons, and P. Kaur, "Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 7. pp. 3902–7, 31-Mar-1998.
- [40] P. Dalerba, R. W. Cho, and M. F. Clarke, "Cancer stem cells: models and concepts.," *Annu. Rev. Med.*, vol. 58, pp. 267–84, Jan. 2007.
- [41] J. Villanueva-Toledo, A. Ponciano-Gómez, E. Ortiz-Sánchez, and E. Garrido, "Side populations from cervical-cancer-derived cell lines have stem-cell-like properties.," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 41, no. 4, pp. 1993–2004, Apr. 2014.
- [42] J. López, A. Poitevin, V. Mendoza-Martínez, C. Pérez-Plasencia, and A. García-Carrancá, "Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance.," *BMC cancer*, vol. 12. p. 48, Jan-2012.
- [43] S. S. Koçer, P. M. Djurić, M. F. Bugallo, S. R. Simon, and M. Matic, "Transcriptional profiling of putative human epithelial stem cells.," *BMC genomics*, vol. 9. p. 359, Jan-2008.
- [44] H. Wan, M. G. Stone, C. Simpson, L. E. Reynolds, J. F. Marshall, I. R. Hart, K. M. Hodivala-Dilke, and R. a J. Eady, "Desmosomal proteins, including desmoglein 3, serve as novel negative markers for epidermal stem cell-containing population of keratinocytes.," *J. Cell Sci.*, vol. 116, no. Pt 20, pp. 4239–4248, 2003.
- [45] H. Wan, M. Yuan, C. Simpson, K. Allen, F. N. E. Gavins, M. S. Ikram, S. Basu, N. Baksh, E. a O'Toole, and I. R. Hart, "Stem/progenitor cell-like properties of desmoglein 3dim cells in primary and immortalized keratinocyte lines.," *Stem Cells*, vol. 25, no. 5, pp. 1286–1297, 2007.
- [46] V. Domínguez Catzín, "PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA E2 DE LOS PAPILOMAVIRUS DE ALTO RIESGO EN PROCESOS CELULARES DE LA LÍNEA CELULAR HaCaT," CINVESTAV.
- [47] R. Hayashi, M. Yamato, T. Saito, T. Oshima, T. Okano, Y. Tano, and K. Nishida, "Enrichment of corneal epithelial stem/progenitor cells using cell surface markers, integrin $\alpha 6$ and CD71," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 367, no. 2, pp. 256–263, 2008.
- [48] D. Croagh, W. a Phillips, R. Redvers, R. J. S. Thomas, and P. Kaur, "Identification of candidate murine esophageal stem cells using a combination of cell kinetic studies and cell surface markers.," *Stem Cells*, vol. 25, no. 2, pp. 313–318, 2007.

- [49] A. García Venzor, “Efecto de la interacción de la proteína E2 de VPH 16 con el factor TAF1 sobre su unión a promotores celulares,” Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, 2009.
- [50] E. J. Müller, L. Williamson, C. Kolly, and M. M. Suter, “Outside-in signaling through integrins and cadherins: a central mechanism to control epidermal growth and differentiation?,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 128, no. 3, pp. 501–516, 2008.
- [51] E. E. Ayli, W. Li, T. T. Brown, A. Witkiewicz, R. Elenitsas, and J. T. Seykora, “Activation of Src-family tyrosine kinases in hyperproliferative epidermal disorders,” *J. Cutan. Pathol.*, vol. 35, no. 3, pp. 273–277, 2008.
- [52] M. Oldak, H. Smola, M. Aumailley, F. Rivero, H. Pfister, and S. Smolahaess, “The Human Papillomavirus Type 8 E2 Protein Suppresses α 4-Integrin Expression in Primary Human Keratinocytes,” *Society*, vol. 78, no. 19, pp. 10738–10746, 2004.
- [53] E. Carrillo, E. Garrido, and P. Gariglio, “Specific in vitro interaction between papillomavirus E2 proteins and TBP-associated factors.,” *Intervirology*, vol. 47, no. 6, pp. 342–9, Jan. 2004.
- [54] D. Lee, S. G. Hwang, J. Kim, and J. Choe, “Functional interaction between p/CAF and human papillomavirus E2 protein.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 8, pp. 6483–9, Feb. 2002.
- [55] R. McMullan, S. Lax, V. H. Robertson, D. J. Radford, S. Broad, F. M. Watt, A. Rowles, D. R. Croft, M. F. Olson, and N. a. Hotchin, “Keratinocyte Differentiation Is Regulated by the Rho and ROCK Signaling Pathway,” *Curr. Biol.*, vol. 13, no. 24, pp. 2185–2189, 2003.
- [56] B. Jackson, K. Peyrollier, E. Pedersen, A. Basse, R. Karlsson, Z. Wang, T. Lefever, A. M. Ochsenbein, G. Schmidt, K. Aktories, A. Stanley, F. Quondamatteo, M. Ladwein, K. Rottner, J. van Hengel, and C. Brakebusch, “RhoA is dispensable for skin development, but crucial for contraction and directed migration of keratinocytes.,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 22, no. 5, pp. 593–605, 2011.
- [57] X. Lian, J. Selekman, X. Bao, C. Hsiao, K. Zhu, and S. P. Palecek, “A Small Molecule Inhibitor of Src Family Kinases Promotes Simple Epithelial Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells,” *PLoS One*, vol. 8, no. 3, 2013.

- [58] C. M. Silva, "Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis.," *Oncogene*, vol. 23, no. 48, pp. 8017–8023, 2004.
- [59] S. Sano, K. S. Chan, and J. DiGiovanni, "Impact of Stat3 activation upon skin biology: A dichotomy of its role between homeostasis and diseases," *J. Dermatol. Sci.*, vol. 50, no. 1, pp. 1–14, 2008.
- [60] V. Orecchia, G. Regis, B. Tassone, C. Valenti, L. Avalle, S. Saoncella, E. Calautti, and V. Poli, "Constitutive STAT3 activation in epidermal keratinocytes enhances cell clonogenicity and favours spontaneous immortalization by opposing differentiation and senescence checkpoints," *Exp. Dermatol.*, vol. 24, no. 1, pp. 29–34, 2015.
- [61] D. Prabhavathy, R. Vijayalakshmi, M. P. Kanchana, and D. Karunakaran, "HPV16 E2 enhances the expression of NF- κ B and STAT3 target genes and potentiates NF- κ B activation by inflammatory mediators," *Cell. Immunol.*, vol. 292, no. 1–2, pp. 70–77, 2014.
- [62] S. Shukla, G. Shishodia, S. Mahata, S. Hedau, A. Pandey, S. Bhambhani, S. Batra, S. F. Basir, B. C. Das, and A. C. Bharti, "Aberrant expression and constitutive activation of STAT3 in cervical carcinogenesis: implications in high-risk human papillomavirus infection.," *Mol. Cancer*, vol. 9, no. 1, p. 282, 2010.

Anexo 1 Inducción de la proteína E211 AU1 en bacterias BL21(DE3)

1. Se transformaron bacterias BL21(DE3) con el plásmido pET21D(+)*E211AU1*.
2. Se seleccionó una colonia y se puso un pie de cultivo de 10 mL de LB+ Ampicilina, se dejó crecer toda la noche.
3. Se pone un mL del pie de cultivo en 10 mL de LB+ Ampicilina, se incuba a 37°C hasta alcanzar una DO= 0.50-0.55 (aproximadamente 4 h)
4. Alcanzada la OD se induce con 1 mM de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), se incuba a 30°C durante 3 h.
5. El cultivo se centrifuga por 10 min a 2500 rpm
6. Se re-suspende en 1 mL de Buffer LB con inhibidor de proteasas 1x.
7. Se hicieron alícuotas de 20 μL.