



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA SRSF1 EN LA
REGULACIÓN DE LOS FACTORES DE SPLICING Y DE LOS
TRANSCRITOS DE E6/E7 DE VPH16**

T E S I S

Que presenta

REMBERTO CONDE CAMPOS

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOMEDICINA MOLECULAR

Director de Tesis:

DR. NICOLÁS VILLEGAS SEPÚLVEDA

México, Distrito Federal

AGOSTO, 2017

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio No. 1 del departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, y con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).

DEDICATORIAS

Mi tesis de maestría va dedicada a mi familia, mi padre Rafael Conde García (Q.E.P.D.), mi madre Guadalupe Campos Romero, mis hermanos Rafael y Alicia Conde Campos, quienes me dieron el apoyo y palabras de aliento, hicieron lo posible para que avanzará en mi estancia durante la maestría. Ellos mostraron empatía, confianza y sobre todo amor en mi vida y no hay mejor manera que dedicarles esta tesis que hice con mucho esfuerzo y sacrificio.

Al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, por su sabiduría durante mi tesis de maestría, sus consejos y la evolución que he tenido forjándome como futuro maestro en ciencias en Biomedicina Molecular. Le agradezco enormemente por dejarme trabajar en su laboratorio y cumplir uno de mis metas.

A los integrantes del laboratorio 1, el biólogo Raúl Bonilla Moreno, quien me soportó un buen rato con mis problemas y me ayudo en todo momento con su conocimiento durante la fase experimental. A mi compañero de maestría, Norberto Iván Bautista Gaytán, por estar siempre con su humor y echarnos la mano en los experimentos. A Jesús Israel García Aguiar y Macario Martínez Castillo, por el apoyo en la tesis y sus consejos en los experimentos. A Carolina Vaisman, por las pláticas amenas y secretos del laboratorio. Al técnico Víctor Manuel Ortiz Santiago, por el apoyo durante el trabajo como técnico en el laboratorio. Al Dr. Oscar del Moral Hernández, que gracias a él me decidí a iniciar esta travesía en hacer maestría en el CINVESTAV.

A mis compañeros de la maestría, donde siempre nos estuvimos apoyando y echando porras en todo momento, llorar nuestras penas, que el experimento no salió, etc. Supongo que nos queda un gran camino que recorrer y espero estar siempre en contacto con ellos.

A mis amigos de toda la vida: Victor Manuel Villegas Román, Lizbeth Tehuitzin Acevedo, Juana Pileño García y Amparo Brito Suástegui, por su acompañamiento por mensajes de texto, apoyo emocional en todo este camino y nunca me abandonaron por cumplir mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer la materialización de esta tesis de maestría a mi familia, por apoyarme en cada momento, por los ánimos y esfuerzo, a través del cual lograron que el sueño de iniciar y terminar una maestría se hiciera realidad.

Gracias al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su paciencia y confianza, porque me enseñó a hacerme responsable de mis actividades, proponer ideas y tener más seguridad en mí mismo.

Agradezco a mi co-tutor el Dr. Eduardo López Urrutia, mis sinodales, Dra. Rebeca Georgina Manning Cela, Dr. Jesús Valdes Flores, por sus observaciones, consejos, y apoyo en todo momento.

Agradezco el apoyo de CONACyT para el financiamiento de mis estudios y hacer posible esta maestría.

ÍNDICE GENERAL

- ÍNDICE DE FIGURAS
- ÍNDICE DE TABLAS
- ABREVIATURAS
- RESUMEN
- ABSTRACT
 - ANTECEDENTES
 - ESTRUCTURA GENÓMICA DE VPH
 - CICLO REPLICATIVO DE VPH
 - ONCOPROTEÍNAS VIRALES E6 Y E7 EN LA CARCINOGENESIS CERVICAL.
 - *SPLICING* ALTERNATIVO EN VPH16
 - PROTEÍNAS SR
 - PAPEL DE SRSF1 EN CÁNCER
 - RELACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SR EN EL *SPLICING* ALTERNATIVO DE VPH16
 - ANTECEDENTES DIRECTOS
 - HIPÓTESIS
 - OBJETIVOS
 - General
 - Específicos
 - ESTRATEGIA EXPERIMENTAL
 - METODOLOGÍA
 - Diseño y construcción de plásmido pDsRed2-N1-SRSF1
 - Líneas celulares y condiciones de cultivo
 - Extracción de RNA y tratamiento con DNAsa
 - Retro-Transcripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)
 - Ensayo de Inmunofluorescencia
 - Ensayos de *Western Blot*

- RESULTADOS
 - Construcción de *pDsRed2-N1-SRSF1*.
 - Inmunofluorescencia de RFP en líneas de carcinoma cervical transfectadas.
 - Expresión de RFP y SRSF1-RFP por *Western Blot* en líneas de carcinoma cervical transfectadas.
 - La expresión de SRSF1 incrementa los niveles de transcritos de E6/E7 en SiHa.
 - La expresión de SRSF1 en SiHa incrementa los niveles de transcritos y de proteínas blanco de algunos factores de *splicing*.
- DISCUSIÓN
- CONCLUSIONES
- PERSPECTIVAS
- BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE DE FIGURAS

❖ Figura 1. Mapa del genoma de la cepa de referencia VPH16.	2
❖ Figura 2. Ciclo replicativo durante la infección productiva por VPH y organización de su genoma.	3
❖ Figura 3. Proteínas celulares y vías de señalización alteradas por las oncoproteínas virales E6 y E7 de VPH16.	5
❖ Figura 4. Representación esquemática de los principales transcritos producidos por <i>splicing</i> alternativo en VPH16.	6
❖ Figura 5. Las modificaciones post-traduccionales en el dominio SR de las proteínas SR dictan su localización y función celular.	9
❖ Figura 6. Papel de SRSF1 en potenciar la traducción.	11
❖ Figura 7. Niveles de expresión relativa de factores de <i>splicing</i> detectados por <i>Western Blot</i> en diversas líneas de cáncer cervical.	13
❖ Figura 8. Representación esquemática de los vectores pJET1.2/blunt y pDsRed1-N1, muestra los sitios de clonación, principales sitios de restricción y los genes de resistencia a antibióticos.	16
❖ Figura 9. Estructura del dominio modular de SRSF1.	10
❖ Figura 10. Función de SRSF1 en promover la traducción	12
❖ Figura 11. Niveles de expresión relativa de factores de <i>splicing</i> detectados por <i>Western Blot</i> en diversas líneas de cáncer cervical.	14
❖ Figura 12. Representación esquemática de los vectores pJET1.2/blunt y pDsRed1-N1, muestra los sitios de clonación, principales sitios de restricción y los genes de resistencia a antibióticos.	17
❖ Figura 13. Construcción de pDsRed1-N1-SRSF1.	23
❖ Figura 14. Fluorescencia para la localización in vivo de RFP y SRSF1-RFP.	24
❖ Figura 15. Niveles de proteína RFP, SRSF1 y SRSF1-RFP por <i>Western Blot</i> .	25
❖ Figura 16. Niveles de transcritos de E6/E7 de VPH16 por RT-PCR en las líneas celulares SiHa establemente transfectadas y CasKi.	26
❖ Figura 17. Niveles de expresión de algunos factores de <i>splicing</i> en las líneas celulares derivadas de Cáncer Cervicouterino.	27
❖ Figura 18. Resultados de la secuenciación de pDsRed2-N1-SRSF1.	36

ÍNDICE DE TABLAS

- ❖ Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos (sentido y antisentido) 20 utilizados en el estudio.

ABREVIATURAS

ADA3	Proteína de activación en alteración/deficiencia 3
ASF/SF2	Alternative Splicing Factor/Splicing Factor 2
BAK	Bcl-2 antagonist/killer 1
BAX	Proteína asociada a Bcl-2 X
CaCU	Cáncer Cervicouterino
CBP	Proteína de unión a CREB
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
Clk/Sty	Cdc2-like kinase/Serine Threonine Tyrosine
CMGK	Acrónimo: cyclin-dependent kinases (CDKs), mitogen-activated protein kinases (MAP kinases), glycogen synthase kinases (GSK) and CDK-like kinase.
CREB	Proteína de unión a elemento de respuesta a cAMP
CSTF64	Cleavage stimulation factor 64 kDa
CUGBP1	CUG triplet repeat, RNA binding protein 1
DNA	Ácido Desoxirribunucleico
DNasa	Endonucleasa
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
E6AP	Proteína asociada a E6
eIF4EBP1	Proteína de unión al factor de traducción eucarionte 4E 1
EJC	Complejo de unión al exón
ENSA	Endosulfina α
ERK	Cinasa relacionada con señal extracelular
ESE	Elemento <i>enhancer</i> de <i>splicing</i>
FADD	Proteína de Dominio de Muerte Asociado a Fas
hnRNP	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear
HuR	Antígeno Humano R
IFN	Interferón
IRF1/3	Factor regulatorio de interferón 1/3
LCR	Región Larga de Control
MEM	Medio mínimo esencial
miRNA	Micro RNA
mRNA	RNA mensajero
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MYC	Myelocytomatosis oncogene protein
NETO2	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2
NFX123	Nuclear transcription factor, X box-binding protein-123
NMD	Nonsense-mediated decay
ORF	Marco Abierto de Lectura
PABPC1	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1
pAE	Señal temprana de poliadenilación
PAK	Cinasa de proteína serina-arginina
pAL	Señal tardía de poliadenilación
pb	Pares de bases/nucleótidos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PDZ	Acrónimo proteínas que comparten el dominio: post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), y zonula occludens-1 protein (zo-1)
pRB	Proteína de Retinoblastoma
PTB1	Proteína de unión al tracto de polipirimidinas 1
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RFP	Proteína roja fluorescente
RNA	Ácido Ribunucleico
RON	Cinasa Recepteur d'Origine Nantais
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RRM	Motivo de unión a RNA
S6K1	Proteína ribosomal cinasa S6 beta-1
Sam68	Src-Associated substrate in Mitosis of 68 kDa
SAS	Sitio aceptor de <i>splicing</i>
SDS*	Sitio donador de <i>splicing</i> / Duodecil sulfato de sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SP1	Proteína de especificidad 1
SRPK	Cinasa de proteínas SR
SRSF	Factor de <i>splicing</i> rico en serina y arginina
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
TAP	Proteína asociada a TIP
TBS	Tris amortiguador salino
TEMED	Tetrametiletildiamina
TERT	Transcriptasa Reversa de la Telomerasa
TIAR	Proteína relacionada con TIA1 (Proteína de antígeno interno de célula T 1)
TNFR1	Receptor de factor de necrosis tumoral 1
UTR	Región no traducible
VPH	Virus de Papiloma Humano
VPH-AR	Virus de Papiloma Humano de alto riesgo

RESUMEN

El Cáncer Cervicoteurino es la 4^a causa de muerte en mujeres a nivel mundial, y la segunda en países subdesarrollados. Los virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo (por ejemplo, tipos 16 y 18), se han detectado en el 99% de los casos de cáncer cervical. La expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 altera las principales vías celulares que conllevan a un incremento en proliferación, evasión de la apoptosis y la inmortalización. El *splicing* alternativo es un proceso esencial para la expansión del transcriptoma y proteoma celular, que toman ventaja algunos virus para diversificar la expresión de sus proteínas virales. El VPH de alto riesgo se integra comúnmente en lesiones premalignas y carcinoma cervical, y a partir de la transcripción del bicistrón de E6/E7, se generan el pre-mRNA de E6/E7 y 3 isoformas de *splicing*, E6**I*, E6**II* y E6[^]E7.

Los factores de *splicing*, por ejemplo, las proteínas SR y hnRNPs, se encargan de la regulación post-transcripcional del mRNA. La expresión en cantidades elevadas de algunos factores de *splicing* se ha relacionado con alteraciones celulares, como control del ciclo celular, proliferación y evasión de apoptosis, siendo catalogados como proto-oncogenes.

En este trabajo se analizó el efecto de la transfección con el factor de *splicing* SRSF1 para incrementar su expresión, en la producción de los transcritos de E6/E7 de VPH16 y de algunos factores de *splicing* que regulan el RNA. Los factores de *splicing* analizados fueron detectados unidos al intrón I del bicistrón de E6/E7 de VPH16, previamente. Con este fin, se construyó el plásmido pDsRed2-N1-SRSF1 que fue transfectado en las líneas celulares C-33 A (VPH negativo) y SiHa (VPH16+). Por medio de RT-PCR se determinaron los niveles de transcrito de E6/7 en SiHa y de factores de *splicing* en ambas líneas celulares, por *Western Blot* se detectaron sus niveles de proteína. Los resultados obtenidos mostraron un incremento en los niveles de transcritos de E6/E7 en SiHa, así como un aumento diferencial en los niveles de mRNA y de proteína de los factores de *splicing* analizados en las líneas celulares

C-33 A y SiHa. Nuestros datos sugieren que la expresión de SRSF1 elevada alterara los niveles de transcritos de VPH16 y de algunos factores de *splicing*.

ABSTRACT

Worldwide the cervical cancer is the fourth leading cause of death in women, being the second in underdeveloped countries. Almost 99% of cases of cervical cancer have been detected the high risk human papillomavirus (HR-HPV), including the types 16 and 18. Overexpression of the viral oncoproteins E6 and E7 alter the major cellular pathways leading to increased proliferation, evasion to apoptosis and immortalization. Alternative splicing is an essential process for the expansion of the cellular transcriptome and proteome, which some viruses take advantage to diversify their viral proteins. The HPV is commonly integrated in premalignant lesions and cervical carcinoma, and from the transcription of E6/E7 bicistron, it generates the E6/E7 pre-mRNA and 3 splicing isoforms, called E6*I, E6*II and E6^E7. Splicing factors, such the SR and hnRNPs proteins, are responsible for the post-transcriptional regulation of mRNAs. The overexpression of few of splicing factors has been linked to alterations such as cell cycle control, proliferation and apoptosis suppression, being cataloged as proto-oncogenes. In this work, we analyzed the effect of overexpression of the splicing factor SRSF1 over the production of HPV 16 E6/E7 transcripts and some splicing factors that regulate RNA. The analyzed splicing factors were previously detected linked to intron I of E6/E7 bicistron. To this end, pDsRed2-N1-SRSF1 was constructed and transfected into the C-33 A (HPV negative) and SiHa (HPV 16+) cell lines. The transcripts levels of E6/E7 in SiHa and some splicing factors were determined by RT-PCR in both cell lines, and their protein levels of some RNA binding proteins were detected by Western Blot. The results showed an increase in the levels of E6/E7 transcripts in SiHa, as well as an slight increase in the mRNAs and protein levels of some splicing factors in cell line C-33 A. Intriguingly, the expression changes were higher in SiHa than C-33 A. Our data suggest that overexpression of SRSF1 alter the levels of early isoforms of E6/E7 HPV 16 and some splicing factors.

ANTECEDENTES

El Cáncer Cervicouterino (CaCU) es el 4° cáncer más común en mujeres a nivel mundial. Virtualmente, todos los casos de CaCU son relacionados a la infección de VPH. Se han estimado más de 500,000 casos y más de 250,000 muertes anuales. La infección de VPH es también responsable del riesgo para otros tumores malignos orofaríngeos y anogenitales, incluyendo una vasta mayoría de carcinomas anales y una alta proporción de cánceres de vulva, vagina y pene (Lowy D. R., 2016).

Generalmente, aunque las infecciones por *Papillomavirus* ocasionan lesiones benignas, se consideran como el principal factor de riesgo en el desarrollo de CaCU, cáncer anal y tumores de cabeza y de cuello. Por ello, se han clasificado a los *Papillomavirus* en virus de alto y de bajo riesgo en base a su potencial oncogénico. Los virus de alto riesgo (VPH-AR) son detectados en el 99% de los tumores, tales como VPH16, VPH18, VPH31, VPH33 y VPH35, entre los más frecuentes (zur Hausen, 2002).

El VPH16 es el virus con mayor riesgo oncogénico, seguido por el VPH18. Estos dos tipos virales (VPH16/18) son asociados al 70% de cáncer cervical (el tipo 16 ha sido detectado cerca del 24% de las mujeres con infección de VPH, mientras el tipo 18 ha sido detectado en el 9%) (de Sanjose S., 2007). Más del 80% de los cánceres no cervicales asociados al VPH, son atribuidos los dos tipos virales 16/18 (Saraiya M, 2015). Cuando un paciente exhibe una infección persistente con un VPH oncogénico, puede presentar un riesgo de desarrollo potencial de lesiones precancerosas y cáncer invasivo. El intervalo entre la adquisición de infección y cáncer es usualmente entre 15 a 25 años o más (Schiffman M., 2013).

ESTRUCTURA GENÓMICA DE VPH

Las partículas de VPH son no envueltas e icosaédricas, de aproximadamente de 60 nm de diámetro, y se componen de una sola molécula de DNA de doble cadena circular de cerca de 8,000 pb en tamaño, contenido entre una cubierta esférica de proteína (cápside) (Baker C. C., *et al.*, 1987).

Una característica de la organización genómica de todos los *Papillomavirus* es que todos sus marcos abiertos de lectura (ORFs) están localizados en una sola cadena del DNA viral. La cadena codificante contiene aproximadamente 8 ORFs traducibles, que se clasifican como tempranos (E) o tardíos (L), basados en la expresión de su genoma. La región temprana de *Papillomavirus* codifica proteínas regulatorias virales incluyendo aquellas necesarias para iniciación de replicación de DNA viral (genes exclusivamente tempranos E6 y E7, y los genes tempranos y tardíos E1, E2, E4, E5). Los ORFs exclusivamente tardíos, L1 y L2, codifican las proteínas de la cápside viral y están expresadas solamente en células infectadas productivamente. Existe una región de aproximadamente 1 kb, que no contiene ORFs y ha sido referida como región larga de control (LCR). Dicha región contiene el origen de replicación del DNA viral, así como elementos importantes en la regulación transcripcional (Bernard H. U., 2002).

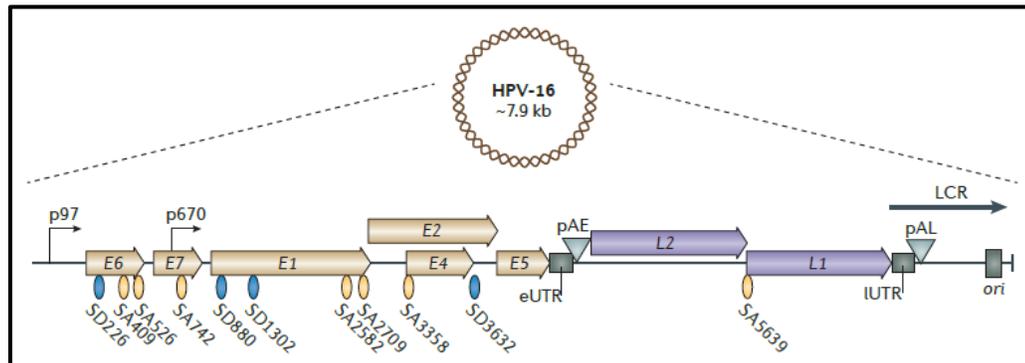


Figura 1. Mapa del genoma de la cepa de referencia VPH16 y los principales sitios de *splicing* (Tomado de Johansson C., 2013).

CICLO REPLICATIVO DE VPH

El ciclo de replicación de VPH está estrictamente enlazado al estadio de diferenciación del queratinocito infectado. Comienza en el estrato basal del epitelio de la mucosa cuando las partículas virales entran en micro lesiones, lo que permite el anclaje inicial del virión a la membrana basal a través de un probable receptor (heparán sulfato) (Chow L. T., 2010).

Las proteínas tempranas E1 y E2 median la replicación del genoma viral a niveles bajos. Conforme la célula infectada por VPH en la capa basal se divide, una célula hija se mueve a la capa superior y empieza a diferenciarse. Las proteínas E6 y E7 estimulan el crecimiento celular, lo cual crea un ambiente intracelular que permite la replicación continua del DNA viral, así como una expresión incrementada de genes tempranos. Los altos niveles de la proteína E2 eventualmente disminuyen los niveles de E6 y E7 y permite a la célula diferenciarse, entrando al estadio dependiente de diferenciación del ciclo de replicación de VPH. Este cambio está caracterizado por altos niveles de la proteína viral E4, la cual se ha propuesto que facilita la liberación de la progenie de viriones.

Las proteínas L1 y L2 son producidas al final de la infección y ensamblan a los viriones en el estrato más alto y diferenciado del epitelio. De manera interesante, las proteínas de unión a RNA como las proteínas ricas en serina-arginina (SR), las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs) A1, A2/B1, H, HuR, CSTF64 y CUGBP1 están altamente expresadas en estratos de células basales y medias del epitelio, pero disminuyen cuando se inicia la diferenciación celular terminal (Doorbar J., 2005; Johansson C., 2013).

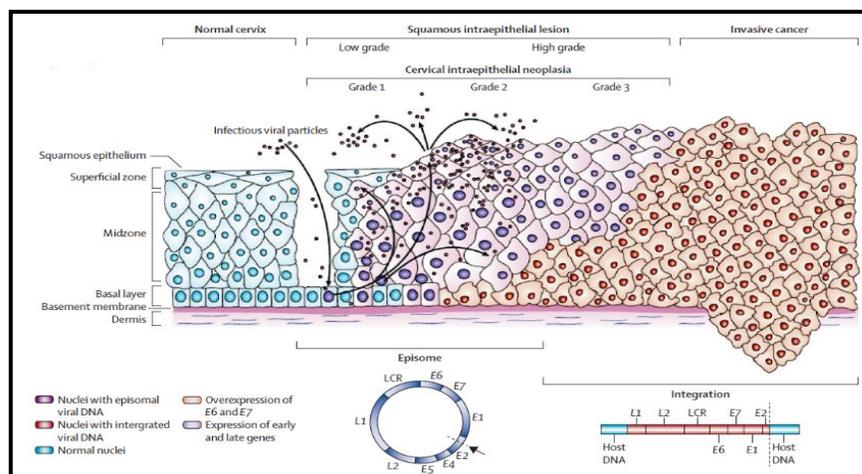


Figura 2. Ciclo replicativo durante la infección productiva por VPH y organización de su genoma (Tomado de Crosbie E. J., 2013).

ONCOPROTEÍNAS VIRALES E6 Y E7 EN LA CARCINOGENESIS CERVICAL.

La actividad de transformación primaria de VPH-AR es proporcionada por las oncoproteínas E6 y E7. Estas proteínas pequeñas, de aproximadamente 18 y 13 kDa de tamaño, respectivamente, actúan cooperativamente en el desarrollo de cáncer inducido por VPH. Ambas oncoproteínas se expresan preferencialmente en las células cancerosas, en donde los genomas de VPH16 están cromosómicamente integrados y se encuentran río abajo del gen E7, pero la integración elimina la expresión de E2. En consecuencia, se desregulan los oncogenes virales, contribuyendo a un fenotipo más agresivo de cáncer (Francis D. A., *et al.*, 2000; Tommasino, M., 2014).

E6 es una proteína básica rica en cisteínas con aproximadamente 150 aminoácidos. Las mayores características estructurales de E6 son la presencia de dos regiones de unión a zinc (E6N y E6C) y un dominio de unión a PDZ. Ambos dominios contienen motivos de cisteína (CXXC), los cuales son conservados en las proteínas E6 de todos los tipos de VPH. Las proteínas E6 inhiben el arresto de crecimiento y apoptosis dependiente de p53 en respuesta a proliferación aberrante mediante dos mecanismos: la formación de un complejo trimérico (E6-E6AP-p53) resulta en la degradación de p53, y la interacción de E6 con p300, CBP y ADA3 previenen la acetilación de p53, inhibiendo la transcripción de genes de respuesta a p53. Todo ello, resulta en la inducción de inestabilidad genómica y la acumulación de mutaciones celulares.

La proteína E6 también inhibe la señalización apoptótica en respuesta a citosinas de supresión de crecimiento a través de la interacción con el TNFR1, FADD y caspasa 8, y mediante la degradación de las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK. E6 favorece la degradación de proteínas PDZ llevando a la pérdida de polaridad celular e inducción de hiperplasia. La interacción de E6 con PAK, paxilina y fibulina previene la anoikis y permite

el crecimiento celular en ausencia de anclaje a la matriz extracelular. La interacción de E6 con SP1, MYC y NFX123 activa a la telomerasa y su subunidad TERT, previniendo el acortamiento de los telómeros en respuesta a proliferación persistente y promueve la immortalización. (Huibregtse, J. M., *et al.*, 1991; Howie, H. L., *et al.*, 2009; Moody C.A., *et al.*, 2010).

E7 es una fosfoproteína ácida de aproximadamente 100 aminoácidos que contiene dominios de unión a zinc. Estructuralmente está dividida en 3 dominios: regiones conservadas 1-3 (CR1-3). CR2 de varias proteínas E7 incluyen un sitio de fosforilación por la cinasa caseína tipo II. La misma región contiene un motivo LXCXE que media la interacción el supresor de tumor pRB1 y sus proteínas relacionadas, p170 y p130. Promueve la inhibición de estas proteínas, altera el arresto del ciclo celular en la fase G1-S y la activación constitutiva de los genes inducidos por E2F. E7 afecta a la expresión de genes por medio de la interacción con las proteínas HDACs y E2F6. E7 altera aún más el control del ciclo celular mediante la inhibición de p21 y p27, estimulan la síntesis de centrosoma anormal a través de aumento de la actividad CDK2 y mediante la interacción con γ -tubulina, lo que lleva a un mayor riesgo de inestabilidad genómica. La interacción de E7 con p60 impide anoikis e interactúa con componentes de la respuesta de IFN, como IRF1 y p48, contribuyendo a una infección persistente (McLaughlin-Drubin, M. E., *et al.*, 209; Moody C.A., *et al.*, 2010).

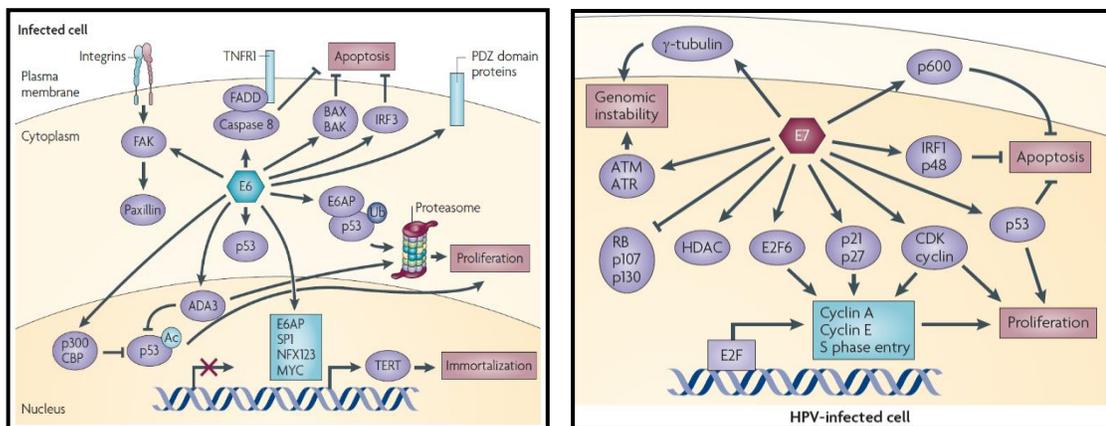


Figura 3. Proteínas celulares y vías de señalización alteradas por las oncoproteínas virales E6 y E7 de VPH16 (Tomado de Moody C. A., *et al.*, 2010).

SPLICING ALTERNATIVO EN VPH16

El *splicing* alternativo es un mecanismo complejo que involucra la eliminación de intrones y exones, mediante la selección de exones alternativos, y requiere la definición de exón e intrón para llevarse a cabo. Cerca de ~40-80% de los genes humanos sufren *splicing* alternativo. Este proceso permite una amplificación del transcriptoma y el proteoma de la célula, la producción de expresión específica durante el desarrollo y en tejido específico (Matlin, A. J., *et al.*, 2005).

En estadios tempranos del ciclo replicativo viral, la transcripción desde el promotor p97 genera mRNAs que codifica todos los genes tempranos, los cuales son poliadenilados en la señal temprana de poliadenilación (pAE). Estos mRNAs policistrónicos, los cuales están compuestos de exones e intrones, son sujetos a *splicing* alternativo a través del uso diferencial de varios sitios tempranos de *splicing*. Los sitios de *splicing* SDS880, SDS3632 y SAS5639 son usados para el *splicing* de mRNAs tardíos. Los sitios de *splicing* SDS226, SAS409, SAS526 y SAS742 están enlazados exclusivamente al p97, localizado en la LCR. Por lo tanto, los mRNAs expresados desde p97 tienen el potencial de expresar las oncoproteínas E6 y E7, así como E1, E2, E4 y E5. Son cuatro los transcritos generados en la región de los genes tempranos utilizando alternativamente los sitios de *splicing* 3' que contiene el intrón 1 (Fig. 5).

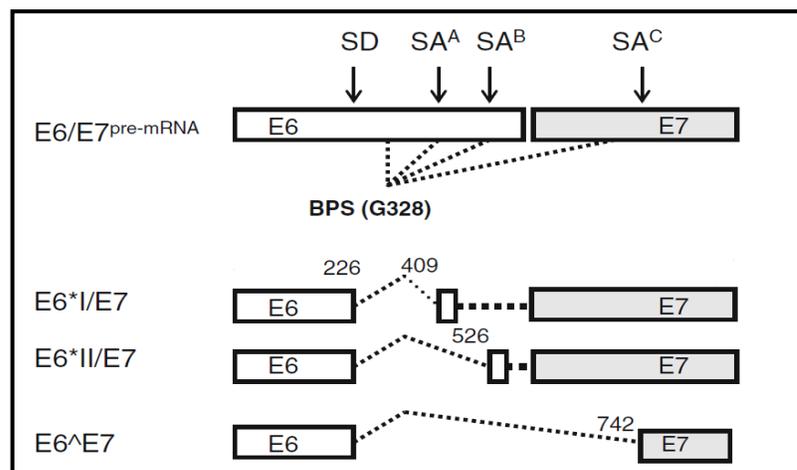


Figura 4. Representación esquemática de los principales transcritos producidos por AS en VPH16 (Tomado de del Moral O., *et al.*, 2010).

Cuando la célula infectada se diferencia y el virus se encuentra episomal, el promotor tardío p670 se activa, y la expresión desde este promotor sobrepasa los genes *E6* y *E7* e induce la alta expresión de mRNAs de *E1*, *E2* y *E4* usando primariamente los sitios de *splicing* SDS880, SAS2709 y SAS3358. Estos mRNAs también son poliadenilados en el pAE. Las proteínas E1 y E2 se unen al origen de replicación, el cual está localizado en la LCR, para replicar el genoma de DNA viral. La diferenciación terminal de la célula hospedera desregula la actividad de pAE, resultando en cambio de lectura dentro de la verdadera región tardía del genoma (codificando L1 y L2) seguido por la poliadenilación en la señal de poliadenilación tardía (pAL) para generar mRNAs de L2. La desrepresión de los sitios de *splicing* exclusivamente tardíos SDS3632 y SAS5639 genera mRNAs *L1* y *L2*. Cada señal de poliadenilación está precedida por un UTR que, cuando se transcribe, contiene elementos de RNA los cuales determinan la eficiencia de poliadenilación, traducción y la vida media del mRNA (Johansson C., & Schwartz S., 2013).

Los *Papillomavirus* utilizan el *splicing* alternativo para varios propósitos. Muchos de los sitios de *splicing* son controlados por elementos regulatorios de RNA que determinan la eficiencia de sitio de *splicing*. Basados en el modelo de escaneo para la traducción de mRNA, establece que la presencia río arriba de codones AUG tiene un impacto negativo en el inicio de la traducción de codones AUG río abajo, en el *splicing* alternativo genera mRNAs con pocos codones AUG río arriba posibles para cada gen de VPH (Graham S. V. 2008; Johansson C., & Schwartz S., 2013).

PROTEÍNAS SR

Los factores de *splicing* ricos en serina-arginina (proteínas SR) son una familia conservada de proteínas de unión a RNA esenciales en la biogénesis de RNA mensajeros. Estructuralmente, contienen un dominio modular consistente en uno o dos motivos de unión a RNA (RRM) y un dominio C terminal rico en repetidos dipéptidos de serina y arginina (SR). Actúan

seleccionando sitios de *splicing* para el reconocimiento por el *spliceosome* por medio de su unión a elementos *enhancer* de *splicing* exónico (ESE) promoviendo o desestabilizando las interacciones de proteínas con los componentes del *spliceosome*. Las proteínas SR se unen a secuencias degeneradas largas de 4-8 nucleótidos, su unión favorece sitios de *splicing* débiles y fortalece tales secuencias durante el *splicing* constitutivo (Howard, J. M., & Sanford, J. R., 2015).

Se conocen 12 miembros canónicos de la familia de proteínas SR que comparten el mismo dominio, y algunas como SRSF1, tienen un transporte de núcleo a citoplasma y viceversa. Las modificaciones post-traduccionales tienen una función importante en la localización y actividades de las proteínas SR. La fosforilación está regulada por las familias de proteínas cinasas específicas de SR (SRPK) y otros miembros de la familia de cinasas CMGK (como Clk/Sty). El dominio RS sufre constante fosforilación que incrementa la especificidad de unión al RNA y es importante para la interacción específica proteína-proteína entre el *spliceosome*. Las proteínas SR se localizan en subregiones nucleares denominadas *speckles* y para liberarse, deben ser fosforiladas por Clk/Sty. Una vez ensamblado el *spliceosome*, pueden ser fosforiladas por Clk/Sty y SRPK nucleares para rondas adicionales del *splicing* de pre-mRNA o ser defosforilado y asociarse con mRNA que sufre *splicing*. El transcrito maduro procede al exporte nuclear y traducción, donde las proteínas SR son fosforiladas por SRPK citoplasmáticas, facilitando su interacción con transportina-SR y regresar al núcleo (Howard, J. M., & Sanford, J. R., 2015; Aenkoe, M. L., *et al.*, 2014).

Las proteínas SR también facilitan la degradación mediada sin sentido (NMD) estimulando la deposición del complejo de unión a exón (EJC) en un dominio RS de manera dependiente. Estas proteínas permanecen asociadas a su RNA blanco después de que el *splicing* está completo o puede unirse a mRNAs que sufrieron *splicing* para actividades posteriores. Como proteínas adaptadoras, reclutan a TAP/NFX1 para el exporte nuclear, únicamente

cuando se encuentran hipofosforiladas. Además, estimulan la traducción promoviendo la entrada de mRNAs a los polisomas y el procesamiento de miRNAs. La eliminación de *SRSF1* lleva a la muerte de células de pollo DT40 y es letal durante el desarrollo de gusano y ratón, indicando que funciones esenciales son específicas para una etapa de desarrollo o un tipo celular (Aenkoe, M. L., *et al.*, 2014; Howard, J. M., & Sanford, J. R., 2015).

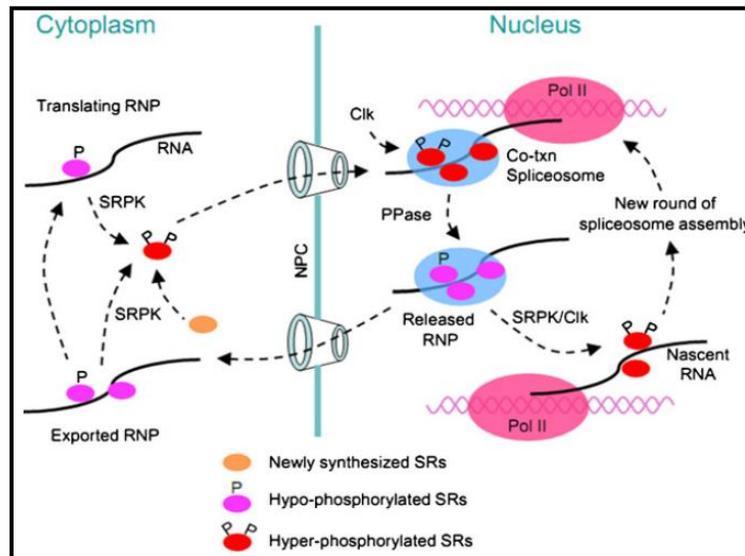


Figura 5. Las modificaciones post-traduccionales en el dominio SR de las proteínas SR dictan su localización y función celular (Tomado de Dvinge H., *et al.*, 2016).

1.1 SRSF1: ROL EN CÁNCER

La proteína prototipo SRSF1 (antes llamada SF2/ASF) es uno de los factores de splicing más conservados en su función. Estructuralmente en su dominio N terminal contiene 2 RRM's separados por una región *linker* rica en glicinas, mientras que el dominio C terminal contiene un dominio SR con alrededor de 30 serinas unidas a prolinas o argininas. Ambos dominios son importantes para su unión específica al mRNA y la interacción con otras proteínas, respectivamente (Aubol, B. E., *et al.*, 2013). Participa en la biogénesis de los mRNAs: favorece el *splicing* alternativo, estabilidad, transporte núcleo-citoplasma, regulación de traducción, degradación y producción de miRNAs (Aenkoe, M. L., *et al.*, 2014). Adicionalmente, SRSF1 se autoregula negativamente a través de mecanismos post-transcripcionales

(Sun *et al.*, 2010). La eliminación del gen *SFRS1* desencadena inestabilidad genómica, arresto del ciclo celular y apoptosis (Xu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005).

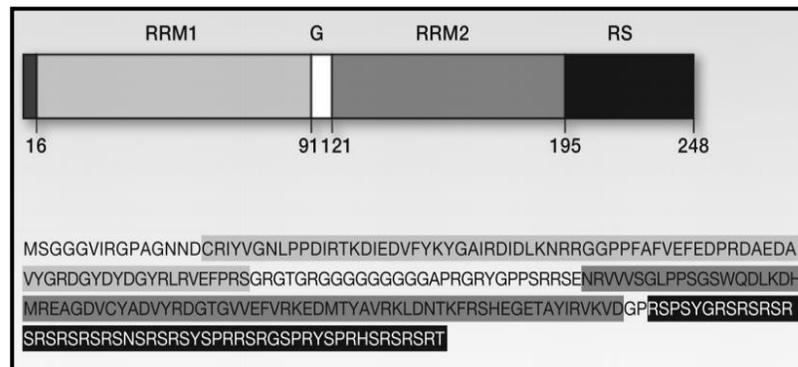


Figura 6. Estructura del dominio modular de SRSF1 (Tomado de Das S. y Krainer, A. R., 2014).

Los niveles de expresión de SRSF1 se han encontrado incrementados en diversos tumores, como mama, pulmón, colon, próstata, ovario, entre otros. El gen *SRSF1* está localizado en el cromosoma 17q23, un locus comúnmente amplificado y un incremento en el número de copia de DNA correlaciona con niveles elevados de mRNA de *SRSF1*. Se demostró que la ligera *sobre-expresión* de *SRSF1* resulta en transformación oncogénica de fibroblastos inmortalizados de ratón y células epiteliales mamarias humanas, las cuales adquieren alta capacidad proliferativa, resistencia a apoptosis y formación de tumores malignos sobre el trasplante ortotrópico en modelos murinos. Estos datos demuestran su papel como proto-oncogén (Sinclair C. S., *et al.*, 2003; Das S. y Krainer, A. R., 2014).

El gen *SFRS1* es un blanco de MYC, que es un potente oncogén *sobre-expresado* en tumores, se une directamente al promotor de *SFRS1* y activa su transcripción. La proteína Sam68 fosforilada (por la vía ERK/cinasa MAP) promueve la formación de transcritos, incrementando los niveles de SRSF1. Además, la respuesta a estrés modula la localización de SRSF1, cuando el *splicing* constitutivo es inhibido pero los eventos de *splicing* alternativo continúan. La hiperfosforilación de SRSF1 es observada durante la respuesta a daño al DNA, causando distribución subnuclear alterada y cambios en los patrones de *splicing* alternativo en sus genes blanco (da Silva, M. R., *et al.*,

2015).

En un modelo de tumor mamario, se concluyó que SRSF1 ejerce preferencialmente la activación de *splicing* por la unión directamente a sus blancos de pre-mRNAs, mientras que la represión de *splicing* probablemente refleja una mezcla de interacciones de unión directas e indirectas que involucran otros reguladores, como las hnRNPs (Anczuków, O. *et al.*, 2015). La *sobre-expresión* de SRSF1 podría contribuir a la tumorigénesis por la influencia de tasa traduccional de componentes claves de la maquinaria del ciclo celular, tales como las proteínas de huso mitótico, cinetocoro y de fase M (Maslon, M. M., *et al.*, 2014).

La proteína SRSF1 altera el *splicing* del receptor tirosina cinasa RON, promoviendo la omisión del exón 11. Las isoformas generadas inducen la transición epitelio-mesénquima (EMT) y potencia la motilidad celular (Ghigna C., *et al.*, 2005). El exceso de SRSF1 promueve un incremento de variantes de la cinasa S6 1 (S6K1). Estas formas truncas pueden unirse y activar al complejo mTOR, llevando a la fosforilación de eIF4EBP1, liberándolo de su efecto inhibitorio en la traducción dependiente de cap (Iborra S., *et al.*, 2013). SRSF1 regula el *splicing* y asociación del polisoma de transcritos derivados de los genes *SRSF1*, *PABPC1*, *NETO2* y *ENSA*. Adicionalmente, SRSF1 potencia la traducción de β -catenina a través de la activación del complejo mTOR, promoviendo la señalización de Wnt, un contribuidor importante de oncogénesis (Sanford J. R., *et al.*, 2008; Das S. y Krainer, A. R., 2014).

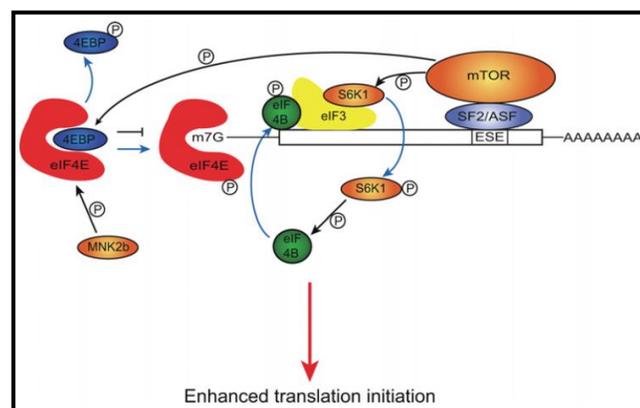


Figura 7. Función de SRSF1 en promover la traducción (Tomado de Long J., *et al.*, 2009).

En fibroblastos embrionicos de ratón deficientes en *SRSF1* o *SRSF2*, se sugirió que el resultado de *splicing* de un exón en particular, depende de las actividades de muchos otros reguladores de *splicing*, incluyendo otras proteínas SR. Así, las proteínas SR muestran especificidad, sino también una cierta redundancia en sus funciones y otras proteínas SR puede compensar la reducción de la expresión de uno de los miembros de la familia (Pandit S., *et al.*, 2013). La disminución de la expresión de *SRSF1*, produce una alteración de los niveles de expresión de otros factores de *splicing*, por ejemplo, hnRNP A2/B1, hnRNPA1, hnRNP A, SRSF3, entre otros (Sanford J. R., *et al.*, 2008).

RELACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SR EN EL *SPLICING* ALTERNATIVO DE VPH16

Son pocos los estudios donde relacionan a las proteínas SR en el papel de *splicing* alternativo de VPH16. Los niveles de expresión de las proteínas SR y hnRNPs es diferencial en estrato de epitelio cervical infectado por VPH (con una tendencia a disminuir conforme aumenta la capa celular) respecto al tejido cervical normal. Los niveles de expresión de algunos factores de *splicing* incrementaron en lesiones, siendo la mayor expresión mostrada en cáncer cervical (Fay, J., *et al.*, 2009). Se demostró que SRSF1 es regulado transcripcionalmente por la proteína viral E2, facilitando la expresión de proteínas tardías de la cápside y terminación del ciclo viral (Mole S., *et al.*, 2008). Los factores de *splicing* SRSF1 y SRSF3 se une a un ESE requerido para el uso eficiente del SAS3358 al inicio del ORF de E4, pero disminuye el uso de los sitios de *splicing* tempranos (en E6/E7) (Rush M., *et al.*, 2005; Somberg M., & Schwartz S., 2010). En un modelo de progresión de tumor cervical, se encontró que SRSF1, SRSF2 y SRSF3 están específicamente incrementados en la infección de VPH16, indicando un papel oncogénico de estos factores. Los niveles incrementados de estos factores de *splicing*, especialmente SRSF1, podrían ser controlados por la infección viral para la regulación de expresión de genes virales y predisponer a las células para ser transformadas (Mole S., *et al.*, 2009). En línea celular de CaSki, se observó

que el *knockdown* de *SRSF2* disminuyó la proliferación celular, reducción de formación de colonia e incremento en la apoptosis, además que *SRSF2* podría mantener la estabilidad de los mRNAs de E6/E7 (McFarlane M., *et al.*, 2015).

ANTECEDENTES DIRECTOS

En nuestro laboratorio, se ha descrito que la expresión de algunos factores de *splicing* es heterogénea en líneas de tumores de cáncer cervical. La proteína *SRSF1* mostró mayores niveles de proteína en las líneas celulares CaSki y HeLa, que contienen alto número de copias integradas de VPH de alto riesgo (16 y 18) y resistencia a UV y Cis-platino (datos no publicados). En contraste, en las líneas celulares SiHa (1-2 copias integradas de VPH16+) y C-33 A (VPH negativo), se observaron niveles de proteína diferenciales respecto a CaSki y HeLa. Además, los transcritos producidos por el intrón 1 del bicistrón de mRNA *E6/E7* se expresan heterogéneamente en tumores y líneas celulares de cáncer cervical. En este intrón existen sitios de *splicing* subóptimos, donde el nivel mayor de proteína E7 se produce por el transcrito menos prevalente (el pre-mRNA *E6/E7*), y cerca del 80% de este transcrito se procesa alternativamente (del Moral-Hernández. O., *et al.*, 2010).

En variantes de VPH16, solamente un SNP es suficiente para alterar el sitio de unión de al menos algún factor de *splicing*, cambiando la habilidad de estas proteínas para unirse al transcrito (López-Urrutia, E., *et al.*, 2012). Por análisis de espectrometría de masas en extractos nucleares de HeLa, se encontró que alrededor de 170 proteínas se unen al intrón 1, de las cuales el 80% fueron proteínas de unión al RNA, incluyendo las proteínas hnRNPA1, hnRNPA2, *SRSF3*, *PTB1*, *TIAR*, entre otras (Martínez-Salazar, M., *et al.*, 2014).

Debido a la heterogeneidad de expresión de transcritos de VPH16 en tumores y líneas celulares, y el perfil diferencial de expresión de factores de *splicing*, es importante conocer qué papel tiene *SRSF1* sobre los niveles de transcritos de VPH16 y de otros factores de *splicing* que se han encontrado unidos al bicistrón de *E6/E7*.

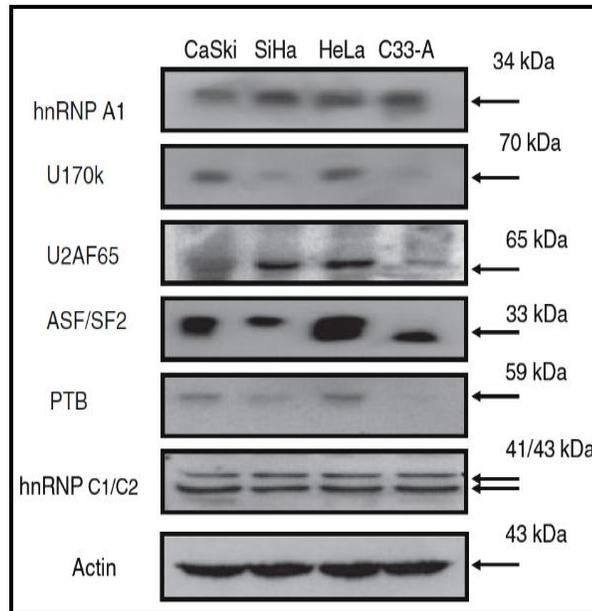


Figura 8. Niveles de expresión relativa de factores de *splicing* detectados por *Western Blot* en diversas líneas de cáncer cervical (del Moral-Hernández O., *et al.*, 2010).

HIPÓTESIS

La expresión de la proteína SRSF1 altera los niveles de los transcritos de E6/E7 de VPH16 y de algunos factores de *splicing*.

OBJETIVOS

Objetivo general

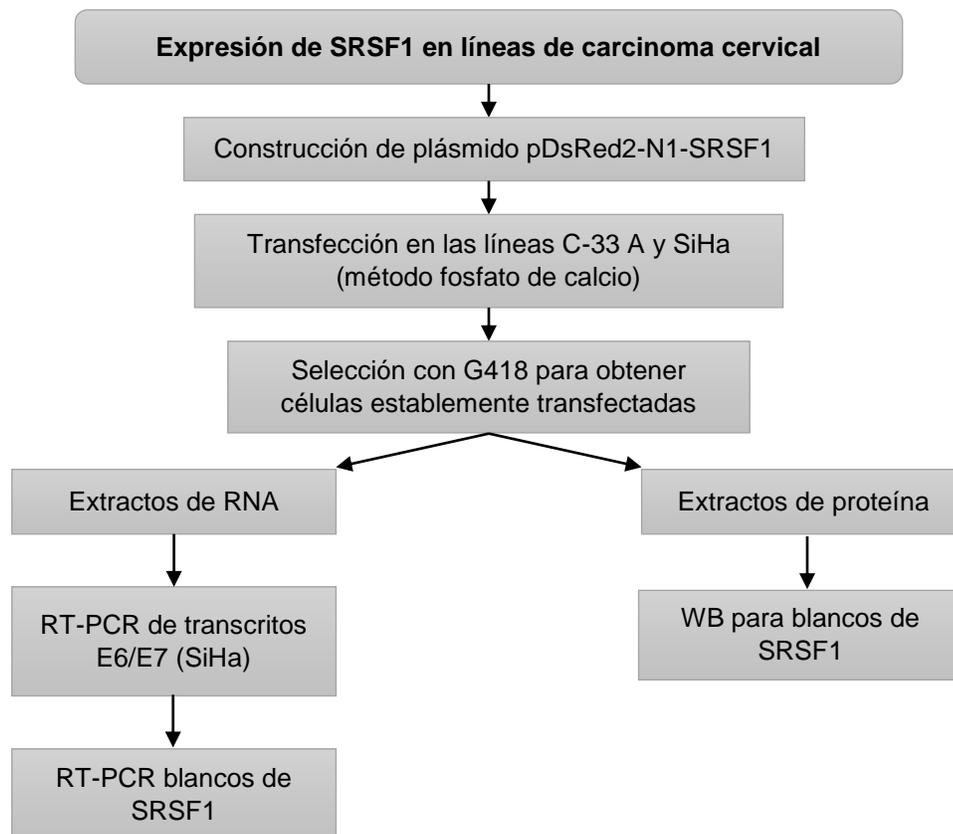
Evaluar el efecto de la expresión de SRSF1 en los niveles de los transcritos de E6/E7 de VPH16 y de otros factores de *splicing* en líneas celulares de cáncer cervical.

Objetivos específicos

1. Clonar y construir un plásmido para la expresión de SRSF1 en las líneas celulares SiHa y C-33 A.
2. Analizar los niveles de transcritos de E6/E7 en la línea celular SiHa transfectada con SRSF1-Red.
3. Comprobar la alteración de niveles de transcritos y de proteína de factores de *splicing* que son blancos de SRSF1.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

- Para llevar a cabo la expresión ectópica del factor de *splicing* SRSF1, mediante RT-PCR se amplificó el cDNA; posteriormente, se clonó en un vector intermedio pCloneJet1.2/blunt para células procariotas. Se hizo una restricción enzimática con BamHI y HindIII y se subclonó en un plásmido para células eucariotas pDsRed2-N1 (el mRNA de SRSF1 eliminando su codón de paro y unido en fase con la proteína roja fluorescente). Se corroboró la construcción por secuenciación.
- Se procedió a transfectar con el plásmido obtenido en líneas celulares C-33 A y SiHa, utilizando el método de fosfato de calcio.
- Se extrajo el RNA para llevar a cabo la reacción de RT-PCR para amplificar los transcritos de E6/E7, así como RNAs blancos de las proteínas SRSF1. Se detectaron los niveles de proteína de los blancos de las proteínas SR, mencionados anteriormente, por *Western Blot*.



Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las líneas celulares de C-33 A (VPH negativo) derivada de un carcinoma epiteloides, SiHa (contiene 1-2 copias integradas de VPH16) derivada de carcinoma epitelial, y HeLa (contiene 400-600 copias integradas de VPH18) derivada de un adenocarcinoma, se crecieron en medio MEM adicionado con 10% de SFB y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) a 37°C y un 5% de CO₂. La línea celular CaSki (contiene ~500 copias integradas de VPH16) derivada de carcinoma epitelial se creció en medio RPMI con los mismos suplementos (más 1% de aminoácidos esenciales) y en las condiciones mencionadas anteriormente.

Transfección con método de fosfato de calcio

Las células se cultivaron en placas de pozos durante 48 hrs o hasta alcanzar un 80% de confluencia. La transfección se efectuó por el método de fosfato de calcio (modificado de Jordan y Wurm, 2004), el cual se basa en la formación de un precipitado dado por DNA y fosfato de calcio, adhiriéndose a las células para facilitar su entrada. Se utilizó a una concentración de 10 µg/ml del plásmido debidamente purificado por pozo conteniendo 600,000 células C-33 A o SiHa. El precipitado de Ca₂PO₄ fue retirado después de 5 horas por cambio de medio de cultivo. Se hizo una doble selección con G418 (geneticina) a una concentración de 50 µg/ml durante 3 semanas, se retiró el antibiótico durante 3 semanas y nuevamente se incorporó G418 por 3 semanas más.

Extracción de RNA y tratamiento con DNAsa

La extracción de RNA se hizo con el método de TRIzol, a partir de cultivos con >80% de confluencia (15x10⁶ de células). Se efectuaron los lavados con PBS1X, se adicionó 1 ml del reactivo por pozo y procedió con el raspado de la monocapa. Se agregó 200 µl de cloroformo, centrifugación por 15 min a 12,000 rpm a 4°C y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó el RNA con 500 µl de isopropanol y posterior centrifugación, se lavó con etanol al 70%. Se centrifugó adicionalmente 5 min a 12,000 rpm a 4°C, la pastilla se secó (el

tubo se colocó destapado y cubierto con una sanita durante 30 min), y se resuspendió en 50 µl de H₂O libre de nucleasas. Se verificó la integridad del RNA por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% con TAE1X.

Para el tratamiento con DNAsa para eliminación del DNA genómico remanente, se adicionó 5 µl del amortiguador de DNAsa 10X y 1 µL de enzima DNAsa. Posteriormente se incubó por 1 hora a 37°C. Nuevamente, se adicionó 1 µl de enzima DNAsa y se incubó por 1 hora a 37°C. Inmediatamente, se agregó 5 µl de reactivo de inactivación y se incubó por 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 1 min a 10,000 rpm, se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo limpio. Finalmente, el RNA se corrió en un gel de agarosa al 1% para verificar su integridad.

Retro-Transcripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

La reacción de retrotranscripción (RT) se llevó a cabo utilizando el RNA libre de DNA (10 µg) de las líneas celulares transfectadas y sus controles, en una mezcla con 3 µl de 10 µM oligo dT, 10 µl de 200 µM dNTPs y se completó a un volumen de 25 µl con agua libre de nucleasas. Se incubará a 70°C durante 5 min. Posteriormente, se adicionó una mezcla con 10 µl de amortiguador 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl y 15 mM MgCl₂), 5 µl de 0.1 M Dithiothreitol (dTT) y se llevó a un volumen de 50 µl con agua libre de nucleasas, incubándolo a 42°C 2 min. Se separaron 5 µl (RT-) y se adicionó 2 µl de la retrotranscriptasa (200 U/µl) (SuperScript II, Invitrogen). Se incubó la mezcla a 42°C durante 1 h y 30 min para llevar a cabo la reacción y a 70°C durante 5 min para inactivación. Para la PCR, se utilizó 1 µl de cDNA como templado para la amplificación de los transcritos de E6/E7 (E6/E7 E6/E7^{pre-mRNA}, E6*I, E6*II y E6^E7) y los genes blanco de SRSF1, en una mezcla de los siguientes reactivos: 10 µl de buffer 10X, 2 µl de 50 mM MgCl₂, 10 µl de 200 µM dNTPs, 0.25 µl de Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen), 1 µl de 10 µM oligonucleótido sentido y 1 µl de 10 µM oligonucleótido antisentido (tabla 1), y se llevó a un volumen final de 50 µl con agua libre de nucleasas. Las

condiciones de la reacción de PCR fueron: 1 ciclo a 92°C por 2 min, 30 ciclos de 92°C por 20 seg, 55°C (dependiendo del alineamiento de los primers) por 20 seg y 72°C por 45 seg, finalizando con 1 ciclo de 72°C durante 7 min. La reacción se llevó a cabo en el termociclador *Thermal Cycler 2720* (Applied Biosystem). Los productos de PCR se detectaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en TAE1X y se visualizaron en un transiluminador UV.

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos (sentido y antisentido) utilizados en el estudio.

Gen	Tamaño (pb)	Secuencia	%GC	Tm (°C)	Producto (pb)
Actina Fw	23	GAAGAGCTACGAGCTGCCTGACG	60.9	45	309
Actina Rv	20	CACACGGAGTACTTGCCTC	60		
Condiciones		92° por 20s; 45° por 20s; 72° por 45s; 25 ciclos			
SRSF1 Fw	27	AAGCTTATGTCGGGAGGTGGTGT GATT	48.1	55	758
SRSF1 Rv	31	GGATCCCGTGTACGAGAGCGAG ATCTGCTAT	54.8		
Condiciones		92° por 20s; 55° por 20s; 72° por 50s; 45 ciclos			
E6beginFw	27	CCACCATGCACCAAAAAGAGAACT GCAA	48.1	50	Full: 776 E6*I: 592 E6*II: 475 E6^E7: 270
E7endRv	21	TGGTTTCTGAGAACAGATGGG	47.6		
Condiciones		92° por 20s; 50° por 20s; 72° por 1 min; 45 ciclos			
SRSF3 Fw	24	ATGGCAACAAGACGGAATTGGAA C	46	57	189
SRSF3 Rv	24	CATTGACAGTTCCACTCTTACAC	46		
Condiciones		92° por 20s; 57° por 20s; 72° por 30 s; 30 ciclos			
hnRNPA1 Fw	23	TGGTGGTGGATATGGTGGCAGTG	56.5	55	A: 225
hnRNPA1 Rv	22	GAACCGCCATAGCCACCTTGGT	59.09		B: 381
Condiciones		92° por 20s; 57° por 20s; 72° por 45 s; 25 ciclos			
hnRNPA2B1 Fw	24	AAATCGGGCTGAAGCGACTGAGT C	54	55	A2: 162
hnRNPA2B1 Rv	24	GCAGGATCCCTCATTACCACACA G	54		B1: 198
Condiciones		92° por 20s; 55° por 20s; 72° por 35 s; 30 ciclos			
TIAR F	26	ATGAAAGTGCAGCCCATGCCA TTGTT	46	50	145
TIAR R	25	TGGCTCCATTGGCCCCATTGACT AT	52		
Condiciones		92° por 20s; 50° por 20s; 72° por 30 s; 30 ciclos			

Ensayo de inmunofluorescencia

Para llevar a cabo la inmunofluorescencia, una caja de T25 de las células transfectadas, se lavó dos veces con PBS1X, se despegaron y resuspendieron en 5 ml de medio. Se pasó a un tubo Falcon de 15 ml, centrifugó a 1500 rpm 5 min a temperatura ambiente. Se repitió el lavado en el botón. Se adicionó 2 ml de medio y se contaron 150,000 células en la cámara de Neubauer. Se colocó por goteo el volumen equivalente en un cubreobjetos colocado en una placa de 12 pozos. Se adicionaron 2 ml adicionales de medio y se dejaron creciendo 24 h. Al día siguiente, se lavó con PBS1X a temperatura ambiente. Se retiró y adicionó PFA al 4% (diluido con PBS1X a 4°C). Se incubó por 15 min (a partir de este momento, se mantuvo siempre cubierto de la luz). Se retiró el exceso de PFA, se lavó con PBS1X por 5 min. Se eliminó el PBS1X, se agregó el DAPI diluido 1:1000 y se incubó por 5 min. Se lavó por 5 min con PBS1X. Se tomó el cubreobjetos, se sumergió varias veces en agua miliQ y se secó el exceso de líquido. Sobre el portaobjetos previamente etiquetado, se adicionó 5 µl de VectaShield Mounting y se depositó el cubreobjetos. Se fijó con barniz mezclado con resellador y guardó a -20°C. Se observaron en el microscopio confocal Olympus IX7, tomando de 2-3 imágenes en varios campos, con los objetivos 40X y 100X.

Ensayo de *Western Blot*

Para la obtención extractos proteicos, 15×10^6 células se cultivaron en cajas Petri de 100 mm. Hasta llegar a monocapa confluyente, las células se lavaron dos veces con PBS1X, se eliminó el exceso y se adicionó el reactivo M-PER 1X con inhibidores de proteasas (Complete). Se agitó vigorosamente en el rotor durante 10 min. Se raspó la caja, se homogenizó y el contenido se transfirió a un tubo Eppendor. Se centrifugó a 12,500 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo y se estimó el nivel de proteínas por el método de Bradford. Se tomaron aproximadamente 50 µg de proteínas totales y se separaron por electroforesis en geles

desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 o 12% [H₂O desionizada, amortiguador Tris pH 8.8 1.5 M/Tris pH 6.8 1 M, SDS al 10%, mix de acrilamida 30% (29.2% de acrilamida y 0.8% de *N, N'*-metileno-bis-acrilamida), persulfato de amonio al 10% y TEMED]. Las proteínas se cargaron con el amortiguador de Laemmli 2X/4X y como marcador se utilizará el marcador *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific). Las proteínas fueron corridas en una cámara de electroforesis MIGHTY SMALL II FOR 8X7CM GELS (Amersham Biosciences) con un amortiguador de corrida, se electrotransfirieron en una membrana de PVDF (*Perkin Elmer*) utilizando un amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, 20% de metanol). Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con una solución de TBS1X-Tween-20 con 5% de leche descremada en polvo durante 1 hora y se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos. Se hicieron 3 lavados de 5 min con TBS1X-Tween-20 y, se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa anti-rabbit, anti mouse (diluidos 1:5,000) y anti goat (diluido 1:4,000), según corresponda el anticuerpo primario, durante 1 hora y 30 min respectivamente, usando TBS1X-Tween-20 con 5% de leche descremada en polvo. Se procedió con tres lavados durante 5 min con TBS1X y se reveló por quimioluminiscencia con el substrato *SuperSignal West Pico/Femto* (Sigma Aldrich), utilizando el equipo *ChemiDoc MP Imagen System* (Bio-Rad). Los anticuerpos y sus diluciones utilizadas fueron: anti RFP (AbCam) diluido 1:500, anti SF2 (Life Technology) diluido 1:1000, anti hnRNP A1 (Santa Cruz) diluido 1:10,000, anti hnRNP A2/B1, anti SRp20, anti TIAR (SantaCruz) diluidos 1:200, y anti PTB1 (Zymed) diluido 1:250 en TBS1X-Tween-20 con 5% de leche descremada en polvo. Como control de carga, se utilizó anti-actina (amablemente donado por el Dr. Manuel Hernández. Biología Celular-CINVESTAV-IPN) diluido 1:500.

RESULTADOS

- Construcción de pDsRed2-N1-SRSF1

La construcción del plásmido pDsRed2-N1-SRSF1 se llevó a cabo a partir de la amplificación por RT-PCR del ORF de SRSF1, utilizando como templado el cDNA de HeLa. Posteriormente, se clonó en *pcloneJet1.2/blunt* y se digirió con las enzimas BamHI y HindIII. El fragmento recuperado se subclonó en pDsRed2-N1 (el ORF de SRSF1 queda en fase con la RFP, es decir, se elimina el codón de paro de SRSF1 y el extremo C terminal de la proteína SR va unido al N terminal de la RFP). El plásmido construido se sometió a digestión con las enzimas anteriormente mencionadas y se corroboró por secuenciación (ver anexo 1).

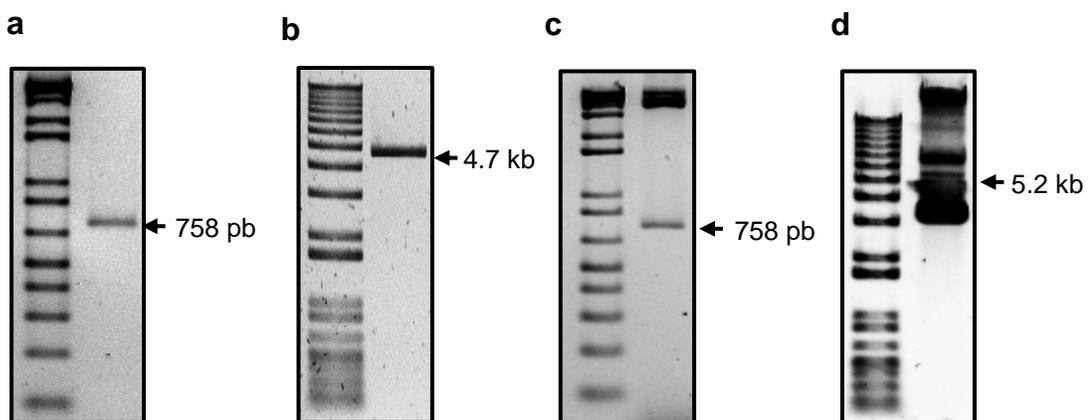


Figura 11. Construcción de pDsRed2-N1-SRSF1. a. RT-PCR de cDNA de SRSF1; b. Restricción enzimática de pDsRed2-N1; c. Restricción enzimática de pDsRed2-N1-SRSF1; d. electroforesis del pDsRed2-N1-SRSF1

Se procedió a transfectar las células C-33 A y SiHa. Las células se mantuvieron bajo selección con el antibiótico Genitcina (G418) durante 9 semanas. Una vez que las cajas con las células estuvieron confluentes, se procedió a extraer RNA y proteína.

- Inmunofluorescencia de RFP y SRSF1-RFP en líneas de carcinoma cervical transfectadas

Para comprobar la presencia de RFP y SRSF1-RFP *in vivo*, la microscopía confocal de fluorescencia mostró en C-33 A y SiHa transfectadas con pDsRed2-N1 (A y C), una expresión de RFP con diferentes intensidades

en el núcleo y citoplasma. Se calculó un porcentaje de transfección de 30 y 40%, mediante el uso de FACS, para C-33 A y SiHa transfectadas con pDsRed2-N1-SRSF1 (B y D), respectivamente. A pesar de que los niveles de expresión de la proteína de fusión (SRSF1-RFP) fueron bajos, se observó expresión predominante en el citoplasma de las células, en un patrón puntiforme, siendo más acentuado en SiHa.

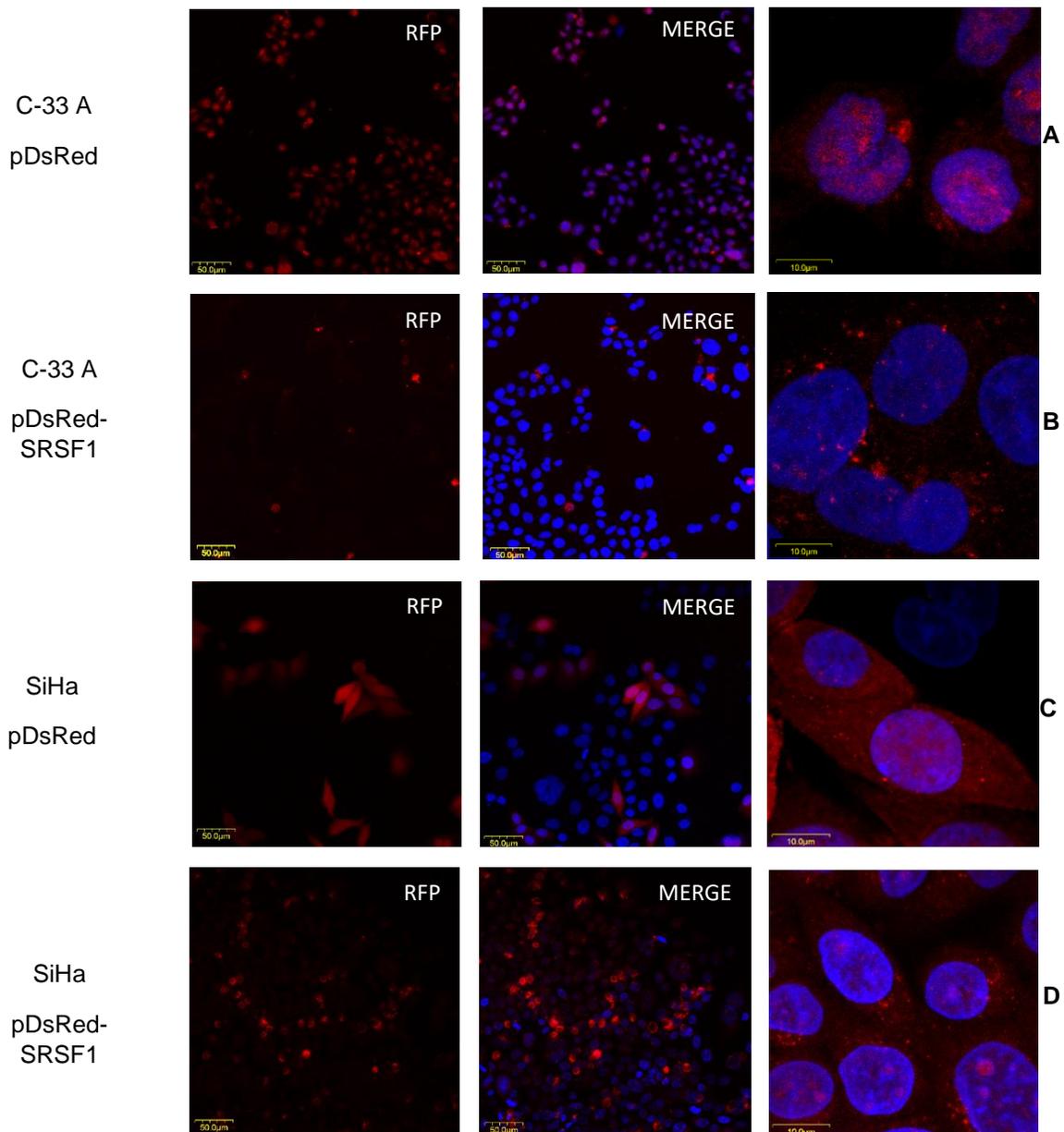


Figura 12. Fluorescencia para la localización *in vivo* de RFP y SRSF1-RFP. Las líneas celulares C-33 A y SiHa transfectadas establemente con el vector pDsRed y pDsRed-SRSF1 mostraron una notable intensidad de la RFP, a pesar de tener bajos niveles de eficiencia de transfección (~30-40%). Los núcleos se tiñeron con DAPI.

- Expresión de RFP y SRSF1 por *Western Blot* en líneas de carcinoma cervical transfectadas

Para observar la expresión de la RFP y la proteína de fusión *in vitro*, se efectuó un *Western Blot* para RFP y SRSF1. Los resultados muestran los tamaños aproximados de 27 kDa para RFP y 27/33 kDa para SRSF1. La fusión presentó un tamaño de ~64 kDa, esto es debido a que la extracción de proteínas totales se hizo directamente con solución de Laemmli 2X y conservó posiblemente la forma hiperfosforilada de la proteína (37 kDa). Ya que previamente, no fue detectada en extractos solubles, lo anterior sugiere que la proteína de fusión se encuentra en partículas de gran tamaño, y posiblemente se pierde en la fracción membranal al preparar los extractos solubles.

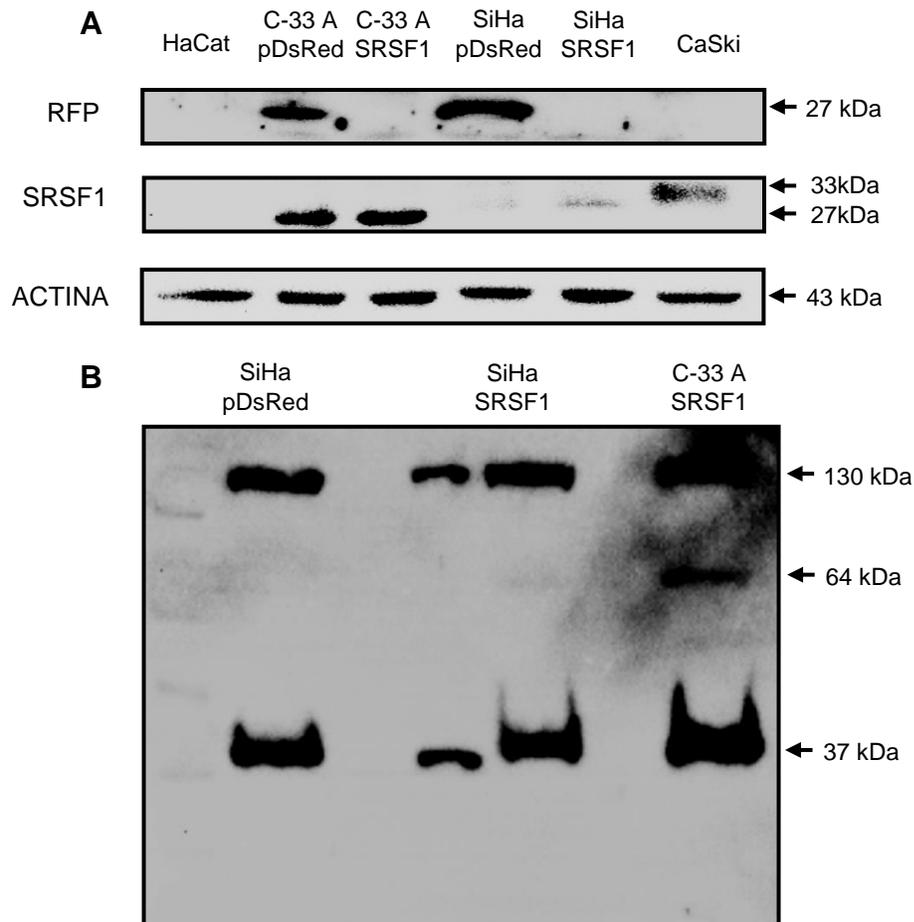


Figura 13. Niveles de proteína de RFP, SRSF1 y SRSF1-RFP por *Western Blot*. A) Niveles de proteína endógena de SRSF1 y RFP en las líneas celulares estudiadas. B) Niveles de proteína de fusión en las células transfectadas utilizando el anticuerpo anti-SF2. El tamaño esperado de la fusión era 54 kDa para C-33 A y 60 kDa para SiHa. Sin embargo, se observó un tamaño de 64 kDa. La banda de 130 kDa es inespecífica del anticuerpo. Los anticuerpos utilizados fueron anti-SF2 (*Life Technology*) y anti-RFP (*AbCam*). Como control de carga, se utilizó actina con una imagen representativa.

- La expresión de SRSF1 incrementa los niveles de transcritos de E6/E7 en SiHa

Para analizar los niveles de transcritos del bicistrón de E6/E7 ($E6/E7^{pre-mRNA}$, $E6^*I/E7$, $E6^*II/E7$ y $E6^{\wedge}E7$) en la línea celular SiHa, se llevó a cabo una RT-PCR utilizando los primers que amplifican el inicio del ORF de *E6* y el fin del ORF de *E7*. Se observó un ligero incremento en $E6/E7^{pre-mRNA}$, $E6^*I/E7$, $E6^*II/E7$ en SiHa transfectada con SRSF1 en comparación con el Mock. Sin embargo, no fue posible observar $E6^{\wedge}E7$, aunque este nunca ha sido detectado en SiHa y se expresa en niveles bajos en CaSki (del Moral O., *et al.*, 2010)

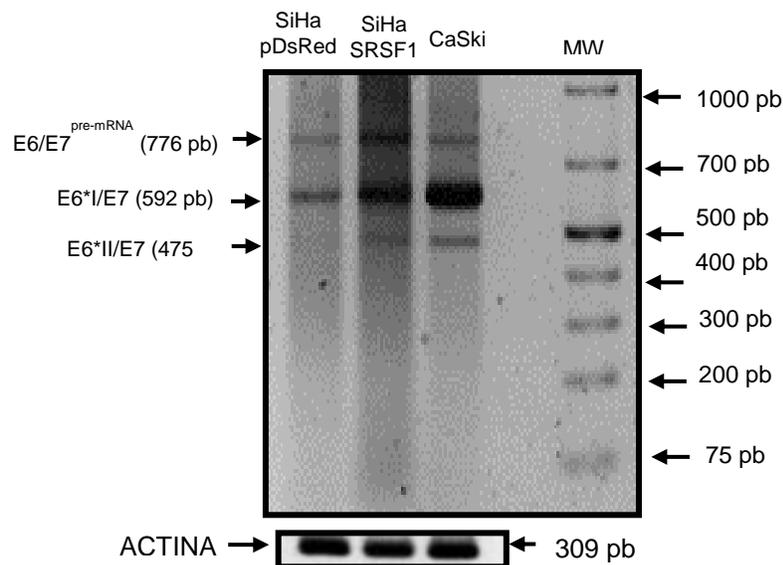


Figura 14. Niveles de transcritos de E6/E7 de VPH16 detectados por RT-PCR en las líneas celulares SiHa establemente transfectadas. Como control positivo, se utilizó cDNA de CasKi. Los primers utilizados y las condiciones de PCR se muestran en la tabla 1. Como control de carga se utilizó actina. Para cada reacción de PCR se utilizó 1 μ l de cDNA.

- La expresión de SRSF1 en SiHa incrementa los niveles de transcritos y de proteínas blanco de algunos factores de *splicing*

Dado el papel de SRSF1 en favorecer el *splicing* alternativo y la traducción de mRNAs, se analizaron los niveles de transcrito y de proteína por las técnicas de RT-PCR y *Western Blot*, de algunos factores de *splicing* blanco que se han asociado al intrón 1 del bicistrón de E6/E7 de VPH16. En la línea

celular SiHa, se observó un incremento de transcrito y proteína de todos los factores de *splicing* analizados con respecto al Mock. De manera intrigante, en C-33 A transfectada con SRSF1-RFP, por RT-PCR no se observó diferencia entre los niveles de mRNA (excepto TIAR, presentó niveles menores) con respecto al mock. Por *Western Blot*, en C-33 A transfectada con SRSF1-RFP, se observó un ligero incremento de niveles de proteína de hnRNP A1, hnRNP A2/B1 y SRSF3, en comparación al mock. Estos datos sugieren que SRSF1 aumenta niveles de transcrito y de proteína de algunas proteínas de unión a RNA involucradas en el *splicing* alternativo de VPH16, en las células SiHa, pero solo los niveles de proteína en las células C-33 A.

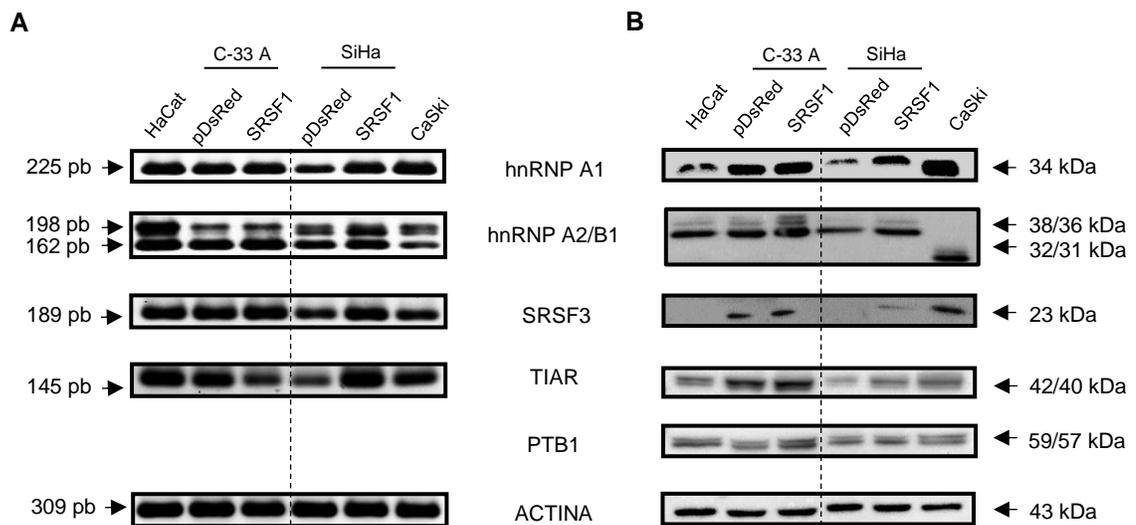


Figura 13. Niveles de expresión de algunos factores de *splicing* en las líneas celulares derivadas de Cáncer Cervicouterino. A) Análisis cualitativo de niveles de transcritos por RT-PCR de algunos factores de *splicing* en las líneas celulares HaCat (no maligna), C-33 A (VPH-) y SiHa (VPH16+) establemente transfectadas con pDsRed y pDsRed-SRSF1, y CasKi (VPH16+, resistente a apoptosis). Se utilizó 1 μ l de cDNA de las líneas celulares. B) Análisis semicuantitativo de niveles de proteína por *Western Blot* de algunos factores de *splicing* en las líneas celulares HaCat, C-33 A y SiHa establemente transfectadas con pDsRed y pDsRed-SRSF1, y CasKi. Como control de carga se utilizó actina en ambos ensayos. Para el *Western Blot*, se utilizó una imagen representativa de control de carga.

DISCUSIÓN

El Cáncer Cervicouterino ocupa el 4to lugar de cánceres comunes en mujeres al nivel mundial, siendo de mayor impacto en países subdesarrollados, donde continua el aumento de nuevos casos y muertes, a pesar de mejoras en detección de lesiones premalignas y del genoma de virus de papiloma humano (VPH) (de Sanjose S, 2007). Se han clasificado los VPHs en base a su potencial oncogénico en VPH de bajo y alto riesgo, siendo el VPH16 el tipo viral más oncogénico y el más frecuentemente detectado. Se ha demostrado que VPH de alto riesgo es el agente casual necesario para el desarrollo de lesiones precancerosas y cáncer invasivo. Esto está dado por la capacidad de integrarse aleatoriamente al genoma celular y perder la expresión de la proteína E2, represor de las oncoproteínas E6 y E7. Estas últimas son las encargadas de generar la actividad transformante primaria en queratinocitos infectados. La *sobre-expresión* de E6 y E7 se ha observado en tumores de diferentes estadios de evolución de carcinoma cervicouterino. Estas oncoproteínas alteran varias vías celulares como inestabilidad genómica, arresto del ciclo celular, evasión de apoptosis y la inmortalización (McLaughlin-Drubin, M. E., 2009; Howie, H. L., *et al.*, 2009; Moody, C. A., *et al.*, 2010), haciendo necesario estudiar los mecanismos de su regulación en el desarrollo de tumores anogenitales, de cabeza y de cuello.

El splicing alternativo es un proceso esencial en las células eucariotas para permitir expandir su transcriptoma y diversificar su proteoma. Muchos virus toman ventaja de este proceso para poder codificar mediante mRNAs policistrónicos más de 3 proteínas, debido al bajo potencial codificante de sus genomas (Johansson C., & Schwartz S., 2013). Bajo este supuesto, es importante identificar los factores involucrados en la regulación de la expresión de transcritos virales de VPH16 en la célula infectada.

Los factores de splicing son proteínas de unión a RNA (RBP) que participan en la regulación post-transcripcional de muchos pre-mRNAs. Se conocen dos principales familias de RBPs: las proteínas SR y las

ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs). Las proteínas SR actúan como activadores de *splicing* uniéndose a elementos *enhancer* de *splicing* exónicos (ESE) y esto facilita el reconocimiento de exón por el *spliceosome*, llevando a la inclusión del exón. Por su parte, las hnRNPs actúan como represores de *splicing* uniéndose a elementos silenciadores de *splicing* intrónicos/exónicos (ISS/ESS), y eliminando el exón del pre-mRNA (Busch A. y Hertel K. J., 2012). Enfocándonos en las proteínas SR, es importante recalcar que estructuralmente poseen un dominio N terminal con 1 o 2 motivos de unión a RNA (RRM) y un dominio C terminal rico en dipéptidos serina-arginina (SR), importantes en la unión específica a elementos del mRNA y la interacción con otras proteínas, respectivamente (Howard, J. M., & Sanford, J. R., 2015). Las proteínas SR se describieron inicialmente por restaurar la actividad de *splicing* un extracto deficiente de *splicing* S100 de células HeLa y fueron detectadas por el anticuerpo mAb104 que reconoce el fosfoepítipo en presencia de cloruro de magnesio (Dignam, J. D., *et al.*, 1983). Inicialmente intervienen en la activación de sitios de *splicing* débiles, definición y la selección positiva de un exón, la unión del complejo de unión a exón (EJC), transporte del núcleo al citoplasma, regulación de traducción del transcrito y degradación (Das S. y Krainer, A. R., 2014).

La proteína SR prototipo es SRSF1 (anteriormente denominada ASF/SF2), ha demostrado ser un potente proto-oncogén altamente expresado en diversos tumores y es regulado por c-Myc (Das, S., *et al.*, 2012). Reconoce secuencias ESE rico en purinas, promoviendo la selección de un sitio de *splicing* 5' débil, entre diversas funciones mencionadas anteriormente. La *sobre-expresión* de SRSF1 promueve incremento de isoformas que favorecen la transición epitelio-mesénquima (Ghigna C., *et al.*, 2005), la traducción dependiente de cap (Iborra S., *et al.*, 2013) y evasión de apoptosis (Anczuków O, *et al.*, 2012). En cáncer cervical, se sabe que se encuentra incrementado en tumores y se liga a la diferenciación del queratinocito (Fay, J., *et al.*, 2009). Sin embargo, es poco lo que se ha investigado con respecto a estabilidad y traducción de transcritos y el papel de SRSF1 en el carcinoma cervical.

En este estudio, se analizó la expresión de la proteína SRSF1 en líneas de carcinoma cervical C-33 A (VPH negativo) y SiHa (1-2 copias integradas de VPH16). Estas líneas celulares poseen la característica de ser sensibles a muerte con Cis-platino o UV (datos no publicados), y presentan bajos niveles de proteína de SRSF1. Por lo cual, nos sirven como modelos para estudiar alteraciones celulares con respecto a dos líneas cervicales más malignas y resistentes a muerte, como CaSki (500 copias integradas de VPH16) y HeLa (~600-800 copias integradas de VPH18+), ambas con niveles elevados de la proteína SRSF1 (Yee, C., 1985; del Moral O., *et al.*, 2010). SRSF1 se ha asociado como un factor anti-apoptótico importante en tumores mamarios y de pulmón (Kędzińska, H., & Piekiełko-Witkowska, A., 2017) que podría indicarnos el mecanismo de resistencia a apoptosis presente en estas últimas líneas celulares.

Para la expresión de SRSF1, se utilizó el plásmido para células eucariotas pDsRed2-N1. Este vector posee la característica de expresar un inserto unido en fase con la proteína roja fluorescente (RFP). Las células C-33 A y SiHa transfectadas no presentaron un cambio de morfología visible ni incremento en proliferación. Sin embargo, consideramos que experimentos adicionales, por ejemplo, ensayos de formación de colonia y/o crecimiento independiente de anclaje, mostrarían cambios en proliferación y fenotipo de transición epitelio-mesénquima (Karni R., en el 2007).

La expresión de la RFP y proteína de fusión SRSF1-RFP nos permite observar su localización por microscopía de fluorescencia. A pesar de tener bajos niveles de transfección (~30-40%), fue posible observar la expresión de la RFP en las líneas y observar la proteína de fusión a niveles bajos. La proteína SRSF1 se ha encontrado principalmente en núcleo (confinado en *speckles*) y citoplasma, en base a su papel como regulador de mRNAs (Tripathi, V., *et al.*, 2012). Nuestros datos indican que el factor de *splicing* se organiza en forma puntiforme, posiblemente en cuerpos P (donde se almacenan y degradan mRNAs) y que se encuentran en cercanía con la

maquinaria de traducción (ribosomas) (Anderson, P., *et al.*, 2015). Sin embargo, es necesario utilizar marcadores de estas regiones para definir su localización. Adicionalmente, se debe llevar a cabo la inmunofluorescencia con la proteína SRSF1 endógena para descartar deslocalización por RFP.

La detección de la expresión *in vitro* de RFP y SRSF1-RFP se hizo mediante *Western Blot*, observando un tamaño de 27 kDa y 64 kDa, respectivamente. Esto nos indicó que la secuencia se expresa en las líneas celulares y los niveles de proteína son altos, a pesar de la baja eficiencia de transfección (Yarbrough, D., 2001).

Con respecto a los niveles de transcritos de E6/E7, se observó un incremento de E6/E7^{pre-mRNA}, E6*I y E6*II, en la línea celular SiHa transfectada con SRSF1-RFP con respecto al mock. Este dato resulta interesante, debido que anteriormente, Rosenberger, S., *et al.*, 2010 y McFarlane, M., *et al.*, 2015, reportaron independientemente que mediante el *knock down* de SRSF1 no se afectaba la producción de transcritos de E6/E7. Sin embargo, el efecto que observan podría ser compensado por otro factor de *splicing* como hTRA2-β1, el cual reconoce secuencias similares a SRSF1 y se ha encontrado *sobre-expresado* en tumores cervicales (Gabriel, B., *et al.*, 2009). Además, nosotros al expresar a SRSF1-RFP, nos aseguramos que exista un incremento en la concentración del factor y evadir la competencia entre factores de *splicing* por selección de elementos en el pre-mRNA del bicistrón (Singh, R., & Valcárcel, J., 2005). Por lo tanto, se sugiere que SRSF1 incrementa los niveles de transcritos de E6/E7 posiblemente por unión directa a los transcritos o por incrementar los niveles de otros factores de *splicing* que si se han encontrado unidos al intrón I de VPH16. Sería importante validar la primera aseveración con experimentos adicionales.

Se sabe que SRSF1 por la plasticidad de unión a mRNAs, regula diversos blancos como proteínas del ciclo celular, de apoptosis, factores de transcripción y factores de *splicing*. En un estudio llevado a cabo por Sanford, J. R., *et al.*, 2008, analizó SRSF1 unido a diversos mensajeros endógenos en

diferentes compartimentos subcelulares, encontrando a hnRNP A1, hnRNPA2/B1 y SRSF3 como blancos de este factor de *splicing*. Sin embargo, no validó por alguna técnica el dato obtenido, y es de nuestro interés estudiar su regulación en presencia de VPH16. Adicionalmente, se analizaron 2 blancos de otra proteína SR, SRSF2, PTB1 (hnRNP I) y TIAR. Estos factores de *splicing* se han catalogado como proto-oncogénes (hnRNP A1, A2/B1 y SRSF3) y *sobre-expresados* en tumores de mama, de colon, de pulmón, de hígado y gliomas. Los mRNA de estas proteínas de unión a RNA sufren *splicing* alternativo y severas modificaciones post-traduccionales importantes para su regulación. La proteína TIAR se propone que participa como gen supresor de tumores y es un factor de *splicing* que estabiliza muchos transcritos y favorece traducción de algunos mensajeros virales (David, C. J., *et al.*, 2010; Venables, J. P., *et al.*, 2008; Corbo, C., *et al.*, 2013; Sánchez-Jiménez, C., & Izquierdo, J. M., 2015).

En relación con la regulación del *splicing* alternativo de transcritos tardíos de HPV16, hnRNP A1 ha mostrado unirse específicamente a un elemento silenciador de la región codificante de L1, suprimiendo el sitio de *splicing* 3' tardío SA5639, y también se une a un elemento negativo regulatorio en la región 3' UTR de transcritos tardíos. hnRNP A2/B1 se une a elementos silenciadores de *splicing* río arriba del sitio de *splicing* 5' tardío SD3632. La proteína PTB1 se une a una región rica en uracilos en el UTR temprano de HPV16, y su *sobre-expresión* causa un cambio de lectura dentro de la región tardía del genoma del virus. La proteína SRSF3 se une a secuencias ricas en AC distintas de SRSF1 río abajo del sitio de *splicing* SA3359, inhibiendo su activación. Sin embargo, con respecto a la producción de transcritos tempranos de VPH16, específicamente aquellos que codifican a las oncoproteínas E6 y E7, se ha estudiado muy poco. Se sabe que SRSF1 favorece la selección del sitio de *splicing* 3' SA3358 que permite la expresión de transcritos tempranos. Los factores de *splicing* hnRNP A1 y hnRNP A2/B1 promueve el *splicing* de mRNAs tempranos de VPH16 uniéndose específicamente entre los sitios de *splicing* SD226 y SA409, lo cual conlleva a

una mayor expresión de E6*1, bajo un estímulo con EGF (Rosenberger, S., *et al.*, 2010; Somberg, M., & Schwartz, S., 2010; Kajitani, N., & Schwartz, S., 2015).

Por RT-PCR, analizamos los niveles de transcrito de los factores de *splicing* blanco de SRSF1. Observamos en SiHa transfectada con SRSF1 un incremento en los mRNAs de los factores de *splicing*, en comparación al mock. Sin embargo, en C-33 A transfectada con SRSF1-RFP no observamos un efecto diferencial con respecto al mock. Estos datos sugieren que SRSF1 en SiHa se encuentra en estado hiperfosforilado (el cual activa el *splicing* alternativo tras el reclutamiento de U1 snRNP a los sitios de *splicing* 5' y estabiliza transcritos), mientras que en C-33 A se encuentra en su forma hipofosforilada (se mantiene confinada en speckles nucleares o se disocia de pre-mRNAs) (Misteli, T., *et al.*, 1998; Bjork P, *et al.*, 2009; Risso, G., *et al.*, 2012). Sin embargo, debemos confirmar el estado de fosforilación en ambas líneas celulares y requieren una futura investigación más profunda.

Los niveles de proteína de los factores de *splicing* se observaron por *Western Blot*. En SiHa transfectada con SRSF1 se mostró un incremento considerable de todos los factores de *splicing*, excepto de TIAR, con respecto al mock. Sin embargo, para C-33 A transfectada con SRSF1, los niveles de proteína detectados estuvieron ligeramente incrementados de hnRNP A1, hnRNP A2/B1 y SRSF3, en comparación al mock. Estos datos sugieren que las formas hipo o hiperfosforiladas de SRSF1 tienen diferencias importantes en sus mecanismos de acción, a nivel de estabilización de mensajeros o incremento de la traducción de los mRNAs, lo que se refleja como el aumento de expresión de estos factores de *splicing*. Además, habrá que explorar el papel en el que participan cada uno de los factores de *splicing*, incluyendo las formas hipo e hiperfosforiladas de SRSF1, en la producción de transcritos de E6/E7 de VPH16 (Rosenberger, S., *et al.*, 2010; Somberg, M., & Schwartz, S., 2010). También habrá que investigar el papel de E6/E7 en los niveles de fosforilación de SRSF1, por ejemplo, en las células C-33 A transfectadas con

E6/E7 determinar si se altera la fosforilación de SRSF1 y de SRSF1-RFP.

En resumen, la expresión de SRSF1-RFP en células SiHa incrementa los niveles de los transcritos de E6/E7 de VPH16 y de los factores de *splicing* hnRNP A1, hnRNP A2/B1, TIAR, SRSF3 y PTB1, tanto a nivel de mensajero como de proteína, mientras que su expresión de las células C-33 A (VPH negativo) incrementa solo ligeramente los niveles de proteína de los factores de *splicing* anteriormente mencionados.

CONCLUSIONES

- La expresión de SRSF1 en la línea celular SiHa favorece un incremento en los niveles de transcritos de E6/E7 de VPH16.
- La expresión de SRSF1 incrementa los niveles de transcritos y de proteína de algunos factores de *splicing* que previamente fueron encontrados asociados al bicistrón E6/E7 de VPH16.

PERSPECTIVAS

- Identificar las regiones citoplasmáticas en las que se encuentra la proteína SRSF1-RFP.
- Determinar que cinasa hiperfosforila en las líneas celulares SiHa, CasKi y HeLa, comparada con C33 A.
- Co-transfectar a C-33 A que establemente expresan SRSF1-RFP con una construcción que exprese el bistrón de E6/E7, para comprobar cambios en los niveles de transcritos y de fosforilación de SRSF1, o bien, transfectar C-33 A que ya expresa E6/E7 de HPV-16 establemente, con SRSF1-RFP
- Utilizando fosfatasa λ , observar si se restringe la presencia de la forma hiperfosforilada de SRSF1 en SiHa y CaSKi, y evaluar alteraciones de transcritos de E6/E7 o blancos de la proteína SR, en las C-33 A células transfectadas Con E6/E7 de HPV-16.
- Comprobar alteraciones de transcritos y de proteína de proteínas pro-apoptóticas/anti-apoptóticas que regula SRSF1, como caspasa 2, caspasa 9, Bcl-x, survivina, entre otras.
- Analizar el papel de SRSF1 en la estabilidad de los niveles de transcritos de E6/E7 mediante un ensayo de actinomicina D, es decir, determinando su vida media.
- Determinar la cinasa responsable de las diferencias de fosforilación en SRSF1 en C-33 A, es decir determinar a cinasa que activa HPV-16, de las que se conocen que fosforilan SRSF1 (Clk/Sty o o SRPK), o bien, si se trata de una fosfatasa muy activa en C-33 A.
- Determinar si SRSF1 se encuentra unido a los transcritos de E6/E7 mediante los ensayos de CLIP o RIP.
- Diseño de la construcción pDsRed2-N1-SRSF2 (en proceso).
- Efectuar RNA-seq en las líneas C-33 A y SiHa que expresan SRSF1-RFP.

ANEXOS



Figura 14. Resultados de la secuenciación de pDsRed2-N1-SRSF1. El ORF de SRSF1 está indicado de color azul, 21 pb de bases de *linker* y el ORF de RFP en color rojo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aenkoe, M. L. (2014). Regulation of gene expression programmes by serine–arginine rich splicing factors. In *Seminars in cell & developmental biology*, 32: 11-21.
2. Anczuków, O., Rosenberg, A. Z., Akerman, M., Das, S., Zhan, L., Karni, R., *et al.*, & Krainer, A. R. (2012). The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nature structural & molecular biology*, 19(2), 220-228.
3. Anczuków, O., Akerman, M., Cléry, A., Wu, J., Shen, C., Shirole, N. H., *et al.*, & Allain, F. H. T. (2015). SRSF1-regulated alternative splicing in breast cancer. *Molecular cell*, 60(1), 105-117.
4. Anderson, P., Kedersha, N., & Ivanov, P. (2015). Stress granules, P-bodies and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(7), 861-870.
5. Aubol, B. E., Plocinik, R. M., Hagopian, J. C., Ma, C. T., McGlone, M. L., Bandyopadhyay, R., ... & Adams, J. A. (2013). Partitioning RS domain phosphorylation in an SR protein through the CLK and SRPK protein kinases. *Journal of molecular biology*, 425(16), 2894-2909.
6. Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V. A. L. E. R. I. E., Braun, M. J., Gonda, M. A., & Howley, P. M. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *Journal of virology*, 61(4), 962-971.
7. Bernard, H. U. (2002). Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antiviral therapy*, 7(4), 219-237.
8. Björk, P., Jin, S., Zhao, J., Singh, O. P., Persson, J. O., Hellman, U., & Wieslander, L. (2009). Specific combinations of SR proteins associate with single pre-messenger RNAs in vivo and contribute different functions. *The Journal of cell biology*, 184(4), 555-568.
9. Chow, L. T., Broker, T. R., & Steinberg, B. M. (2010). The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *Apmis*, 118(6-7), 422-449.
10. Corbo, C., Orrù, S., & Salvatore, F. (2013). SRp20: an overview of its role in human diseases. *Biochemical and biophysical research communications*, 436(1), 1-5.
11. da Silva, M. R., Moreira, G. A., Gonçalves da Silva, R. A., de Almeida Alves Barbosa, É., Pais Siqueira, R., Teixeira, R. R., *et al.*, & Bressan, G. C. (2015). Splicing regulators and their roles in cancer biology and therapy. *BioMed research international*, ID:150514, pp. 1-12.
12. Das, S., & Krainer, A. R. (2014). Emerging functions of SRSF1, splicing factor and oncoprotein, in RNA metabolism and cancer. *Molecular Cancer Research*, molcanres-0131.
13. Das, S., Anczuków, O., Akerman, M., & Krainer, A. R. (2012). Oncogenic splicing factor SRSF1 is a critical transcriptional target of MYC. *Cell reports*, 1(2), 110-117.

14. David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P., & Manley, J. L. (2010). HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature*, *463*(7279), 364.
15. De Sanjosé, S., Diaz, M., Castellsagué, X., Clifford, G., Bruni, L., Muñoz, N., & Bosch, F. X. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*, *7*(7), 453-459.
16. del Moral-Hernández, O., López-Urrutia, E., Bonilla-Moreno, R., Martínez-Salazar, M., Arechaga-Ocampo, E., Berumen, J., & Villegas-Sepúlveda, N. (2010). The HPV-16 E7 oncoprotein is expressed mainly from the unspliced E6/E7 transcript in cervical carcinoma C33-A cells. *Archives of virology*, *155* (12), 1959-1970.
17. Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology*, *32*, 7-15.
18. Dvinge, H., Kim, E., Abdel-Wahab, O., & Bradley, R. K. (2016). RNA splicing factors as oncoproteins and tumor suppressors. *Nature reviews Cancer*, *16*(7), 413.
19. Fay, J., Kelehan, P., Lambkin, H., & Schwartz, S. (2009). Increased expression of cellular RNA-binding proteins in HPV-induced neoplasia and cervical cancer. *Journal of medical virology*, *81*(5), 897-907.
20. Fernandes J. V. & Araújo T. A. (2012). Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis, Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - A Clinical Perspective, Dr. Davy Vanden Broeck (Ed.), ISBN: 978-953-307-860-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/human-papillomavirus-and-related-diseases-from-bench-to-bedside-a-clinical-perspective/human-papillomavirus-biology-and-pathogenesis>
21. Francis, D. A., Schmid, S. I., & Howley, P. M. (2000). Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *Journal of virology*, *74*(6), 2679-2686.
22. Gabriel, B., Hausen, A. Z., Bouda, J., Boudova, L., Koprivova, M., Hirschfeld, M., ... & Stickeler, E. (2009). Significance of nuclear hTra2-beta1 expression in cervical cancer. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, *88*(2), 216-221.
23. Ghigna, C., Giordano, S., Shen, H., Benvenuto, F., Castiglioni, F., Comoglio, P. M., *et al.*, & Biamonti, G. (2005). Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene. *Molecular cell*, *20*(6), 881-890.
24. Graham, S. V. (2008). Papillomavirus 3'UTR regulatory elements. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, *13*, 5646-5663.
25. Howard, J. M., & Sanford, J. R. (2015). The RNAissance family: SR proteins as multifaceted regulators of gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *6*(1), 93-110.
26. Howie, H. L., Katzenellenbogen, R. A., & Galloway, D. A. (2009). Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, *384*(2), 324-334.

27. Huibregtse, J. M., Scheffner, M., & Howley, P. M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *The EMBO journal*, *10*(13), 4129.
28. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. (2007) *Human Papillomaviruses*. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 90.) Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK321760/>
29. Iborra, S., Hirschfeld, M., Jaeger, M., Zur Hausen, A., Braicu, I., Sehouli, J., et al., & Stickeler, E. (2013). Alterations in expression pattern of splicing factors in epithelial ovarian cancer and its clinical impact. *International Journal of Gynecological Cancer*, *23*(6), 990-996.
30. Johansson, C., & Schwartz, S. (2013). Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nature reviews. Microbiology*, *11*(4), 239.
31. Kajitani, N., & Schwartz, S. (2015). RNA binding proteins that control human papillomavirus gene expression. *Biomolecules*, *5*(2), 758-774.
32. Kędzierska, H., & Piekietko-Witkowska, A. (2017). Splicing factors of SR and hnRNP families as regulators of apoptosis in cancer. *Cancer Letters*, *396*: 53-65.
33. Li, X., Wang, J., & Manley, J. L. (2005). Loss of splicing factor ASF/SF2 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis, but inhibits internucleosomal DNA fragmentation. *Genes & development*, *19*(22), 2705-2714.
34. López-Urrutia, E., Valdés, J., Bonilla-Moreno, R., Martínez-Salazar, M., Martínez-García, M., Berumen, J., & Villegas-Sepúlveda, N. (2012). A few nucleotide polymorphisms are sufficient to recruit nuclear factors differentially to the intron 1 of HPV-16 intratypic variants. *Virus research*, *166*(1), 43-53.
35. Lowy, D. R. (2016) HPV vaccination to prevent cervical cancer and other HPV-associated disease: from basic science to effective interventions. *The Journal of clinical investigation*, *126*(1), 5-11.
36. Martínez-Salazar, M., López-Urrutia, E., Arechaga-Ocampo, E., et al. (2014). Biochemical and proteomic analysis of spliceosome factors interacting with intron-1 of human papillomavirus type-16. *Journal of proteomics*, *111*, 184-197.
37. Maslon, M. M., Heras, S. R., Bellora, N., Eyra, E., & Cáceres, J. F. (2014). The translational landscape of the splicing factor SRSF1 and its role in mitosis. *Elife*, *3*, e02028.
38. Matlin, A. J., Clark, F., & Smith, C. W. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature reviews Molecular cell biology*, *6*(5), 386-398.
39. McFarlane, M., MacDonald, A. I., Stevenson, A., & Graham, S. V. (2015). Human papillomavirus 16 oncoprotein expression is controlled by the cellular splicing factor SRSF2 (SC35). *Journal of virology*, *89*(10), 5276-5287.
40. McLaughlin-Drubin, M. E., & Münger, K. (2009). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, *384*(2), 335-344.

41. Misteli, T., Cáceres, J. F., Clement, J. Q., Krainer, A. R., Wilkinson, M. F., & Spector, D. L. (1998). Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo. *The Journal of cell biology*, 143(2), 297-307.
42. Mole, S., Milligan, S. G., & Graham, S. V. (2009). Human papillomavirus type 16 E2 protein transcriptionally activates the promoter of a key cellular splicing factor, SF2/ASF. *Journal of virology*, 83(1), 357-367.
43. Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, 10(8), 550-560.
44. Pandit, S., Zhou, Y., Shiue, L., Coutinho-Mansfield, G., Li, H., Qiu, J., ... & Fu, X. D. (2013). Genome-wide analysis reveals SR protein cooperation and competition in regulated splicing. *Molecular cell*, 50(2), 223-235.
45. Risso, G., Pelisch, F., Quaglino, A., Pozzi, B., & Srebrow, A. (2012). Regulating the regulators: Serine/arginine-rich proteins under scrutiny. *IUBMB life*, 64(10), 809-816.
46. Rosenberger, S., Arce, J. D. C., Langbein, L., Steenbergen, R. D., & Rösl, F. (2010). Alternative splicing of human papillomavirus type-16 E6/E6* early mRNA is coupled to EGF signaling via Erk1/2 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), 7006-7011.
47. Rush M., Zhao X., Schwartz S. (2005). A splicing enhancer in the E4 coding region of human papillomavirus type 16 is required for early mRNA splicing and polyadenylation as well as inhibition of premature late gene expression. *Journal of Virology*, 79(18), 12002–12015.
48. Sánchez-Jiménez, C., & Izquierdo, J. M. (2015). T-cell intracellular antigens in health and disease. *Cell Cycle*, 14(13), 2033-2043.
49. Sanford, J. R., Coutinho, P., Hackett, J. A., Wang, X., Ranahan, W., & Cáceres, J. F. (2008). Identification of nuclear and cytoplasmic mRNA targets for the shuttling protein SF2/ASF. *PLoS One*, 3(10), e3369.
50. Saraiya M, et al. (2015) US assessment of HPV types in cancers: implications for current and 9-valent HPV vaccines. *J Natl Cancer Inst*;107(6):086
51. Schiffman M, Wentzensen N. (2013) Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 22(4):553–560.
52. Sinclair, C. S., Rowley, M., Naderi, A., & Couch, F. J. (2003). The 17q23 amplicon and breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 78(3), 313-322.
53. Singh, R., & Valcárcel, J. (2005). Building specificity with nonspecific RNA-binding proteins. *Nature structural & molecular biology*, 12(8), 645.
54. Somberg, M., & Schwartz, S. (2010). Multiple ASF/SF2 sites in the human papillomavirus type 16 (HPV-16) E4-coding region promote splicing to the most commonly used 3'-splice site on the HPV-16 genome. *Journal of virology*, 84(16), 8219-8230.
55. Sun, S., Zhang, Z., Sinha, R., Karni, R., & Krainer, A. R. (2010). SF2/ASF autoregulation involves multiple layers of post-transcriptional and translational control. *Nature structural & molecular biology*, 17(3), 306-312.

56. Tommasino, M. (2014). The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. In *Seminars in cancer biology Academic Press*, 26: 13-21.
57. Tripathi, V., Song, D. Y., Zong, X., Shevtsov, S. P., Hearn, S., Fu, X. D., *et al.*, & Prasanth, K. V. (2012). SRSF1 regulates the assembly of pre-mRNA processing factors in nuclear speckles. *Molecular biology of the cell*, 23(18), 3694-3706.
58. Venables, J. P., Koh, C. S., Froehlich, U., Lapointe, E., Couture, S., Inkel, L., ... & Lucier, J. F. (2008). Multiple and specific mRNA processing targets for the major human hnRNP proteins. *Molecular and cellular biology*, 28(19), 6033-6043.
59. Xu, X., Yang, D., Ding, J.H., Wang, W., Chu, P.H., Dalton, N.D., Wang, H.Y., Bermingham, J.R., Jr., Ye, Z., Liu, F., *et al.* (2005). ASF/SF2-regulated CaMKIIdelta alternative splicing temporally reprograms excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Cell* 120, 59–72.
60. Yarbrough, D., Wachter, R. M., Kallio, K., Matz, M. V., & Remington, S. J. (2001). Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(2), 462-467.
61. Yee, C., Krishnan-Hewlett, I. N. D. I. R. A., Baker, C. C., Schlegel, R., & Howley, P. M. (1985). Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *The American journal of pathology*, 119(3), 361.