



**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA**

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES**

**INFECCIOSAS**

**GENERACIÓN 2013-2015**

**TESIS**

**EFFECTO DE LA FOSFORILACIÓN DE LA REGIÓN CR1 DE LA  
PROTEÍNA E7 DE PAPILOMAVIRUS HUMANO 16 EN SU  
PROCESAMIENTO Y ACTIVIDAD TRANSFORMANTE**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**JOSÉ ANTONIO ANAYA GARCÍA**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. MARIA DE LOURDES GUTIERREZ XICOTENCATL**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**AGOSTO, 2015**

***“...Pero si algo habían aprendido juntos  
era que la sabiduría nos llega cuando  
ya no sirve para nada...”***

**El amor en tiempos de cólera**

**Gabriel José de la Concordia García Márquez**

## **Agradecimientos Académicos**

Agradezco al Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) por permitir mi ingreso y permanencia a la Maestría en Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP).

Agradezco el apoyo económico concedido en forma de beca para la realización de este proyecto al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; Núm. de Registro de Becario 296225)

Agradezco sinceramente a mi comité Tutorial, conformado por la Dra. Ma. Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl, Dr. Gustavo Pedraza Alva y el Dr. Adolfo Pedroza Saavedra por sus comentarios, sugerencias y observaciones durante la realización de este proyecto, debido a que contribuyeron en mi formación.

## **Agradecimientos Personales**

Agradezco a la Dra. Ma. Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl, Dr. Adolfo Pedroza Saavedra y a la Dra. Lilia Chihu Amparán por todo su apoyo durante mi maestría y por haberme aceptado en su laboratorio a pesar de saber que se iniciaría de cero.

A mis padres y hermanas (Rosario, Antonio, Susana y Jacqueline) por su comprensión y apoyo para este proyecto personal, ya que debido a la distancia y falta de tiempo no los pude ver pero aun así ellos nunca dejaron de creer en mí, siempre con una sonrisa en la cara a pesar de las adversidades, cada uno con su forma de ser me enseñó (directa o indirectamente) cuando era el momento justo de cambiar y continuar.

A mis abuelos (†Jesús, Noemí y Rosa) por enseñarme que con paciencia todo llega, y al leer esta frase de Kuro Neko San que me recuerda a mi abuelo “La inmortalidad se encuentra en aquellos seres que no han sido olvidados incluso después de morir”.

A mis amigos (Juan, Danae, Selene, José, Hugo, Crysel, Cecilia) que durante esta nueva etapa de mi vida no se han alejado de mí y en ellos siempre he encontrado fuerzas y aliento para continuar. Además de agradecer a Antonio por apoyar también este proyecto y sobretodo en los momentos de flaqueza.

## Índice

RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	9
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS PAPILOMAVIRUS HUMANOS.....	12
2.2 ORGANIZACIÓN GENÓMICA FUNCIONAL DE HPV.....	13
2.3 CICLO VIRAL DE LOS PAPILOMAVIRUS.....	14
3. MARCO CONCEPTUAL.....	16
3.1 CARACTERÍSTICAS DE LA PROTEÍNA E7 DE PAPILOMAVIRUS HUMANO ..	16
3.1.1 BIOQUÍMICA .....	17
3.1.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA PROTEÍNA E7 DE HPV.....	20
3.1.3 MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE E7 DE HPV .....	22
4. JUSTIFICACIÓN .....	25
5. HIPÓTESIS.....	26
6. OBJETIVO GENERAL .....	27
6.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
7. METODOLOGÍA .....	28
7.1 CULTIVOS CELULARES.....	28
7.2 CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.....	28
7.3 TRANSFECCIÓN ESTABLE DE CÉLULAS CON PLÁSMIDO PCDNA3-16E7W Y -16E7T5G.....	29
7.4 EXTRACCIÓN DE RNA DE CULTIVOS CELULARES .....	30
7.5 DETECCIÓN DE RNA DE E7 POR RT-PCR EN CÉLULAS TRANSFECTADAS. .	30
7.6 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR LA TÉCNICA DE BCA DE PIERCE...31	
7.7 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS- PAGE).....	32
7.8 ENSAYO DE WESTERN BLOT.....	32

7.9 DETECCIÓN DE E7 POR MARCADO METABÓLICO E INMUNOPRECIPITACIÓN. ....	33
7.10 MARCAJE DE PROTEÍNAS SINTETIZADAS DE NOVO CON ORTOFOSFATO [ <sup>32</sup> P]. ....	34
7.11 TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS COS CON LOS PLÁSMIDOS PCDNA3-16E7W Y -16E7T5G. ....	35
7.12 LOCALIZACIÓN DE E7 DE HPV-16 POR INMUNOFLUORESCENCIA. ....	35
7. 13 CURVAS DE CRECIMIENTO. ....	36
7.14 CULTIVO DE CÉLULAS EN AGAR SUAVE PARA MEDICIÓN DEL GRADO DE TRANSFORMACIÓN. ....	37
7.15 ANÁLISIS DE RESULTADOS. ....	37
8. RESULTADOS.....	38
8.1 CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS CELULARES QUE EXPRESAN LA ONCOPROTEÍNA E7 DE HPV16 SILVESTRE Y MUTANTE E7T5G. ....	38
8.2 IDENTIFICACIÓN DE TRANSCRITOS DE HPV16 E7 SILVESTRE Y MUTANTE EN CÉLULAS HACAT TRANSFECTADAS. ....	39
8.3 CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES TRANSFECTADAS CON HPV16 E7W Y E7T5G. ....	41
8.3.1 ENSAYOS DE TRANSFORMACIÓN .....	43
8.4 IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA E7W Y E7T5G EN CÉLULAS HACAT TRANSFECTADAS. ....	43
8.5 CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA E7 DE HPV16 FOSFORILADA. ....	46
8.6 LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS E7W Y E7T5G EN DIFERENTES COMPARTIMIENTOS CELULARES. ....	48
9. DISCUSIÓN. ....	52
10. CONCLUSIONES .....	59
11. PERSPECTIVAS .....	61
12 LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	61
13. REFERENCIAS .....	63

## RESUMEN

El cáncer cérvico uterino (CaCU) es uno de los problemas de salud más graves a nivel mundial, con más de 500,000 nuevos casos al año y con una incidencia cada vez mayor. De los factores de riesgo más importantes asociados a esta enfermedad se encuentran los Papilomavirus Humanos (HPV) de alto riesgo, de los cuales los tipos 16 y 18 son los más frecuentes. Los mecanismos mediante los cuales los HPV inducen la transformación de células involucran a las oncoproteínas E6 y E7, las cuales se han encontrado presentes en líneas celulares provenientes de tumores. El gen **E7** de HPV16 codifica una fosfoproteína ácida de 98 aminoácidos con un peso molecular predicho de ~11 kDa, pero esta proteína muestra una movilidad electroforética anormal en geles de SDS-PAGE generando diferentes pesos moleculares que van de 14 a 21 kDa. En estudios recientes de nuestro grupo se encontró que la proteína E7 de HPV16 presenta 3 isoformas, las cuales tienen pesos moleculares de 17.5, 17 y 16 kDa (E7a, E7b y E7c respectivamente). En la secuencia de aminoácidos de E7 se distinguen tres regiones importantes: el dominio CR1 (región conservada 1 similar a la proteína E1A de Adenovirus), en donde se ha observado que mutaciones puntuales eliminan la actividad transformante de E7; la región CR2 contiene el sitio de unión a la proteína de retinoblastoma (pRb) y el dominio que sirve como sustrato para la fosforilación por cinasa II de caseína (CKII); y la región CR3 que contiene dos motivos Cys-X-X-Cys para la unión a zinc e importantes para la estabilidad de la proteína. Se han identificado sitios de fosforilación por CKII en los aminoácidos 31 y 32, sin embargo, esta modificación no explica los diferentes pesos moleculares, lo que sugiere la presencia de otras modificaciones post-traduccionales. El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína E7 de HPV16, muestra 6 sitios putativos de fosforilación, los cuales, es probable estén relacionados a la actividad y localización de la proteína. Debido a que la actividad transformante de E7 se encuentra en la región CR1 (aa 1-20) y

existe un sitio de fosforilación en el aminoácido 5 (Thr), nos propusimos determinar el papel que juega la fosforilación de la región CR1 en el procesamiento de la proteína E7 y en su actividad transformante. **Metodología:** Células HaCat fueron transfectadas con el plásmido pCDNA3 conteniendo el gen E7 silvestre (E7W) y mutado en el aminoácido 5 (Thr→Gly, E7T5G). La presencia del RNAm del gen E7 se comprobó por RT-PCR y la expresión de la proteína por medio de marcaje metabólico con  $^{35}\text{S-Met}/^{35}\text{S-Cys}$ , mientras que la localización celular fue evaluada por inmunofluorescencia. **Resultados:** En cuanto a la proliferación celular, se observó una reducción de 1.1% en el tiempo de duplicación en las células que expresan E7T5G y 5.4% las que expresan E7W con respecto a sus controles. En cuanto al grado de transformación medido por focos de transformación en agar se observó que tanto E7W como E7T5G generaron de 3.5 a 6.3 veces más focos de transformación que las células control, respectivamente. Por su parte, el peso molecular aparente por SDS-PAGE de E7W fue de 20.4kDa y para E7T5G fue de 19.5 kDa, mientras que las formas fosforiladas fueron de 18.8 y 19.1 kDa para E7W al medir a 1 y 6 h, respectivamente y de 19.3 kDa para E7T5G tanto a 1 y 6 h. Finalmente se identificó que E7T5G se acumula en núcleo, mientras que E7W se observa en retículo endoplásmico (ER), Golgi y núcleo. **Conclusiones:** La ausencia de fosforilación en Thr 5 de E7 incrementa su actividad transformante, posiblemente por su acumulación en núcleo que le permite interactuar con sus proteínas blanco por mayor tiempo.

## 1. INTRODUCCIÓN

La infección causada por el Papilomavirus humano (HPV) se ha incrementado de forma alarmante en los últimos 20 años y las tasas de mayor prevalencia son en adolescentes y mujeres jóvenes (Sam et al., 2011). La relación entre el cáncer cérvico uterino (CaCU) y el HPV fue demostrada a principios de los años 80's, por el doctor Zur Hausen y la infección es requisito para el desarrollo de esta enfermedad (López-Lizano, 2006); en México en el 2012 se presentaron 13,960 nuevos casos de esta enfermedad y una mortalidad de 4,769; de tal forma que el CaCU es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres de nuestro país (Ferlay et al., 2012).

En México, la frecuencia de la infección por HPV es variable; Lazcano y colaboradores en 2001 demostraron una presencia de HPV en mujeres menores de 25 años, reportando una prevalencia de 16.7%; mientras que Juárez-Figueroa y colaboradores demostraron que en mujeres de la Ciudad de México la prevalencia fue de 43%, lo que implica diferentes riesgos de exposición a la infección (Lazcano et al., 2001; Juárez-Figueroa et al., 2001).

Los HPVs son virus no envueltos de DNA circular con cápsides icosaédricas que replican su genoma en el núcleo de las células hospedadoras y cuenta con 8000 pb (Longworth & Laimins, 2004). Estos son miembros de la familia *Papillomaviridae*, de los cuales se han identificado más de 100 tipos (Gonzalez, 2007; De Villiers et al., 2004). Estos se pueden clasificar en cutáneos o de la mucosa, dependiendo del tipo celular que infectan, dependiendo del riesgo de malignidad, los HPV se agrupan además como tipos de alto riesgo o de bajo riesgo (Ganguly-Parihar, 2009). Los HPV de alto riesgo están fuertemente asociados con

los cánceres anogenitales, en particular al carcinoma del cuello uterino (Stanley, 2012).

Los tipos de HPV más frecuentes en las mujeres con cáncer son 16, 18, 33, 45, 31, 58, 52 y 35. El carcinoma de células escamosas es la presentación más común en cuello uterino (80% de los casos) y más a menudo se asocia con HPV16 (Huh, 2009). El HPV16 es el tipo más frecuente detectado en CaCU, seguido del HPV18 y juntos ocasionan el 70% de los cánceres cervicales en todo el mundo (Stanley, 2012). Los HPV también pueden alojarse de forma latente en las células epiteliales, evadiendo la detección por el sistema inmune, aunque dicho virus puede ser reactivado en estas células infectadas (Lizano et al., 2009)

Todos los genomas de HPV incluyen 3 regiones generales: 1) una región regulatoria río arriba (URR), que contiene secuencias que controlan la transcripción y la replicación viral; 2) una región temprana, que contiene marcos de lectura abierto con diferentes funciones (ORFs: E1, E2, E4, E5, E6 y E7), incluyendo activación de la transcripción, la transformación, la replicación y la adaptación a diferentes ambientes celulares, y 3) una región tardía, que codifica para las proteínas de la cápside L1 y L2 que forman la estructura del virión (Burk et al., 2009).

Los mecanismos mediante los cuales los HPV inducen la transformación de las células han sido investigados intensamente, los mecanismos más abundantes son aquellos que proceden de los marcos de lectura abiertos *E6* y *E7* que son oncogénicos (Matlashewski et al., 1987; Phelps WC et al., 1988).

Ambos genes *E6* y *E7* codifican para oncoproteínas con la habilidad de cooperar en la immortalización de queratinocitos humanos primarios, el tipo celular

hospedero natural de este virus (Brokaw et al., 1994); en donde E7 toma el mando de las actividades normales de los complejos de regulación celular afectando la función de varias proteínas celulares, lo que conduce a la interferencia de la transcripción, remodelación de la cromatina, la síntesis de DNA, la señalización de citocinas, la inestabilidad genómica, la apoptosis y el metabolismo celular (Rautava-Stina, 2012). Además se sabe que las modificaciones post-traduccionales permiten funcionalidad y localización intracelular de algunas proteínas. En el caso de E7 de HPV16 se han identificado al menos 5 sitios putativos de fosforilación.

Por lo anterior es necesario estudiar a esta proteína en sus sitios de fosforilación, ya que ello nos podría indicar qué importancia tienen las modificaciones post-traduccionales de esta proteína para la biología del virus.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Clasificación de los Papilomavirus humanos.

El papel etiológico de la mayoría de los tipos de Papilomavirus Humanos (HPV) de alto riesgo (como el HPV16 y 18) presentes en las anomalías del cuello uterino, se ha demostrado mediante estudios moleculares (Wang et al., 2013). La clasificación de los tipos de HPV está basada predominantemente en similitudes de nucleótidos en la secuencia del gen *L1* asociadas con algunas propiedades biológicas y médicas, lo que dio lugar a la nomenclatura oficial (Bernard, 2010).

Los tipos de HPVs que se encuentran asociados a los seres humanos se dividen en cinco géneros: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Mu-* y *Nu-papillomavirus*; con estas diferencias de tipos se presentan asociaciones con las características de la enfermedad y del ciclo de vida (Doorbar et al., 2012). Los distintos grupos filogenéticos virales tienen diferentes tropismos tisulares y están separados en mucosotrópicos (mayoría de los  $\alpha$ -HPV) y cutaneotrópicos ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ , y algunos  $\alpha$ -HPV) (Gottschling et al., 2009). Los *Alpha-papillomavirus* ( $\alpha$ -HPV), se han aislado predominantemente de lesiones genitales; los *Beta-papillomavirus* ( $\beta$ -HPV), denominado previamente como los tipos relacionados con Epidermodisplasia verruciforme y los *Gamma-papillomavirus* ( $\gamma$ -HPV) asociados con lesiones en piel (Bottalico et al., 2011).

En los últimos años, se ha hecho evidente que muchos tipos de HPV, incluyendo la mayoría de los contenidos dentro de los tipos Beta y Gamma causan infecciones asintomáticas en individuos inmuno-competentes y se pueden detectar en frotis de la piel y para algunos tipos Gamma, también en mucosas (Doorbar et al. 2012).

## 2.2 Organización genómica funcional de HPV.

Las partículas de HPV consisten de una molécula de DNA circular envuelto en una cápside viral que se compone de dos proteínas, L1 y L2 (González, 2007).

El genoma de los virus del papiloma humano está organizado en tres regiones:

- **Región de genes tempranos:** en la que se encuentran los genes que codifican para las proteínas E6, E7, E1, E2, E4 y E5, que están implicadas en la transcripción y la regulación de genes, así como en transformación celular.
- **Región de los genes tardíos:** donde están los genes que codifican para las proteínas L1 y L2, que forman la cápside viral (Gonzalez, 2007).
- **Región larga de control (LCR):** presenta elementos en *cis* que controlan la expresión génica y de replicación viral (López-Lizano, 2006).

Durante la infección natural, E1 se expresa en niveles muy bajos y requiere la presencia de E2 con el fin de ser orientado de manera eficiente a sus sitios de unión (Doorbar, 2006). En adición a E1 y E2, se piensa que las proteínas E4 y E5 contribuyen indirectamente a la amplificación exitosa del genoma por modificación del ambiente celular (Doorbar et al., 2012). Asociados E2 y E1 forman un dímero, que se une al DNA; la formación de un complejo E1-E2 en el origen de replicación induce la distorsión localizada en el DNA viral, lo que facilita el reclutamiento de moléculas de E1 adicionales y el eventual desplazamiento de E2; los altos niveles de E2 actúan para regular de manera negativa la expresión de E6 y E7 en sistemas experimentales (Doorbar, 2006).

Posteriormente se expresan, los genes **E6** y **E7** que como ya se mencionó tienen potencial oncogénico y son responsables de la replicación viral y la

transformación de la célula hospedera (Huh, 2009). La proteína E7 contribuye principalmente a la inducción de la síntesis de DNA y a la progresión del ciclo celular, mientras que E6 contribuye al aumento de la supervivencia celular y la progresión a la malignidad (Guccione et al., 2002).

De esta manera, el aumento de la proliferación de las células epiteliales suprabasales observado en las lesiones cervicales causadas por el HPV se ha atribuido a las oncoproteínas virales E6 y E7, y al mecanismo por el cual estas oncoproteínas de HPV estimulan la progresión del ciclo celular, el cual está relacionado con la degradación de p53 por E6 y a la inactivación de pRb a través de E7 (Gonzalez, 2007). El principal blanco celular de las proteínas E7 de HPV y otras oncoproteínas virales en la transformación celular es la proteína supresora tumoral pRb. Esta proteína forma parte de una familia de proteínas estrechamente relacionadas, incluyendo a p107 y p130 que se unen a factores de transcripción E2F y bloquean su función de activación transcripcional (Liu et al., 2006).

### ***2.3 Ciclo viral de los Papilomavirus.***

Una infección de HPV productiva depende de la naturaleza del epitelio donde ocurra la infección, ya que obedecerá a factores externos como la presencia de hormonas o citocinas (Doorbar et al., 2012). Algunos autores sugieren que la proteína L1 de HPV se une al primer receptor que son proteoglicanos de sulfato de heparán que se encuentran en la superficie de la célula, posteriormente se une a laminina 332 facilitando una mejor adhesión a la célula, en conjunto con cambios conformacionales que incluyen un corte en la proteína L2 por furina (Ishii et al., 2013). Este corte permite la exposición de un péptido que es reconocido por un

segundo receptor celular, el cual es necesario para la internalización final del HPV a través de endocitosis y tráfico intracelular (Doorbar et al., 2012; Ishii et al., 2013).

Por su parte, las proteínas E1 y E2 son esenciales en la replicación viral durante la fase de amplificación inicial. La proteína E2 regula la transcripción viral y tiene múltiples sitios de unión al promotor LCR que se encuentra río arriba, ya que presenta sitios de unión que están localizados en sitios adyacentes de factores de transcripción celular que activan promotores tempranos (Doorbar et al., 2012; Longworth & Laimins, 2004). La proteína E1 tiene actividad helicasa, lo que permite la separación de las cadenas de DNA viral y de esta manera permite el reclutamiento de toda la maquinaria de replicación de DNA. Además, E1 y E2 actúan reclutando polimerasas celulares y proteínas accesorias que median la replicación. La habilidad de E2 de activar o reprimir la expresión de proteínas contribuye a controlar el número de copias de DNA viral en la célula (Longworth & Laimins, 2004). Sin embargo, debido a fallas en el ciclo viral por la integración del DNA viral al celular, con ruptura del gen E2 o mutaciones en éste mismo, da como resultado la pérdida de funcionalidad de esta proteína y permite la sobre-expresión de las proteínas E6 y E7, factor importante para la transformación celular y el desarrollo del CaCU (Gonzalez, 2007).

Las funciones de E4 y E5 no son claras aún, pero se ha propuesto que ambas proteínas están involucradas en la regulación de funciones virales tardías (Longworth & Laimins, 2004). Se ha propuesto que la proteína E4 modula la amplificación del genoma y la síntesis del DNA viral, además de que modifica la arquitectura de la citoqueratina, lo que sugiere que está involucrada en la liberación de las partículas virales. Algunos estudios han tratado de examinar cómo la

desorganización celular podría facilitar el escape de viriones infecciosos (Doorbar, 2013). Por su parte, se cree que E5 tiene la capacidad de modular la señalización celular; E5 es una proteína transmembranal que se encuentra predominantemente en el retículo endoplásmico (ER, del inglés Endoplasmic Reticulum) y que se asocia a la ATPasa de protones vacuolar (16 kDa) retrasando el proceso de acidificación endosomal, evitando así la degradación del virus al entrar a la célula (Doorbar, 2006).

La proteína L1 de la cápside de HPV constituye el 90% de las proteínas de la superficie viral de HPV y se expresa típicamente durante la fase tardía de la replicación viral; esta proteína presenta inmunorreactividad en pruebas citológicas desde pequeñas lesiones hasta cáncer. La expresión de L1 permite la organización del virus para poder salir al medio extracelular (Lee et al., 2014). La culminación del ciclo de vida productivo de HPV en una célula implica la expresión de la proteína L2, proteína minoritaria de la capa viral (Doorbar et al., 2012).

### **3. MARCO CONCEPTUAL**

#### ***3.1 Características de la proteína E7 de Papilomavirus humano***

Los genes *E6* y *E7* son altamente conservados entre los diferentes tipos de HPVs identificados hasta la fecha, siendo éstas las secuencias que codifican para las proteínas principales de transformación celular en el caso de los HPVs de alto riesgo asociados a cáncer (Ghittoni et al., 2010).

### 3.1.1 Bioquímica

La proteína E7 de HPV16 es una fosfoproteína ácida de 98 aminoácidos, con un peso molecular predicho de 11 kDa y de 14 kDa cuando está fosforilada por CKII (casein cinasa II), en condiciones *in vitro*. La movilidad electroforética de esta proteína en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) es aproximadamente de 17 kDa, lo cual es anormalmente alto para el tamaño en aminoácidos de la proteína (Armstrong & Roman, 1993; Barbosa et al., 1990). Sin embargo, se han reportado diferentes pesos moleculares que van desde 14 y hasta un máximo de 21 kDa, según lo informado por diversos grupos (Gulliver et al., 1997; Valdovinos-Torres, et al., 2008; Ghittoni et al., 2010).

Basado en la secuencia de aminoácidos, la proteína E7 es muy similar entre los diferentes tipos de HPV y se pueden separar en tres regiones conservadas llamadas CR1, CR2 y CR3 por su homología a la proteína E1A de Adenovirus y al antígeno T de SV40 (Barbosa et al., 1990; Liu et al., 2006).

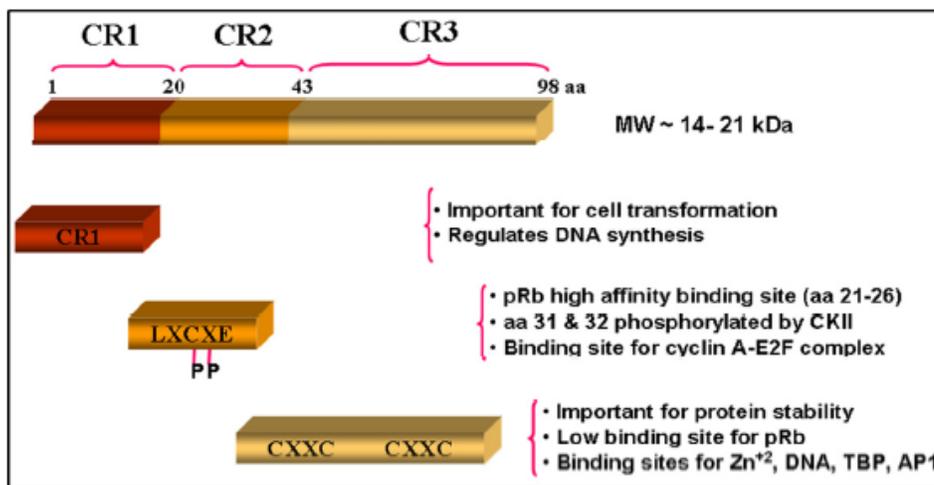
La región CR1 tiene un papel en la regulación de síntesis de DNA, además de ser sustancial para la transformación celular, ya que mutaciones puntuales en esta región generan pérdida de transformación celular, ver Tabla 1 (Gulliver et al., 1997). El dominio CR2 de E7 de HPV16 contiene secuencias de aminoácidos requeridas para su asociación con miembros de la familia pRb, además de contener los sitios de fosforilación Ser 31 y 32 blancos de CKII, como se esquematiza en la Figura 1 (Gulliver et al., 1997; Barbosa et al., 1990).

**Tabla 1. Características funcionales de las regiones de la proteína E7 de HPV**

Región	Aminoácido (s)	Actividad	Referencias
<b>CR1</b>	H2P	Disminución de la expresión de la proteína	Helt & Galloway, 2001
	H2D	Proteína más estable que la <i>wt</i>	Watanabe et al., 1990
	T5,7A	Afecta la degradación por el proteasoma	Y-J. Liang et al., 2008
	Δ 6-10	No se afecta unión con pRb pero afecta capacidad transformante	Demers et al., 1996
	Δ 6-10	Decrece transformación celular	Brokaw et al., 1994
<b>CR2</b>	Δ 16-20	Decrece potencialmente la transformación celular	Brokaw et al., 1994
	C24S, E26Q	Modificación en transformación celular	Arroyo et al., 1993
	C24G	Capacidad transformante afectada	Watanabe et al., 1990
	N29P	Esencial para unión con pRb	Giarrè, 2001
	S31G	Fosforilación afectada pero sin alterar cooperación con <i>Ras</i>	Storey et al., 1990
	SS31-32GG	Inhibe la entrada en fase S en 60%	Demers et al., 1996
<b>CR3</b>	Δ 49-60	Regiones necesarias para la unión con GSTPI (glutathion S-transferasa P1-1)	Mileo et al., 2009
	Δ 89-98		
	T64D	Reduce unión con pRb	Todorovic et al. 2011
	CVQ68-70AAA	Unión de la proteína con pRb poco estable	Helt & Galloway, 2001
	Δ 79-83		
	S71G	Fosforilación afectada pero sin alterar cooperación con <i>Ras</i>	Storey et al., 1990
	S71I	Retiene la unión a pRb	Demers et al. 1996
	Δ 79-83	Pérdida de habilidad de E7 para unirse con α-glucosidasa	Zwerschke et al., 2000
	C91S	Unión anómala con E2F6	McLaughlin-Drubin et al., 2008
	C94G	Bajos niveles de proteína E7	Watanabe et al., 1990

Por su parte, la región CR3 de E7 contiene dos motivos CXXC que están separados por 29 ó 30 residuos, los cuales son característicos de unión a zinc y que se han descrito como dedos de zinc, los cuales son importantes como sitios de unión a DNA, sin embargo, no se ha demostrado que la proteína E7 tenga la

capacidad de unión a DNA (Brokaw et al., 1994). No obstante, el dominio CR3 de E7 se ha demostrado puede mediar la dimerización de sí misma y para mediar en la interacción directa con varias proteínas con las que interactúa E7. La región CR3 de E7 también se asocia con la capacidad de inactivar a los inhibidores de Ciclasas dependientes de ciclina (CDKs) p21 y p27, además de varios factores de transcripción que aparentemente contribuyen a oncogénesis mediada por el HPV, entre los que se encuentran la proteína de unión a caja TATA (TBB), un componente del complejo NURD de la desacetilasa de histona mi2 $\beta$ , las acetiltransferasas p300/CBP, el factor asociado a p300/CBP (P/CAF) y el factor de transcripción E2F (Liu et al., 2006).



**Figura 1.** Representación de la proteína E7 de HPV16, con sus regiones conservadas y principales actividades reportadas (Tomado de Pedroza et al 2011).

Mutaciones y deleciones en el gen de *E7* han permitido identificar sitios importantes para la interacción con diferentes proteínas blanco, así como para ejercer la actividad específica de la proteína E7 en el contexto celular y durante el proceso de transformación.

Conjuntamente, en el 2008 se identificaron 3 isoformas de la proteína E7, las cuales presentaban diferentes pesos moleculares y puntos isoeléctricos: E7a (17.5 kDa, pI 4.68), E7b (17 kDa, pI 6.18) y E7c (16 kDa, pI 6.96). Lo anterior se logró observar en células CaSki (células epiteliales transformadas con HPV16), además que este mismo grupo determinó que la proteína E7a es una proteína fosforilada y logró mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra la proteína E7 de HPV16 en transfecciones transitorias de células Cos, localizar a la proteína en citoplasma, retículo endoplásmico, complejo de Golgi y en núcleo (Valdovinos-Torres et al., 2008). Estas observaciones sugieren que diferentes modificaciones post-traduccionales deberán de llevarse a cabo sobre la proteína E7 para poder transitar entre los diferentes compartimientos celulares y así poder interactuar con las diferentes proteínas blanco.

### ***3.1.2 Actividad biológica de la proteína E7 de HPV.***

La proteína E7 contribuye principalmente a la inducción de síntesis de DNA y a la progresión del ciclo celular, mientras que E6 coopera para incrementar la supervivencia y progresión a la malignidad (Guccione et al., 2002).

La proteína E7 modifica las respuestas normales de las células debido a la inestabilidad genómica generada como consecuencia del daño al DNA, a través de la unión de E7 y pRb que permite la desregulación del ciclo celular (Doorbar et al., 2012). En líneas celulares, se ha observado que puede ocurrir la integración del genoma viral al genoma de la célula hospedera, esto ocurre a menudo en la región de E1/E2 con sustanciales deleciones o rupturas del genoma viral en esta región, lo que resulta en el sobre-expresión de E6 y E7 (Phelps et al., 1988).

La proteína pRb regula negativamente la actividad de varios factores transcripcionales incluyendo a miembros de la familia E2F. En condiciones normales, la proteína pRb se encuentra asociada al factor transcripcional E2F y para lograr la progresión en el ciclo celular se requiere la fosforilación de pRb para desensamblar el complejo pRb-E2F. En infecciones con HPV de alto riesgo, lo que ocurre es que E7 secuestra a pRb, dejando libre al factor E2F, permitiendo la progresión del ciclo celular (McLaughlin-Drubin et al., 2008). Se ha demostrado en cultivos de tejidos que esta liberación del factor E2F puede llegar a transformar fibroblastos de roedores, también inmortalizar queratinocitos humanos primarios y que esta transformación celular se lleva en cooperación con los oncogenes *ras* o *myc*, esto observado en células primarias de roedores (Gulliver et al., 1997; Ghittoni et al., 2010). También se ha demostrado que una isoforma fosforilada de E7 es capaz de asociarse con la histona H1 quinasa en la fase G2/M tardía del ciclo celular (Davies et al., 1993). Otras actividades se han asociado a esta proteína lo que ha permitido identificar sitios importantes en funciones de diferentes vías de señalización como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Proteínas blanco de la proteína E7 relacionadas con señalización celular.**

Vía de señalización	Blanco de la proteína E7	Actividad	Localización	Referencia
<b>Metabolismo</b>	$\alpha$ -glicosidasa	Actividad catalítica	Citosol	Zwerschke et al 1999
<b>Represor transcripcional</b>	E2F6	Desregulación	Núcleo	McLaughlin-Drubin et al., 2008
<b>Metástasis</b>	Inhibiendo Nm23-H1 y Nm23-H2	Desregulación de ciclo celular y diferenciación	Núcleo	Mileo et al., 2006
<b>Factores transcripcionales</b>	Familia AP-1 (incluidas c-Jun, JunB, JunD y c-Fos)	Inducción de transformación celular	Núcleo	Antinore et al., 1996
	MPP2	Co-transformación con <i>Ras</i>	Núcleo	Lüscher-Firzlaff et al., 1999
	Proteínas SMAD	Supresión de mediadores de SMAD, carcinogénesis	Citosol	Lee D.K. et al., 2002
	ISGF3	Pérdida de formación del complejo de transcripción interferón	Núcleo	Barnard & McMillan, 1999
<b>Modificación DNA</b>	BRG-1 (SWI/SNF)	Desregulación del control de ciclo celular	Núcleo	Lee D. et al., 2002
<b>Anti-apoptótico</b>	Mcl-1	Progresión tumoral	Citosol	Chen Y. W. et al., 2008
<b>Relación con histonas</b>	Mi2 $\beta$ , componente del complejo NURD	Control de la proliferación celular	Núcleo	Brehm et al., 1999

MPP2, fosfoproteína 2 de la fase M; ISGF3, factor 3 de genes estimulados por interferón.

### 3.1.3 Modificaciones post-traduccionales de E7 de HPV

Es posible que la proteína E7 sufra algunas modificaciones postraduccionales, ya que se ha descrito que E7 puede estar localizada en la fracción citoplasmática y que es una proteína fosforilada en residuos de Serina (Smotkin & Wettstein, 1987).

Los primeros reportes de que la proteína E7 es fosforilada demostraron que esta modificación ocurre en la región CR2, la cual presenta sitios consenso de fosforilación para CKII en los aminoácidos 31 y 32; este estudio fue confirmado posteriormente en E7 de HPV18, fosforilación más rápida respecto a la de E7 de HPV16, y finalmente reportado en E7 de HPV6. Además, se determinó que esta fosforilación es importante para la transformación celular pero no necesaria para la unión E7-pRb (Barbosa et al., 1990; Firzlaff et al., 1991). Sumado a estos reportes, se conoce la fosforilación en Ser71, por una cinasa aún no determinada, la cual es una fosforilación transitoria en la fase S del ciclo celular (Massimi & Banks, 2000). Se han probado mutaciones en estos sitios de fosforilación donde se ha observado alteración de la actividad biológica de la proteína.

Se han logrado determinar, posibles sitios de modificación postraduccional en las tres regiones consenso como se muestra en la Figura 2:

- CR1: fosforilación Thr5 y Thr 7
- CR2: Glicosilación en Asp30, 2 sitios de sulfatación Tyr23 y Tyr25 y sitios de fosforilación Ser31, Ser32, estas últimas confirmadas
- CR3: fosforilación Thr64, Thr78 y Ser71, Ser95



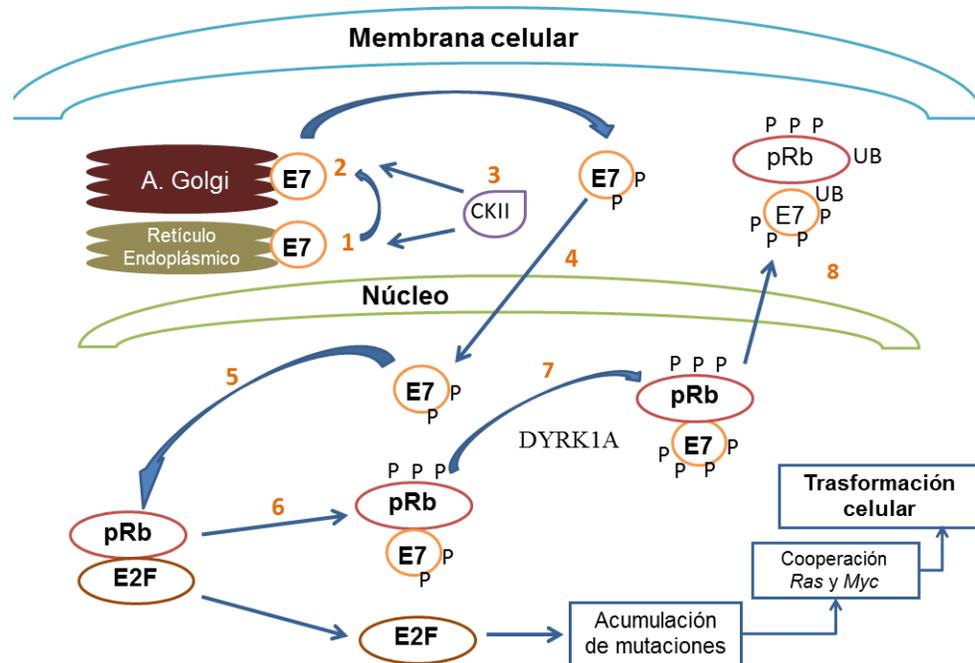
#### 4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer cérvico-uterino es un problema de salud pública en el mundo y en nuestro país, por lo que es necesario encontrar los mecanismos que permitan controlar el proceso canceroso producido por el HPV. Para este fin es necesario estudiar sus proteínas oncogénicas como son E5, E6 y E7, las cuales se sabe pueden llevar a la transformación celular y generar el desarrollo de cáncer.

De acuerdo a diversos reportes sobre la proteína E7 de HPV16, se sabe que es una proteína con pesos moleculares que varían desde 14 y hasta 21 kDa. La localización de la proteína E7 se ha reportado en citoplasma y en núcleo, pero recientemente también se demostró su presencia en Golgi y Retículo Endoplásmico. Además, se ha demostrado que E7 es una fosfoproteína la cual es modificada en los aminoácidos 31 y 32 por CKII, lo que le permite unirse a pRB. Al realizar un análisis computacional de la secuencia de aminoácidos de E7 de HPV16 se pueden identificar sitios putativos de modificaciones post-traduccionales; en específico se observan 5 sitios posibles de fosforilación, de los cuales sólo un sitio, que permita actividad y no ubiquitinación, fosforilable está presente en la región CR1, localizado en la Thr 5 como se propone en la figura 3. Las modificaciones post-traduccionales y en especial la fosforilación que le da carga positiva a la proteína puede modificar su peso molecular, pero además las modificaciones post-traduccionales pueden estar involucradas tanto en la actividad como en la localización de las proteínas.

Estas modificaciones post-traduccionales de la proteína E7 pueden generar cambios conformacionales que le permitan interactuar con diferentes proteínas celulares e incluso distribuirse en diferentes compartimientos celulares. Por lo que,

esta investigación se enfocará a determinar el efecto de la fosforilación del aminoácido 5 (Thr5, en la región CR1) de la proteína E7 de HPV16 con la finalidad de identificar si la fosforilación de este sitio es importante para modificar su peso molecular, su localización y su actividad transformante.



**Figura 3. Modelo de procesamiento de la proteína E7 de HPV16.** 1) Síntesis en RE. 2) Transporte a Aparato de Golgi. 3) Fosforilación por CKII. 4) Transporte a núcleo por miembros de Nup. 5) Interacción con pRb. 6) Liberación de E2F. 7) Fosforilación de E7 por DYRK1A. 8) Transporte a citoplasma del complejo E7-pRb y degradación final por ubiquitinación.

## 5. HIPÓTESIS

La fosforilación en la Treonina 5 del domino CR1 de la proteína E7 de HPV16 regula su tránsito celular y su actividad transformante.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la fosforilación de la región CR1 de E7 de HPV16 en su tránsito a través de compartimientos celulares y su papel en transformación celular.

### ***6.1 Objetivos particulares***

- Caracterizar bioquímicamente a la proteína E7T5G de HPV16 en líneas celulares.
- Caracterizar el tránsito de la proteína E7T5G de HPV16 a través de los diferentes compartimientos celulares en líneas celulares.
- Determinar la actividad transformante de la proteína E7T5G de HPV16 en líneas celulares.

## **7. METODOLOGÍA**

### **7.1 Cultivos celulares.**

Se utilizaron las líneas celulares CaSki (carcinoma epidermoide cervical de humano) transformadas naturalmente con HPV-16 y las células HaCaT (queratinocitos normales de humano) y Cos (células de riñón de mono semejantes a fibroblastos que expresan el antígeno T de SV40) las cuales fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos penicilina/estreptomicina (100 unidades/ml de penicilina base y 100 µg/ml de estreptomicina base) en un ambiente húmedo a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **7.2 Construcción de plásmidos.**

Se utilizó el plásmido pcDNA3, el cual es un vector para la expresión transitoria o estable de genes en sistemas eucarióticos. En este vector se insertó la secuencia génica que codifica para la proteína E7 silvestre de HPV16 (E7W) o la correspondiente para la proteína E7 de HPV16 mutada en el quinto codón (E7T5G).

Para esto se realizó una mutación sitio-dirigida en la secuencia génica que codifica para la proteína silvestre E7W con la finalidad de obtener la mutante E7T5G, por medio de dos PCRs. En la primera PCR se usó un oligonucleótido mutagénico (T5G) que contuvo un sitio de corte (Eco RI), posteriormente se purificó el fragmento producido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 6%/ TAE, extracción y precipitación con etanol/acetato de amonio. El fragmento de DNA purificado fue utilizado como molde para una segunda PCR con un oligonucleótido que contuvo la secuencia para otro sitio de corte (Hind III). El

segundo producto de PCR que tuvo la mutación deseada, se purificó para ser digerido por las enzimas de restricción Eco RI y Hind III, al igual que el plásmido pcDNA3. Posteriormente los fragmentos digeridos se purificaron como se describió y se pusieron a ligaren una proporción 1:3 (plásmido-inserto) a 16°C por 18 h con enzima T4 DNA ligasa. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes DH5 $\alpha$ . De las colonias obtenidas después de 18 h a 37°C en agar-ampicilina, se extrajo el DNA plasmídico para análisis con enzimas de restricción (Eco RI/Hind III) para determinar cuál de las colonias porta el plásmido recombinante deseado (pcDNA3-16E7T5G). Una vez establecido qué colonia tiene el plásmido adecuado, se purificó éste por medio de un kit comercial (QIAGEN) para los experimentos subsecuentes.

### ***7.3 Transfección estable de células con plásmido pcDNA3-16E7W y -16E7T5G.***

Se utilizaron los plásmidos que contenían la secuencia del gen *E7* tanto silvestre (pcDNA3-16E7W) como mutado en el codón 5 (Thr-Gly) denominado pcDNA3-16E7T5G, los cuales se usaron para transfectar establemente células HaCaT donde las proteínas E7 fueron expresadas por separado. Para esto se sembraron  $6 \times 10^4$  células en cajas de cultivo donde se dejaron adherirse, se eliminó el medio y se lavaron con PBS, después se incubaron por 5 h con los plásmidos diluidos en medio DMEM sin SFB y con lipofectamina de acuerdo a las especificaciones del proveedor (GIBCO-Invitrogen). Posteriormente, se retiró esta solución y se sustituyó el medio con DMEM-10% SFB con antibióticos. A las 48 h las células fueron tripsinizadas y pasadas 1:4 a cajas nuevas con medio DMEM-10% SFB. Después de 6 h se añadió el antibiótico de selección, que en este caso fue

G418 (análogo a la neomicina) a 800 µg/mL. Las células se mantuvieron en cultivo durante 15 días con cambios de medio conteniendo el G418 cada tercer día hasta la aparición de colonias claramente visibles y separadas unas de otras.

#### ***7.4 Extracción de RNA de cultivos celulares.***

De las líneas celulares HaCat transfectadas y CasKi se lisaron con tiocianato de guanidina y β-mercaptoetanol, se incubaron con fenol saturado con H<sub>2</sub>O-DEPC (dietilpirocarbonato), cloroformo isoamílico (49:1) y acetato de sodio 2M posteriormente se centrifugó por 20 minutos a 8,000 rpm en rotor SS34 de Sorvall para separar el RNA. El RNA se precipitó 2 veces con isopropanol toda la noche a -20°C y posteriormente se lavó con etanol al 70% con H<sub>2</sub>O-DEPC, se eliminó el etanol y se dejó secar la pastilla por al menos 30 minutos, el RNA se disolvió en 250 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC a este RNA se le agregaron 3 volúmenes de etanol absoluto y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Se tomaron alícuotas de 2.5 µL para determinar la concentración de RNA en espectrofotómetro (260 nm) y otra de 10 µL para evaluar la integridad de RNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (70V por 1h), posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio y el gel fue colocado en el equipo Odyssey (LI-COR biosciences) para digitalizar y documentar las imágenes.

#### ***7.5 Detección de RNA de E7 por RT-PCR en células transfectadas.***

Con el RNA obtenido se realizó una reacción de RT para la cual se incubaron 2 µg de RNA total con 160 U de enzima Mo-MLV RT (USB), dNTP's 10 mM (Roche) y 60 pmol de oligo (dT)<sub>15</sub> (Roche) para obtener cDNA, se

desnaturalizó el RNA a 65°C por 10 minutos, seguido de 10 minutos a temperatura ambiente, 1 h a 37°C y finalmente 10 minutos a 95°C.

Posteriormente, se tomaron 3 µL de la reacción de RT y se incubaron con 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 2 mM dNTP's (Roche), 0.625 U de Taq polimerasa (Promega) y oligonucleótidos específicos para E7 de HPV16 cuyas secuencias aparecen a continuación:

F 5' CCGCTCGAGCATGGAGATACACCTACATTG 3'

R 5' CGGCATCCCTTATGGTTTCTGAGAACAGAT 3'

Las condiciones para realizar la reacción de PCR, fueron las siguientes:

Gen	Desnaturalización inicial	Ciclos	Desnaturalización	Alineamiento	Temperatura de extensión	Extensión final
E7	95°C/5 min	35	95°C/30 s	55°C/30 s	72°C/1 min	72°C/15 min Seguida de 30°C / 30 s

Todos los productos de PCR fueron analizados mediante geles de poliacrilamida al 8%, teñidos con bromuro de etidio y colocados en el equipo Odyssey (LI-COR biosciences) para digitalizar y documentar las imágenes.

### ***7.6 Cuantificación de proteínas por la técnica de BCA de Pierce.***

Se utilizó el kit de *Micro BCA protein Assay* en placa de ELISA, colocando 5 y 10 µL de muestra proteica por duplicado en distintos pozos de la placa, llevados a 50 µL con agua cada uno. De igual manera se incluyó una curva de calibración por duplicado cada vez que se determinó la concentración proteica de una muestra

desconocida. Se preparó la solución desarrolladora de color siguiendo las recomendaciones del proveedor, utilizando 50  $\mu\text{L}$  por pozo. La placa con las muestras se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 35 min y se leyó la absorbancia a 562 nm frente a un blanco en lector de placas.

### ***7.7 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS- PAGE).***

Las células CaSki, HaCat-16E7W y HaCat-16E7-T5G fueron lisadas en buffer RIPA (0.1% NP-40 v/v, 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1% desoxicolato de sodio w/v y 0.1% SDS w/v) con inhibidores de proteasas (ROCHE) y la concentración de proteínas fue determinada por el kit de BCA.

Se preparó la mezcla del gel separador de poliacrilamida al 15%, se dejó polimerizar entre dos cristales; después se preparó el gel concentrador al 4% que se dejó polimerizar sobre el separador. Posteriormente, se prepararon las muestras problema conteniendo cada una 80  $\mu\text{g}$  de proteína con buffer de muestra (Tris 100 mM pH 6.8, DTT 65 mM, 2% SDS, 0.01% azul de bromofenol y 8.6% Glicerol) poniéndolas por 5 min en un baño de agua hirviendo. Por otro lado, se ensambló el gel en la cámara correspondiente, se agregó el buffer de corrida (Tris 25 mM, Glicina 192 mM y 0.1% SDS) y se colocaron las muestras para una corrida de 16 h a 70 V.

### ***7.8 Ensayo de Western blot.***

Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida al 15% fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa PROTRAN a 200 V durante 5 h en

buffer de transferencia (24 mM Tris, 193 mM glicina y etanol 23.2% v/v). Las membranas se bloquearon durante 30 min a 4°C con PBS-Tween 20 0.05%, 10% leche descremada con agitación continua. Después de esto, la membrana se incubó por 16 h con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-E7 a 4°C con agitación continua. Al día siguiente, las membranas se lavaron 5 veces con PBS-Tween 20 0.05%, para después incubarse con el segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (DAKO). Finalmente, las membranas se lavaron nuevamente 5 veces con PBS-Tween 20 0.05% y se revelaron mediante quimioluminiscencia, de acuerdo a las especificaciones del proveedor Perkin Elmer. Los filtros fueron colocados en el equipo Odyssey para digitalizar y documentar las imágenes.

### ***7.9 Detección de E7 por marcado metabólico e inmunoprecipitación.***

Células CaSki, HaCat-E7W y HaCat-E7T5G a 80% de confluencia se lavaron con PBS y se incubaron por 30 min en DMEM libre de metionina y cisteína suplementado con 5% de SFB previamente dializado contra PBS. Transcurrido ese tiempo, se adicionó 50 µCi de [<sup>35</sup>S] Met-Cys/ml en DMEM y se incubó por 16 h. Posteriormente las células se lavaron con PBS y se lisaron con buffer RIPA con inhibidores de proteasas.

Las muestras normalizadas se incubaron toda la noche con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-E7; al día siguiente, se adicionó Proteína A-sefarosa acoplada con anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón por 2 h a 4°C, Los complejos inmunes formados se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 min a 4°C, se lavaron 3 veces con buffer RIPA y una vez con Tris-HCl 50 mM pH 6.8, centrifugando cada

vez. Finalmente las pastillas se resuspendieron en buffer de muestra (Tris 100 mM pH 6.8, DTT 65 mM, 2% SDS, 0.01% azul de bromofenol y 8.6% Glicerol), se hirvieron durante 5 min y se separaron en gel de poliacrilamida al 15% desnaturizante y reductor. Los geles fueron tratados por 30 min con una solución de 40% metanol/ 7% ácido acético y después fueron tratados con solución de Enlighting (NEN Research Products). Por último los geles fueron secados y expuestos a un film X-OMAT (KODAK) por al menos 5 días a  $-70^{\circ}\text{C}$  para observar las bandas.

#### ***7.10 Marcaje de proteínas sintetizadas de novo con ortofosfato [ $^{32}\text{P}$ ].***

Los cultivos celulares de HaCat-E7W, HaCat-E7T5G y CaSki se mantuvieron en ayuno por 24 h en medio DMEM con 0.2% de SFB, después se les cambió el medio de cultivo por DMEM libre de fosfatos que contuvo 0.2% de SFB dializado contra TBS y se incubaron por 1 h. Posteriormente, las células fueron incubadas con [ $^{32}\text{P}$ ]-ortofosfato por 1 h, después de lo cual el medio fue reconstituido al 10% con SFB dializado y se incubaron a diferentes tiempos (1 y 6 h). En cada tiempo de incubación, las células fueron lisadas con buffer RIP $\beta$  que contuvo inhibidores de proteasas y fosfatasas. Los lisados fueron incubados con anticuerpo anti-E7 y se inmunoprecipitó la proteína marcada. A las muestras se les adicionó PA-sefarosa acoplada con anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón y se incubaron por 2h a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación continua para captar al anticuerpo monoclonal unido a la proteína E7. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas y las pastillas se lavaron con buffer RIP $\gamma$  y con Tris 50 mM, antes de resuspender en buffer de muestra 1X. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al

15%, el cual fue secado y expuesto contra un film por 1 a 5 días a  $-70^{\circ}\text{C}$  para visualizar las bandas por autorradiografía.

### ***7.11 Transfección transitoria de células Cos con los plásmidos pcDNA3-16E7W y -16E7T5G.***

Se sembraron  $6 \times 10^4$  células Cos-7 en cajas de cultivo con cubreobjetos redondos y se dejaron adherir durante 2 h, después se eliminó el medio normal, se lavaron con PBS y se incubaron por 5 h con  $10 \mu\text{g}$  de pcDNA3-16E7W o pcDNA3-16E7T5G (proteína mutante) diluido en medio DMEM sin SFB y con lipofectamina de acuerdo a las especificaciones del proveedor (GIBCO-Invitrogen). Posteriormente, se retiró esta solución y se sustituyó el medio con DMEM-10% SFB sin antibióticos y se incubaron durante 16, 24 y 48 h en condiciones normales de cultivo. Al finalizar cada período de incubación, las células se fijaron con p-formaldehído y se guardaron a  $4^{\circ}\text{C}$  en PBS-azida de sodio 0.02% para usarlas posteriormente en las pruebas de inmunofluorescencia, como se describe más adelante.

### ***7.12 Localización de E7 de HPV-16 por inmunofluorescencia.***

Las células fueron sembradas en cubreobjetos y cultivadas a un 80% de confluencia, las células procedentes de una transfección transitoria (células Cos-7), éstas se fijaron con p-formaldehído al 4% durante 20 min, se lavaron con PBS y después se bloquearon durante 20 min con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS-Tritón X-100 al 0.3% para permeabilizar las células. Posteriormente, las células se incubaron 2 h con anticuerpos anti-E7 diluidos en una solución de

bloqueo (suero de conejo 1:100 ó IgG purificada de los anticuerpos monoclonales 2 ng/ $\mu$ L); después los cubreobjetos se lavaron con PBS y se incubaron 2 h con el segundo anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado con Alexa 594 (fluorescencia roja) o anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 488 (fluorescencia verde) diluidos en buffer de bloqueo. Finalmente las muestras fueron montadas con Mowiol 4-88/glicerol y fueron observadas con objetivo 63x del microscopio de epifluorescencia marca Zeiss® mediante el programa Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.6®.

### **7. 13 Curvas de crecimiento.**

A partir de los cultivos celulares (descritos previamente), se realizó tripsinización de células, posterior a esto, se realizó conteo de células viables en cámara de Neubauer utilizando colorante de azul de tripano para diferenciar las células vivas de las muertas, y de donde se obtuvo la concentración celular por cada mililitro de medio (número de células viables x  $10^4$  /mL). Las células se sembraron por duplicado en medio DMEM-10% SFB a una concentración de  $6 \times 10^4$  células/mL en cajas Petri de 35 mm (p35) y se dejaron incubando por diferentes tiempos (0, 1, 2, 4, 6, 8, y 10 días). Al término de cada punto, las células fueron tripsinizadas y contadas las células viables usando azul de tripano. Los resultados fueron graficados en número de células totales por p35 contra tiempo de cultivo para posteriormente calcular mediante una ecuación matemática el tiempo de doblaje y densidad de saturación.

#### ***7.14 Cultivo de células en agar suave para medición del grado de transformación.***

Previo al ensayo se crecieron en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> cada una de las líneas celulares, luego se tripsinizaron como se ha descrito, se contaron en cámara de Neubauer y se tomó una cantidad determinada para que por dilución se obtengan las cantidades necesarias de células a razón de  $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^4$  células/plato por duplicado. Las diluciones se hicieron en SFB. Para el ensayo de formación de colonias en agar suave, las células de cada línea celular a probar se sembraron en placas por duplicado a las cantidades especificadas en 2 mL de agar suave al 0.4% / DMEM-10% SFB sobre una cama previamente formada de 2 mL de agar rígido al 1%/DMEM-10% SFB. Cada quinto día se adicionaron 1mL de medio DMEM-10% SFB para complementar con nutrientes frescos y además evitar que se resequen los geles. Después de 15 días de cultivo a 37° C se contaron el número de colonias formadas (focos de transformación) y se analizaron los resultados.

#### ***7.15 Análisis de resultados.***

Se compararon los resultados de media aritmética, desviación estándar, porcentajes, proporciones, logaritmos y antilogaritmos, respectivamente, en cada ensayo realizado con las células que expresaban a la proteína con la mutación en relación a sus controles que fueron células transfectadas con el vector vacío (control negativo) y células con la proteína silvestre (control positivo).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Caracterización de líneas celulares que expresan la oncoproteína E7 de HPV16 silvestre y mutante E7T5G.

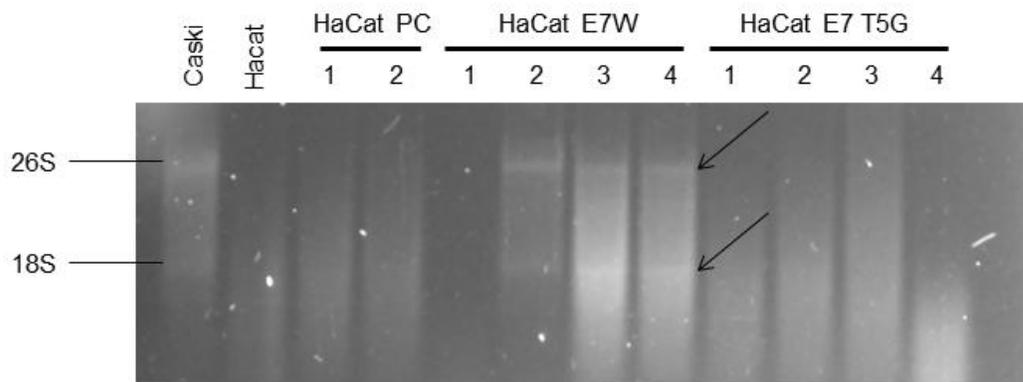
Células HaCat fueron transfectadas con un plásmido, portador del gen que codifica para la oncoproteína E7 de HPV16 silvestre o para la proteína mutante, pcDNA3, pcDNA3-16E7W, o pcDNA3-16E7T5G. Después de 2 semanas de selección con antibiótico G418, se obtuvieron 2 “pools” (poblaciones) de células HaCat transfectadas solo con plásmido pcDNA3 (HaCat PC); se seleccionaron 4 “pools” (poblaciones) de células HaCat transfectadas con HPV16 E7 silvestre (HaCat E7W) y se escogieron 4 “pools” de células HaCat transfectadas con HPV16 E7 mutante T5G (HaCat E7T5G) como se resume en la Tabla 3. Células Caski fueron utilizadas en todos los experimentos como control positivo para la expresión de la oncoproteína E7 de HPV16.

**Tabla 3. Líneas celulares obtenidas por transfección con el gen E7 de HPV16 silvestre y mutante.**

Línea celular	DNA transfectado	Característica
Caski	HPV 16 ~600 copias	Control positivo
HaCat	Ninguno	Queratinocitos humanos inmortalizados
HaCat PC	pcDNA3	Control negativo 2 “pools”
HaCa-E7W	pcDNA3-E7WT	Expresan HPV16 E7 Silvestre 4 “pools”
HaCat- E7T5G	pcDNA- E7T5G	Expresan HPV16 E7 mutante T5G 4 “pools”

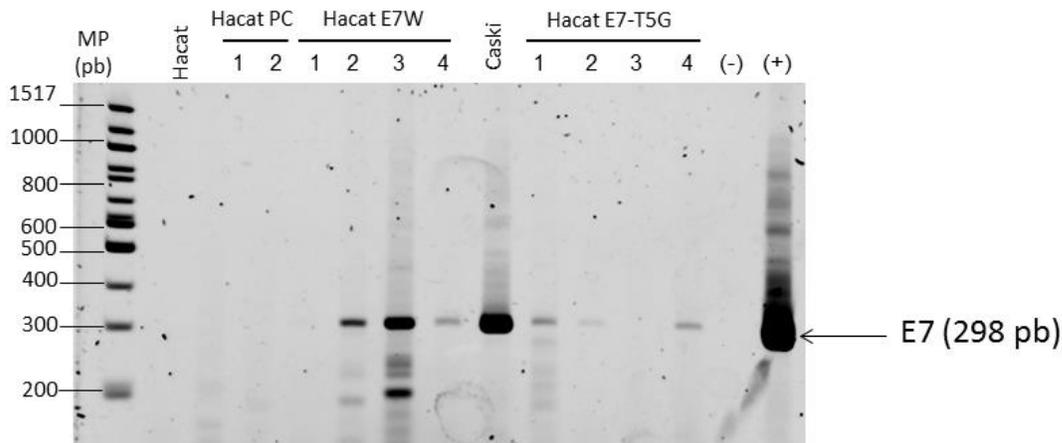
## 8.2 Identificación de transcritos de HPV16 E7 silvestre y mutante en células HaCat transfectadas.

Después de realizar la transfección estable de células HaCat con los diferentes plásmidos para la expresión de HPV16 E7 silvestre y mutante, se obtuvo RNA de las diferentes líneas celulares por medio de tiocianato de guanidina y se evaluó la integridad del RNA en gel de agarosa 1%, se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en el analizador de imágenes a 600 nm (equipo Odyssey, LI-COR Biosciences). Los resultados mostraron que las bandas 18 y 26S (marcadores de integridad de RNA) se observaron claramente en las células CasKi y en los diferentes “pools de las células HaCat E7W (Fig. 4). En los carriles de las células HaCat PC y HaCat E7T5G no se observó una buena definición de las bandas de integridad del RNA por lo que se procedió a realizar extracción con Trizol (Invitrogen) en donde se pudo obtener RNA no degradado (dato no mostrado).



**Figura 4. Integridad de RNA de células HaCat.** Células HaCat expresando E7W y E7T5G fueron tratadas por el método de tiocianato de guanidina para extracción de RNA. La integridad de los RNAs fue determinada por separación en gel de agarosa 1%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en el equipo Odyssey a 600 nm. Las flechas indican la posición de las subunidades ribosomales 18 y 26 S.

Una vez obtenido el RNA total se llevó a cabo una reacción de RT (reverso transcriptasa) para obtener cDNA, seguida de una reacción de PCR para amplificar los transcritos de E7 de HPV16 de las diferentes líneas celulares. Los productos de PCR fueron analizados mediante gel de poliacrilamida al 8%, teñido con bromuro de etidio y las bandas específicas de amplificación se observaron a 600 nm en el equipo Odyssey para digitalización de imágenes. Los resultados mostraron una banda específica de (298 kb) correspondiente al gen E7 en las líneas celulares HaCat E7W “pools” 2-4 con una alta expresión en el “pool” 3 (Fig. 4). En el caso de las células HaCat E7T5G se observó la banda del gen E7 en los pools 1, 2 y 4, siendo la expresión en menor proporción que lo observado para E7W (Fig. 5). El RNA de células Caski fue utilizado como control positivo para la presencia del gen E7 y el plásmido pcDNA3-E7W como control positivo para el PCR. No se observó producto de RT-PCR en las células HaCat y HaCat PC como era de esperarse.



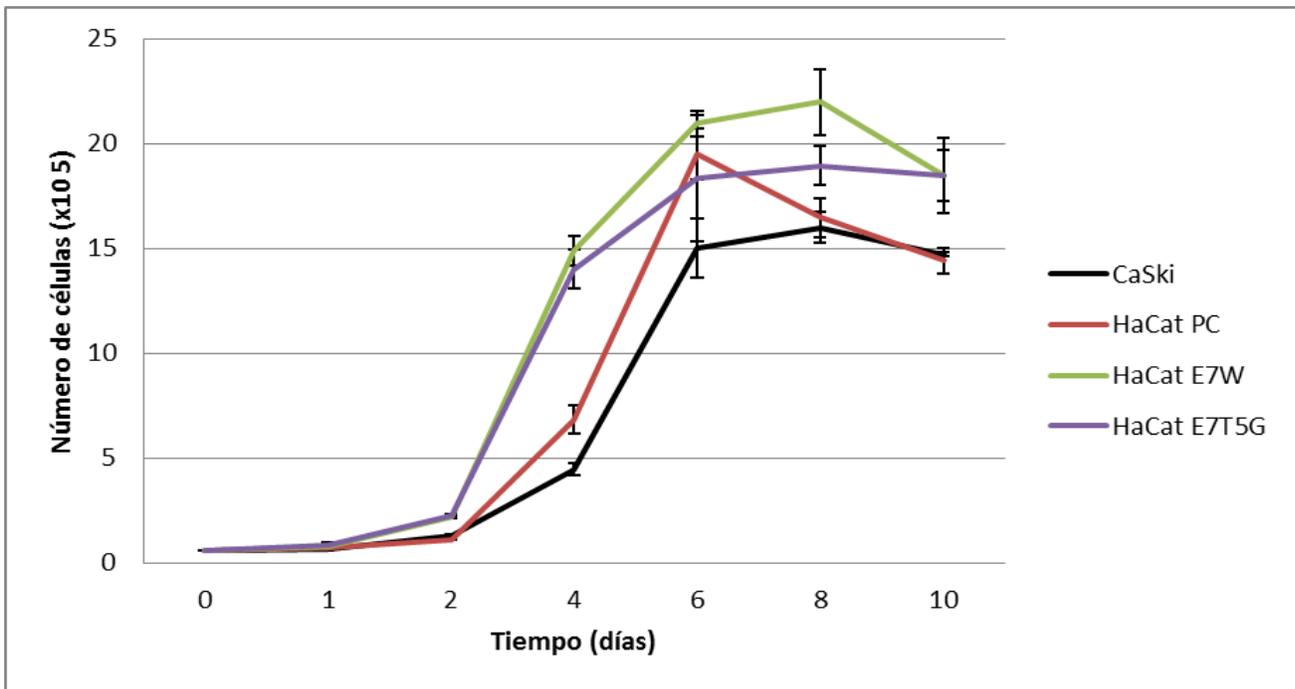
**Figura 5. Determinación del transcrito del gen E7 de HPV16 en células HaCat.**

Reacciones de RT-PCR fueron llevadas a cabo con RNA extraído de células HaCat transfectadas para expresar E7W y E7T5G. Los productos del PCR fueron separados en gel de poliacrilamida 8%, teñido con bromuro de etidio y el DNA fue visualizado a 600 nm en el equipo Odyssey. La flecha indica la posición del amplicón del gen E7 de HPV16 de 298 pb. MP- marcador de peso molecular en pares de bases (pb). (-) control negativo de la reacción de PCR sin DNA y (+) control positivo, plásmido pcDNA3-E7W purificado.

### ***8.3 Cinética de proliferación de las líneas celulares transfectadas con E7W y E7T5G de HPV16.***

Una vez identificado que el transcrito del gen E7W y E7T5G se expresa en los diferentes “pools” de las células HaCat transfectadas se seleccionaron los “pools” 3 y 4 para las líneas celulares HaCat-E7W y E7T5G respectivamente, para continuar los ensayos de proliferación celular para evaluar la actividad transformante de la oncoproteína E7 en las diferentes líneas celulares. Para ello, se sembraron células ( $6 \times 10^4$  células/caja petri) y se dejaron crecer por diferentes tiempos, al término de los cuales las células fueron contadas. Los datos de los conteos se graficaron (no. células vs. Tiempo) como se muestra en la Fig. 6 y de aquí se calculó el tiempo de duplicación. En la gráfica se observa claramente que las células HaCat PC y Caski presentaron un tiempo de retraso (tiempo en que tardan en recuperarse de la tripsinización) más largo (3 días) que las células HaCat que expresan E7W y E7T5G (2 días). De la misma manera se observó que las células HaCat E7W y HaCat E7T5G presentan una densidad de saturación más alta ( $2.0 \times 10^6$  y  $1.8 \times 10^6$ , respectivamente) que las células control HaCat PC y CaSki ( $1.9 \times 10^6$  y  $1.5 \times 10^6$ , respectivamente).

Al calcular el tiempo de duplicación se observó que las líneas celulares HaCat E7W y HaCat E7T5G presentaron tiempos de duplicación de 17.4 y 18.2 h, respectivamente, lo cual fue menor que lo observado en las células control HaCat PC y CaSki donde los tiempos fueron de 18.4 y 25.4 h, respectivamente.



Línea celular	Tiempo de duplicación (horas)	Reducción en tiempo de duplicación (%)	Número de Células (1x10 <sup>6</sup> )
CaSki	25.4	-	1.5
HaCat PC	18.4	-	1.9
HaCat E7W	17.4	5.4	2.0
HaCat E7T5G	18.2	1.09	1.8

**Figura 6. Cinética de proliferación de células HaCat transfectadas con E7W y E7T5G.** Curvas de crecimiento de las diferentes líneas celulares fueron obtenidas a partir de contar células a diferentes tiempos de proliferación (0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 días).

Esto sugiere que las células transfectadas con E7W y E7T5G han alterado su capacidad de proliferación ya que se duplican más rápidamente que las células control.

### 8.3.1 Ensayos de transformación

En los ensayos de crecimiento en agar suave se observó que E7T5G presenta mayor capacidad de transformación respecto a su control que fue 6.3 veces más, además que E7W también presenta mayor capacidad de transformación celular pero en menor medida respecto a su control con 3.5 veces. (Tabla 4).

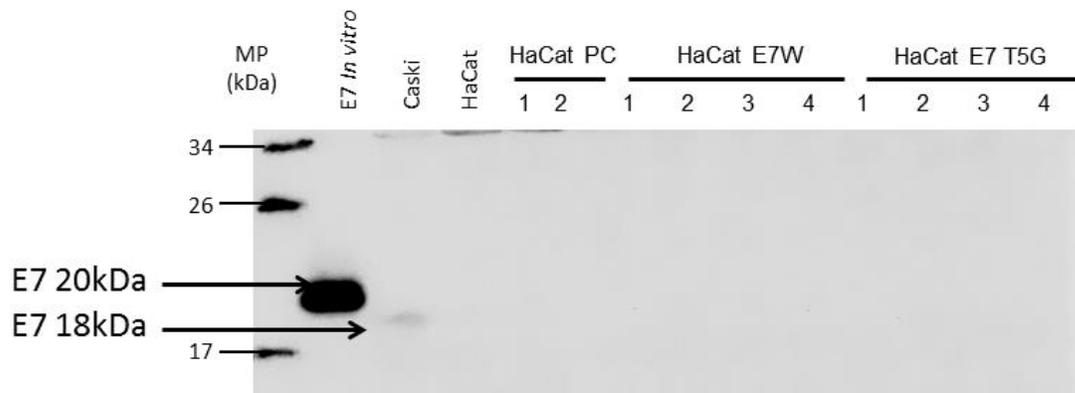
**Tabla 4. Colonias en agar suave obtenidas de las células con el gen E7 de HPV16 silvestre y mutante.**

Línea celular	No. Colonias en agar ( $1 \times 10^4$ )	No. Colonias en agar ( $1 \times 10^3$ )	Tasa
CaSki	173	80	-
HaCat PC	29	19	1.0
HaCat E7W	101	76	3.5
HaCat E7T5G	183	84	6.3

### 8.4 Identificación de la proteína E7W y E7T5G en células HaCat transfectadas.

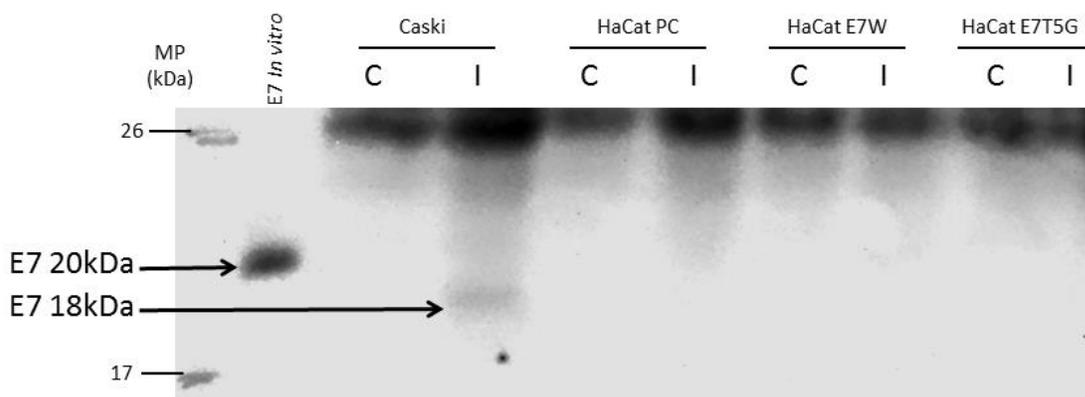
Las diferentes líneas celulares CaSki, HaCat E7W, HaCat E7T5G y HaCat PC fueron lisadas con buffer RIPA con inhibidores de proteasas y 80  $\mu$ g de proteínas totales de cada lisado fueron separados en 15% SDS-PAGE. Posteriormente, fueron tratadas por Western-blot con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-E7 (clona 8C9, Invitrogen) como se describió en la Metodología. En la Fig. 7 se puede observar que los controles positivos, proteína E7 traducida *In vitro* y de células CasKi, se presenta una banda de peso molecular aproximados de 20 y

18 kDa respectivamente. Sin embargo, en los lisados de las líneas celulares HaCat E7W y E7T5G, no fue posible observar ninguna banda aparente.



**Figura 7. Identificación de la proteína E7 de HPV16 por Western blot.** Ochenta microgramos de proteínas totales de células HaCat PC, E7W y E7T5G fueron tratadas para inmuno Western blot con anticuerpo monoclonal de ratón 8C9 (dil 1:500) y cabra anti-ratón HRP (dil 1:2000), revelado por quimioluminiscencia y visualizado en el equipo Odyssey a 428 nm. Las flechas indican la posición de las proteínas E7 de HPV16 (20 kDa) producida *In Vitro* y la presente en CasKi (18kDa) MP- marcador de peso molecular (kDa-kilodaltones).

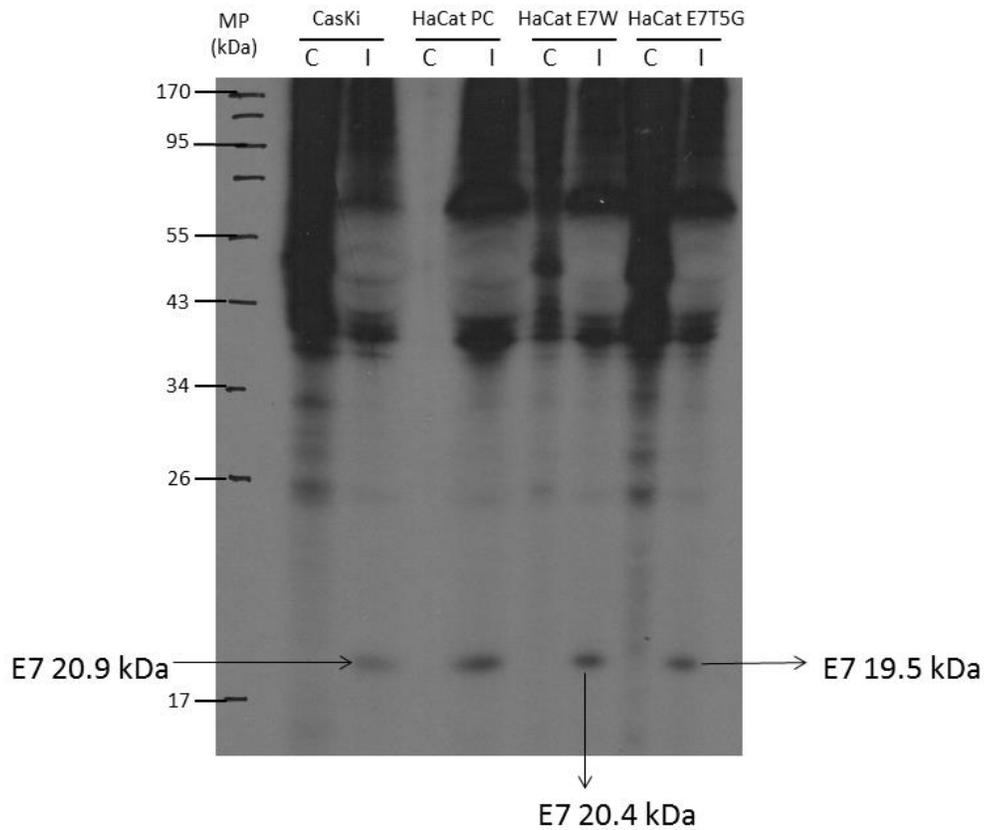
Debido a que no pudimos observar la proteína E7 por Western blot directo en las líneas celulares transfectadas, posiblemente por una baja expresión de las proteínas en las líneas celulares, se realizaron inmunoprecipitaciones con la finalidad de concentrar la proteína E7 a partir de los lisados de las líneas celulares. Para ello, 900 µg de proteína total de los diferentes lisados celulares se incubaron con anticuerpo anti-E7 policlonal C24 de conejo para formar complejos inmunes para E7, se precipitaron con PA-sefarosa y se procesaron para Western blot como se describió anteriormente. Los resultados mostraron una banda clara de 18 kDa en la línea celular de CasKi, pero nuevamente no se pudo observar ninguna banda en los precipitados de las líneas celulares de HaCat E7W y E7T5G (Fig. 8).



**Figura 8. Inmunoprecipitación-Western blot para identificar la proteína E7 de HPV16 en células HaCat transfectadas.** Novecientos microgramos de los diferentes lisados celulares fueron incubadas con anticuerpo anti-E7 policlonal C24 de conejo para inmunoprecipitar E7, tratados para Western blot con anticuerpo monoclonal anti-E7 C2 (1:500) y revelados por quimioluminiscencia con anticuerpo de cabra anti-ratón HRP (dil 1:2000). La quimioluminiscencia fue visualizada en el equipo Odyssey a 428 nm. Las flechas indican la posición de las proteínas E7 de HPV16. MP- marcador de peso molecular (kDa- kilodaltones). *E7 In Vitro* control positivo peso ~20kDa, C= control; I= inmunoprecipitado con anticuerpo C24

Dado que tampoco fue posible identificar a las proteínas E7W y E7T5G en las células HaCat transfectadas, por medio de los ensayos de inmunoprecipitación, llevó a cabo el marcado de las células con radioactividad para incrementar la sensibilidad del sistema de detección. Para esto las proteínas celulares fueron marcadas con [<sup>35</sup>S] Met-Cys por 16 h como se describió en la sección de Metodología. Las células se lisaron y la proteína E7 se inmunoprecipitó con anticuerpo policlonal de conejo anti-E7 (C89), separadas en SDS-PAGE 15% y el gel tratado para fluorografía con solución Enlightning (DuPont), secado y expuesto a un film X-OMAT por 5 días. La placa autorradiográfica muestra una banda en los precipitados de las diferentes líneas celulares alrededor de 20 kDa (Fig. 9). Para poder calcular el peso molecular de E7 en las diferentes líneas celulares, se

graficaron los pesos moleculares estándar contra la distancia recorrida por éstos en el gel, obteniéndose que la proteína E7 de células CasKi mostró un peso molecular de 20.9 kDa, mientras que para HaCat E7W fue de 20.4 y E7T5G fue de 19.5 kDa.



**Figura 9. Identificación de la proteína E7 de HPV16 en células HaCat transfectadas con los diferentes genes de E7 de HPV16.** Las diferentes líneas celulares fueron marcadas con [<sup>35</sup>S] Met-Cys por 16 h, lisadas en RIPA buffer e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-E7 policlonal C89 de conejo. Los inmunoprecipitados fueron corridos en gel de poliacrilamida al 15%, después tratado para fluorografía con Enlightning, secado y expuesto a film X-OMAT por 5 días. Flecha indica posición de las proteínas E7 de HPV16. MP- marcador de peso molecular (kDa- kilodaltones); C= control; I= inmunoprecipitado.

### 8.5 Caracterización de la proteína E7 de HPV16 fosforilada.

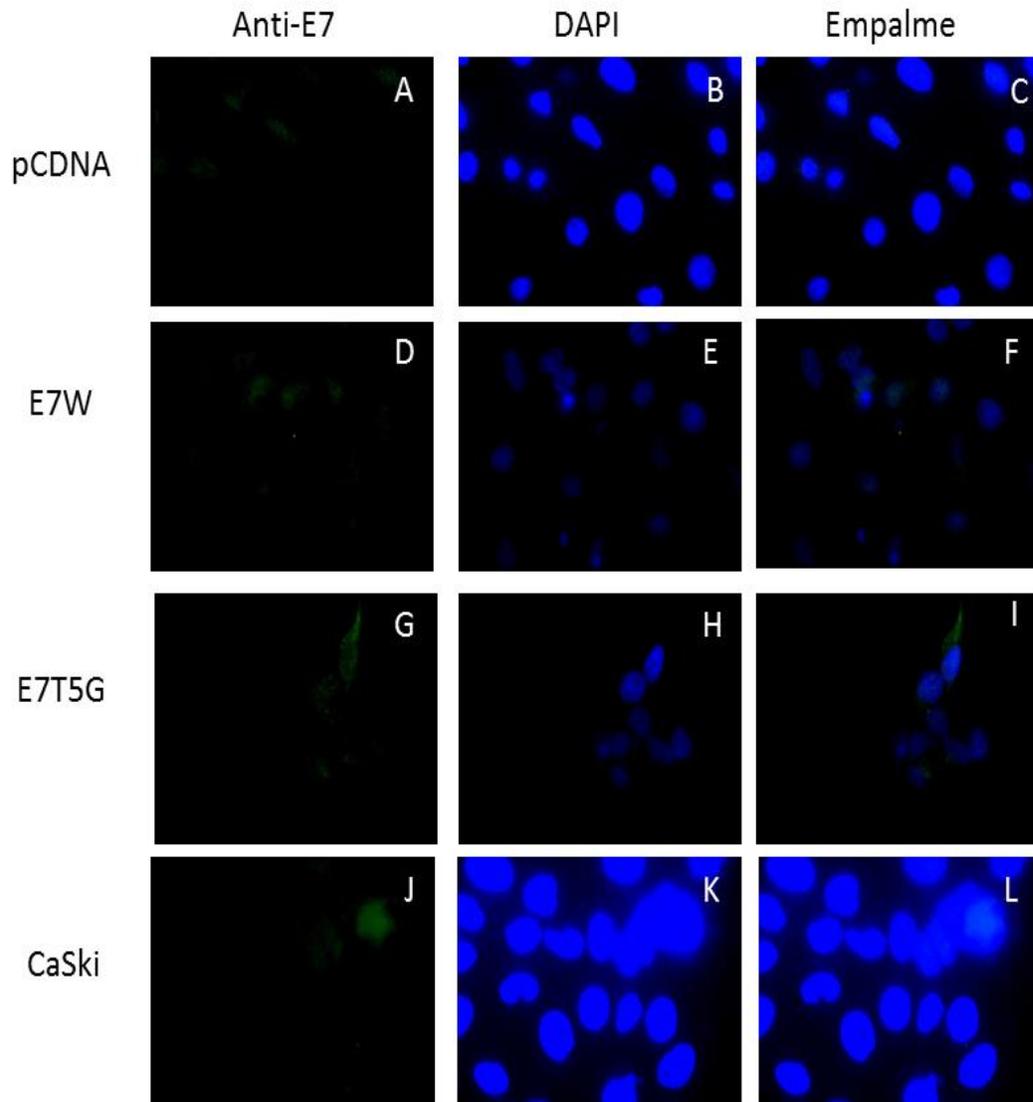
Una vez demostrada la presencia de las proteínas E7W y E7T5G en las células HaCat transfectadas, se procedió a llevar a cabo el marcado de las células con <sup>32</sup>P radioactivo para identificar la proteína E7 fosforilada. Para esto las células



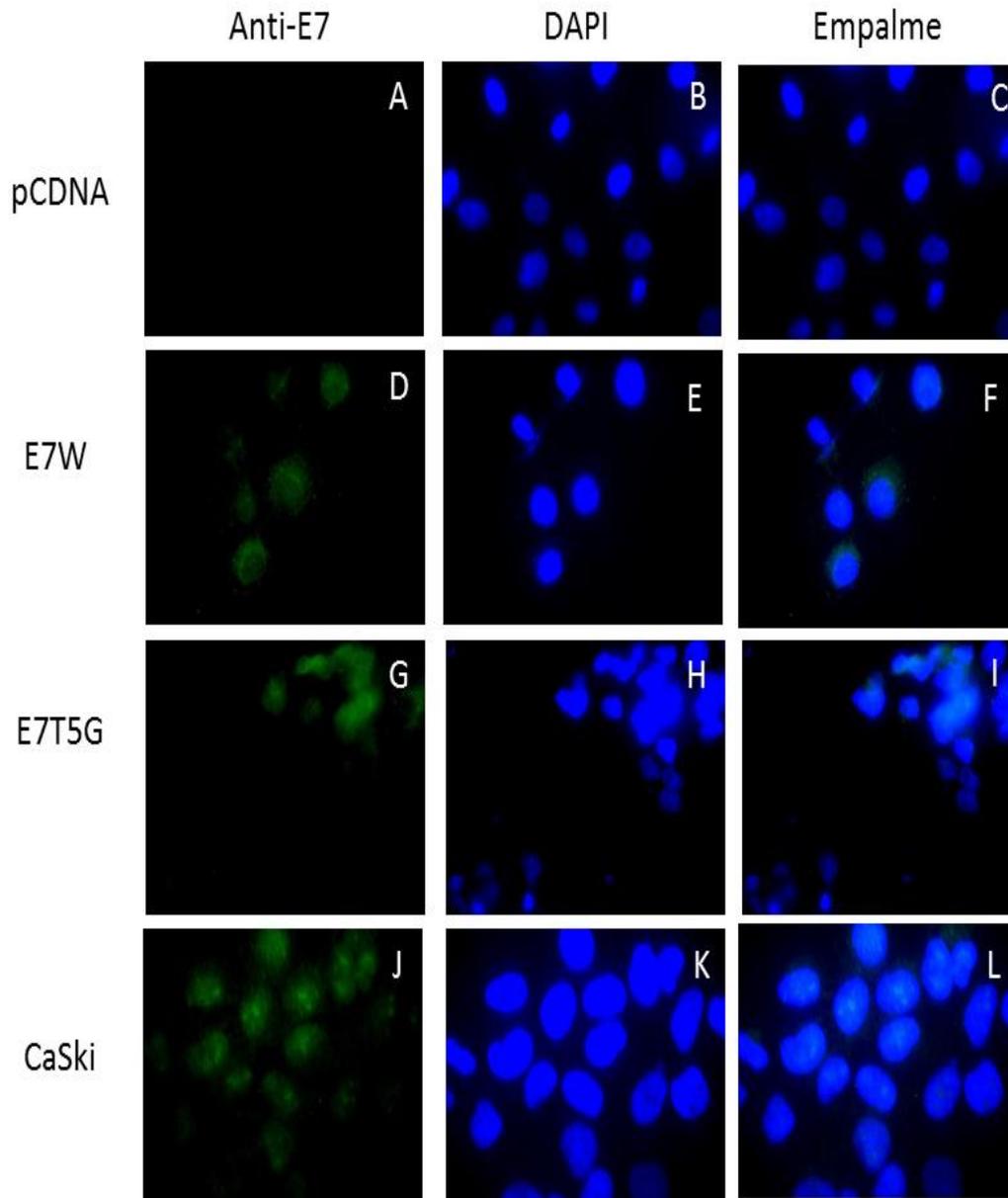
## ***8.6 Localización de las proteínas E7W y E7T5G en diferentes compartimientos celulares.***

Para poder evaluar el efecto de mutar la treonina 5 sobre la localización celular, se llevó a cabo la transfección transitoria de células COS-7 con los plásmidos pcDNA3-E7W y pcDNA3-E7T5G, los cuales fueron amplificados en las células antes de expresar las proteínas de interés, permitiendo una mayor concentración de proteína. Las células COS-7 transfectadas con los genes E7 fueron fijadas después de 16, 24 y 48 h, tratadas para inmunofluorescencia (IF) como se describió en Metodología. En esta primera parte se usó el anticuerpo anti-E7 policlonal C89 que reconoce todas las isoformas de la proteína E7 de HPV16 como se ha reportado previamente (Valdovinos-Torres et al., 2008). Los resultados mostraron que las células crecidas por 16 h post-transfección con E7 tanto silvestre como mutada se observó peri-nuclear y en el núcleo de las células teñidas, lo cual se observa con la degradación del color azul en el empalme hacia una coloración azul-agua (Figura 11).

A las 24 h post-transfección, la proteína E7W se observa todavía a nivel perinuclear y un tanto en núcleo, mientras que E7T5G se observa en núcleo al igual que las células CasKi, lo que se aprecia por la degradación del color azul hacia una coloración azul-agua en el empalme (Figura 12).

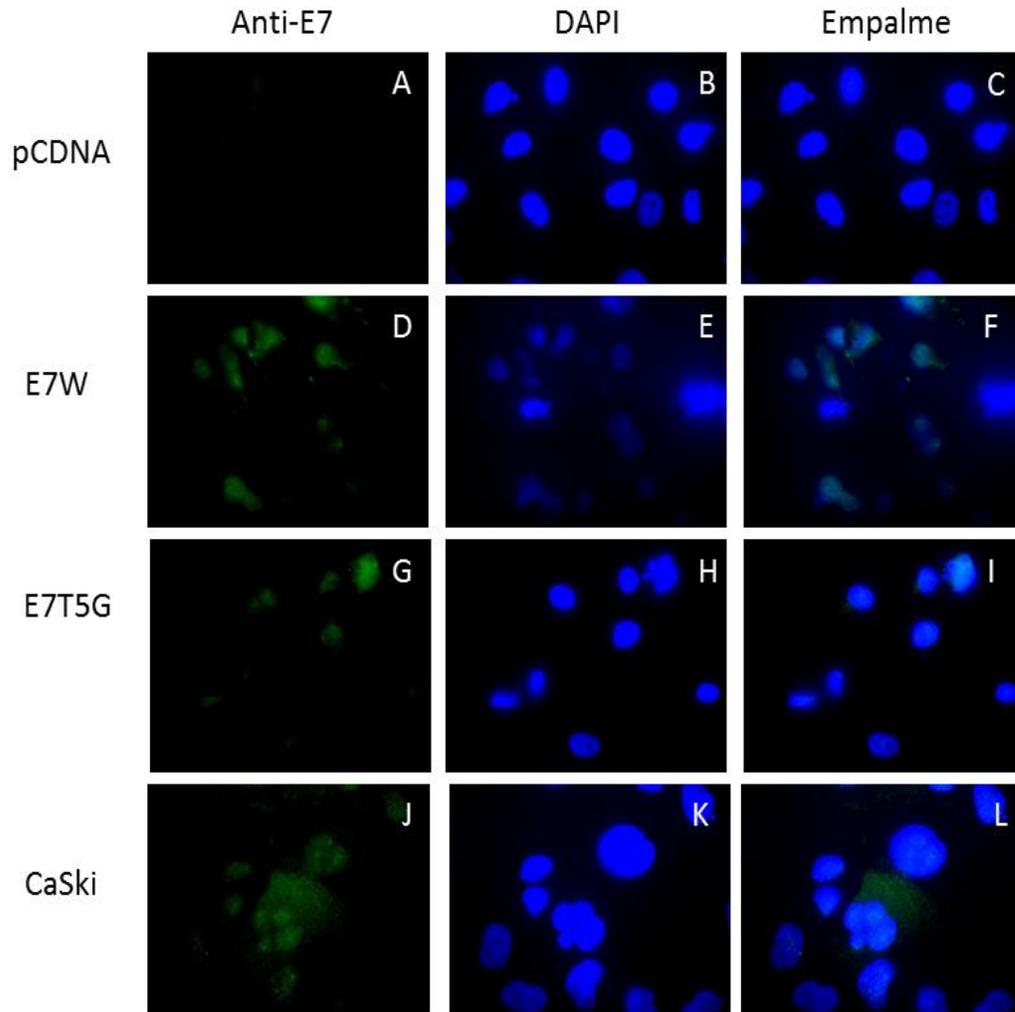


**Figura 11. Localización celular de la proteína E7 de HPV16 en células Cos-7 transfectadas por 16hr con E7W y E7T5G.** Células COS7 transfectadas con plásmido pcDNA3 (A-C), con pcDNA3-E7W (D-F) o con pcDNA3-E7T5G (G-I), y células CasKi (J-L) control positivo, fueron fijadas con para-formaldehído e incubadas con anticuerpo de conejo C89 anti-E7 (dil. 1:100) y con el 2do. anticuerpo de cabra-anti-conejo Alexa 488 (verde) dil. 1:500. DAPI fue utilizado para teñir núcleos y se realizó el empalme para colocalizar a E7 en el núcleo. La colocalización positiva se observa en color verde agua (F, I, L). Las imágenes fueron tomadas a una amplificación de 63X en el microscopio de epifluorescencia.



**Figura 12. Localización celular de la proteína E7 de HPV16 en células Cos7 a 24 h de transfección.** Células COS7 transfectadas con plásmido pcDNA3 (A-C), transfectadas con pcDNA3-E7W (D-F) o transfectadas con pcDNA3-E7T5G (G-I), y como control positivo células CasKi (J-L) fueron fijadas con para-formaldehído e incubadas con anticuerpo de conejo C89 anti-E7 (dil. 1:100) y con el 2do. anticuerpo fluorescente cabra-anti-conejo Alexa 488 (verde) dil. 1:500. DAPI fue utilizado para teñir núcleos (1µl/2.5ml) y se realizó el empalme para colocalizar a E7 en el núcleo (F, I, L). La colocalización positiva se observa en color verde agua. Imágenes fueron tomadas a una amplificación de 63X en el Microscopio de Epifluorescencia.

En las células crecidas a 48h post-transfección, la proteína E7T5G se observó totalmente en núcleo de las células teñidas, lo cual colocalizó con DAPI, mientras que la E7W se observa aún perinuclear y nuclear. La proteína E7 silvestre expresada en células CasKi se observa en núcleo y en citoplasma. (Figura 13).



**Figura 13 Localización celular de la proteína E7 de HPV16 en células Cos7 a 48 h de transfección.** Células COS7 transfectadas con plásmido pcDNA3 (A-C), transfectadas con pcDNA3-E7W (D-F) o transfectadas con pcDNA3-E7T5G (G-I), y como control positivo células CasKi (J-L) fueron fijadas con para-formaldehído e incubadas con anticuerpo de conejo C89 anti-E7 (dil. 1:100) y con el 2do. anticuerpo fluorescente cabra-anti-conejo Alexa 488 (verde) dil. 1:500. DAPI fue utilizado para teñir núcleos (1µl/2.5ml) y se realizó el empalme para colocalizar a E7 en el núcleo (C, F, I, L). La colocalización positiva se observa en color verde agua. Las imágenes fueron tomadas a una amplificación de 63X en el Microscopio de Epifluorescencia.

## 9. DISCUSIÓN.

La proteína E7 de HPV16 es considerada una oncoproteína por su capacidad de transformar células de ratón, esto demostrado en crecimiento en agar suave (Kanda et al., 1988). Posteriormente se demostró la capacidad de unión con pRb, en donde para que se realice dicha interacción E7 debe estar fosforilada (Gage et al., 1990). Además de su capacidad de unión con otras proteínas pertenecientes a la familia de las “pockets proteins” (proteínas que interactúan con factores de transcripción E2F) como p130 y p107 (Gonzalez et al., 2001), E7 es capaz de interactuar con proteínas involucradas en ciclo celular y con factores transcripcionales como E2F, cuya función se realiza en el núcleo de la célula hospedera. De la misma forma, se ha demostrado la localización e interacción de E7 con otras proteínas en el citoplasma, como se resumió en la Tabla 2.

Se ha demostrado que E7 es una proteína fosforilada en Ser 31 y 32 localizadas en la región CR2 de la proteína (Barbosa et al., 1990). También, se ha confirmado la presencia de fosforilación de E7 en la región CR1 en los aminoácidos Thr 5 y 7 (Liang et al., 2008), pero no se ha verificado la importancia de estos sitios de modificación post-traducciona l de manera independiente, así como, tampoco se ha descrito como afectan estos sitios fosforilables de E7 su localización celular. Por lo que, el objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad de transformación y localización de la proteína E7, cuando el aminoácido Thr 5 es mutado por un aminoácido no fosforilable como Gly, lo cual se llevó a cabo por mutagénesis dirigida y posteriormente células HaCat transfectadas establemente o a través de

transfecciones transitorias en células Cos7, en donde se llevó a cabo la caracterización de la proteína mutante.

De esta forma en los ensayos de RT-PCR con los diferentes “pools” de células se consiguió observar el transcrito de E7 expresado en las células HaCat transfectadas con E7W y con E7T5G, lo que demuestra que el plásmido si genera el transcrito requerido aunque en bajas concentraciones en comparación con las células CaSki.

De los estudios realizados a la proteína E7 se han hecho diferentes mutaciones puntuales para medir la capacidad de transformación celular, uno de estos estudios fue modificando dos sitios de fosforilación Ser 31 y 71 donde se demostró que decrece en gran medida la capacidad de transformación de esta proteína (Storey et al., 1990). Ensayos con deleciones tanto en el dominio CR1 o CR2 eliminan la capacidad de inducir hiperplasias epidermales y tumores de piel en ratones (Gulliver et al., 1997). Asimismo, dentro de estos estudios para medir la capacidad de transformación celular generada por E7 se ha demostrado que se requiere la cooperación de E6 y E7 para lograr la desregulación en la diferenciación epitelial, sin embargo, E7 por si sola presenta la capacidad de causar estratificación y amplificación de la lámina basal, esto en tejidos de prepucio al evaluar el crecimiento celular (Choi et al., 2014). En otros ensayos también midiendo la habilidad proliferativa, a través de la formación de colonias en agar en células transfectadas, se observó que células con el vector solo generan colonias pequeñas mientras que las células transfectadas con E7 silvestre presentan la capacidad de formar mayor número de colonias y más grades respecto al vector vacío. Esta misma evaluación con un vector conteniendo E7

mutada en Thr 5 y 7 por Ala, se observó que las células mostraron un comportamiento semejante a E7 silvestre. Sin embargo, en una mutante de E7 de Thr a Asp, las células presentaron mayor número de colonias y más grandes respecto a células que expresaban E7 silvestre (Liang et al., 2008). Este comportamiento es similar a lo que observamos con las células que expresan E7T5G dado que en nuestros resultados se presentó una reducción en el tiempo de duplicación y al comparar el crecimiento en agar de E7T5G, esta presentó 6 veces mayor capacidad de transformación celular con respecto al control y 3 veces más con respecto a E7W, lo que deja claro el incremento en la capacidad transformante de esta proteína mutante.

En cuanto a las características bioquímicas de la proteína se sabe que E7 es una proteína de 98 aminoácidos con un peso molecular calculado de 11 kDa, pero en diferentes reportes se ha observado un corrimiento electroforético de 17 kDa, donde se propone que la carga neta negativa de E7 silvestre es responsable del corrimiento anómalo en geles de poliacrilamida (Armstrong & Roman, 1993).

Estudios respecto al peso molecular de la proteína reportan que el procesamiento de E7 se lleva a cabo en 3 isoformas que presentan diferentes pesos moleculares (E7a1 17.5 kDa, E7a 17 kDa y E7b 16 kDa) (Valdovinos et al., 2008). En nuestros experimentos con marcaje metabólico con <sup>35</sup>S-Met-Cys se observaron pesos moleculares de E7 similares en células CasKi (20.9 kDa) y HaCat-E7W (20.4 kDa), pero relativamente disminuido en HaCat-E7T5G (19.5 kDa). Los PM son más altos que lo reportado y esto pudiera deberse a diferencias en los cálculos aproximados de los pesos moleculares, pero es clara la diferencia que existe entre el PM de la proteína E7T5G y E7W, lo que sugiere la diferencia

en la falta de fosforilación de E7T5G, ya que como se ha demostrado en otros trabajos, la proteína al perder un sitio de fosforilación la capacidad de migración aumenta lo que se refleja en un menor peso respecto a su control.

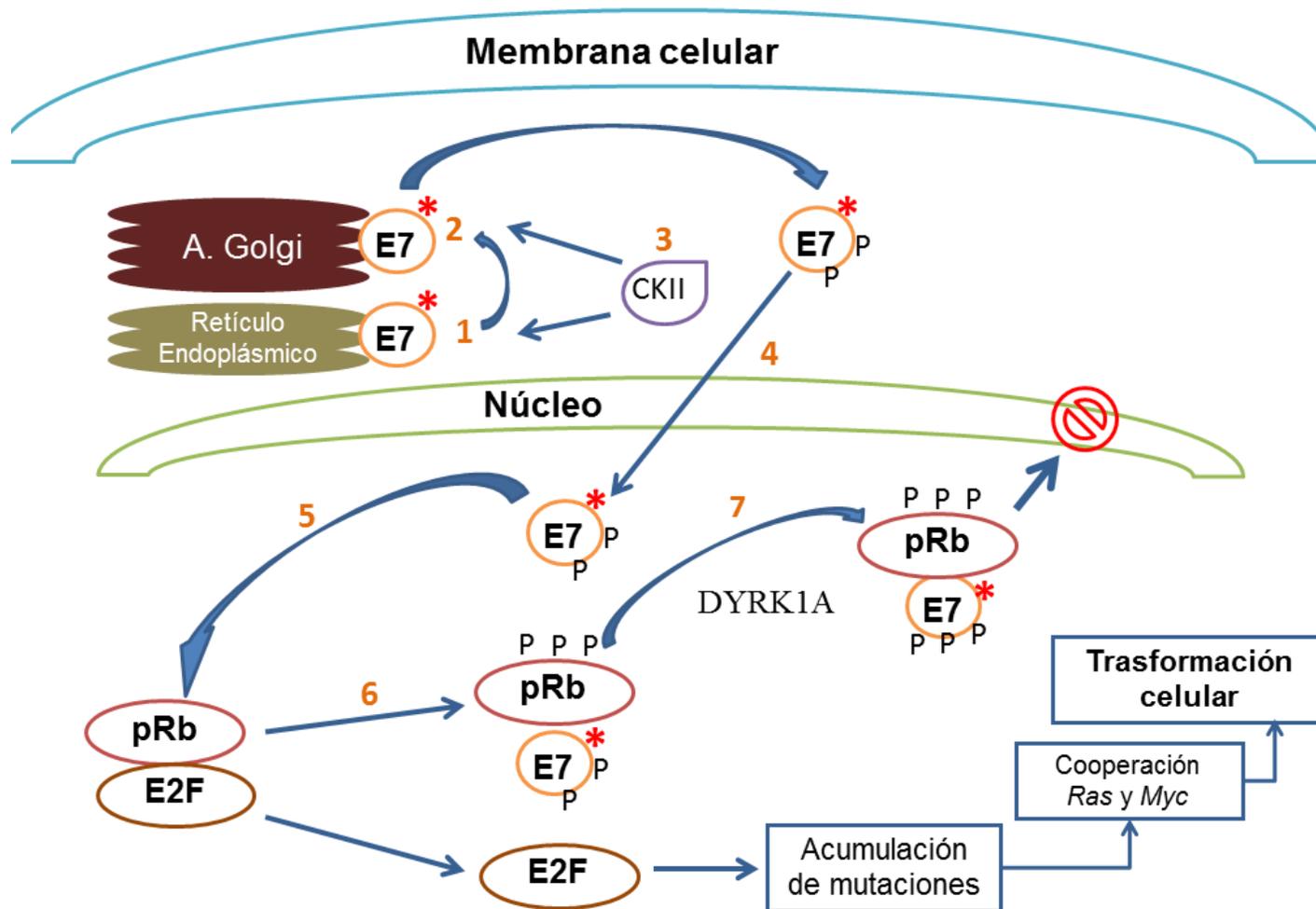
Otro aspecto a estudiar de la proteína E7 ha sido respecto a sus posibles modificaciones post-traduccionales, diferentes a la Ser 31 y 32 (Barbosa et al., 1990), en donde se han reportado sitios adicionales que presenta esta proteína, y que pueden modificar su capacidad de transformación celular (Storey et al.1990). Así mismo, con ensayos de marcaje metabólico donde se observó que existen diferencias en la fosforilación de E7, dependiendo del tiempo de generación de ésta, desde 1 h hasta un máximo de fosforilación de 6 h en este mismo ensayo quedó demostrada la fosforilación en Ser 71 (Massimi & Banks, 2000). Se ha logrado evaluar que otras proteínas tienen la capacidad de fosforilar a la proteína E7 en Thr 5 y 7, midiendo la vida media de la proteína E7 tanto silvestre como mutada en estos aminoácidos, lo que prolonga la vida media de la proteína (Liang et al., 2008). Ensayos previos lograron demostrar que al perder un aminoácido negativo, la proteína E7 modifica su corrimiento electroforético, esto al hacer modificaciones en el aminoácido 4 de la proteína E7 (Armstrong & Roman, 1992). En nuestras condiciones experimentales, se logró identificar que la proteína E7T5G se encuentra fosforilada desde 1 h y hasta 6 h de marcado con fósforo radioactivo, pero durante este período no modifica su PM (19.3 kDa) en ningún momento. Mientras que las células HaCat con E7W presentaron modificaciones en el peso molecular, lo que pudiera sugerir la presencia del sitio extra de fosforilación en E7W, que está ausente en E7T5G pero no pierde su capacidad de ser fosforilada en los otros sitios fosforilables. Previamente se había

propuesto que la región CR1 de E7, es el dominio que confiere la capacidad de modificar la migración electroforética aberrante, debido a modificaciones post-traduccionales (Heck et al., 1992). Otro aspecto de mencionar es que logramos encontrar una proteína E7 en células CasKi con un peso de 18.8 y 18.6 kDa a 1 y 6 h del seguimiento con marcaje de fósforo radioactivo, peso muy similar a otro reporte donde se menciona con un peso de 19 kDa en células CasKi y Cos-1, esto sin marcaje metabólico (Sato et al., 1989).

Finalmente, se sabe que la proteína E7 ha sido reportada en diferentes compartimentos celulares, como es el caso de la localización de E7 tanto en núcleo como en citoplasma en células CasKi en asociación con p600 donde se demostró la asociación de estas dos proteínas (Huh et al., 2005). Otros reportes describen a E7 de alto y bajo riesgo con una localización nuclear, esto a las 24 h de transfección transitoria para la expresión de E7 (Guccione et al., 2002). Previamente, la proteína E7 había sido reportada con localización citoplasmática en células U2OS al reportar que E7 tiene la capacidad de activar la  $\alpha$ -glucosidasa (Zwershke et al., 2000). También se ha demostrado que E7 puede ser localizada en núcleo, ER, Golgi y en citoplasma, esto al probar diferentes anticuerpos monoclonales contra E7 de HPV16 y colocalizando con marcadores celulares (Valdovinos et al., 2008). Además la localización de E7 en núcleo se confirmó al demostrar la asociación de ésta con el factor transcripcional E2F6 en núcleo (McLaughlin et al., 2008). Mientras que se desconoce cómo afectaría la mutación del aminoácido 5 de T→G en E7 en su localización celular. En los ensayos de inmunofluorescencia la proteína E7W se observa de manera perinuclear a las 16 h y no es hasta las 24 h que ésta es translocada al núcleo de las células. Sin

embargo, los resultados de inmunofluorescencia con E7T5G mostraron que esta proteína es traducida y rápidamente translocada a núcleo desde las 16 h que es posible tener suficiente proteína para poder detectarla en el sistema y se mantiene en núcleo hasta por 48 h de manera abundante, lo que sugiere que E7T5G es más estable cuando es mantenida dentro del núcleo.

En conjunto nuestros resultados sugieren que E7T5G es una proteína que a pesar de la mutación, aún puede ser fosforilada en otros sitios, posee un incrementado poder transformante, lo que concuerda con una mayor presencia de esta proteína mutante a nivel nuclear en donde se encuentra interactuando con sus proteínas blancos para modificar el ciclo celular y generar la transformación celular. En este punto no es claro el papel que juega la fosforilación de Thr 5 en la interacción con proteínas blanco, que le permitan permanecer por mayor tiempo en núcleo o que pudieran incrementar la estabilidad de la proteína a nivel nuclear, por lo cual proponemos el siguiente modelo de procesamiento de la proteína E7T5G que se muestra en la figura 14.



**Figura 14. Modelo de procesamiento de la proteína E7 de HPV16 mutada en Thr 5 por Gly.** 1) Síntesis en RE. 2) Transporte a A. Golgi. 3) Fosforilación por CKII. 4) Transporte a núcleo por miembros de Nup. 5) Interacción con pRb. 6) Liberación de E2F. 7) Fosforilación de E7 por DYRK1A. 8) Pérdida de transporte a citoplasma del complejo E7-pRb y acumulación en núcleo, lo que incrementa el grado de transformación.

## 10. CONCLUSIONES

- La mutación en el aminoácido 5 de E7 permite cambios en el peso molecular de E7T5G que es de 19.5 kDa, mientras que para E7W fue de 20.4 kDa al realizar el marcaje metabólico con  $^{35}\text{S}$ .
- La proteína mutante E7T5G tiene la capacidad de ser fosforilada, pero la mutación del aminoácido 5 generó una sola proteína de PM de 19.3 kDa a 1 y 6 h de seguimiento. La proteína E7W se fosforila desde 1 h con un PM de 18.8 kDa, el cual se modifica a 19.1 a las 6 h de realizar el marcaje metabólico con  $^{32}\text{P}$ .
- HaCat E7W y HaCat E7T5G presentaron tiempos de duplicación de 17.4 y 18.2 h, respectivamente, lo cual fue menor que lo observado en las células control HaCat PC y CaSki donde los tiempos fueron de 18.4 y 25.4h
- La localización de E7W en células CasKi y Cos-7 se observa peri-nuclear y nuclear, mientras que para E7T5G la localización es sólo nuclear desde tiempos tempranos (16 h).
- Los resultados de este estudio sugieren que la Thr en la posición 5 de la región CR1 de la proteína E7 de HPV16 tiene la capacidad de ser fosforilada por la cinasa DYRK1A, cuando esta se encuentra en núcleo. Al ser mutado este sitio de fosforilación por Gly, se pierde este sitio de modificación post-traducciona l el cual parece ser una señal para

ubiquitinación. Pérdida del sitio de fosforilación del aminoácido 5 de E7 pudiera evitar la ubiquitinación de la proteína, posiblemente al no exponer el epitope necesario para ser transportada al citoplasma y evitar así su posterior degradación, lo cual se ve reflejado en la acumulación de la proteína E7 en el núcleo de la célula.

## 11. PERSPECTIVAS

- **Realizar ensayos de 2D.** La mutación de Thr 5 debe ser valorada para el punto isoeléctrico ya que se modificaron los PMs tanto para la proteína total como para fosforilada, con respecto de la proteína silvestre.
- **Evaluación del efecto de la fosforilación.** Deberá evaluarse la mutación de Thr 7 de manera independiente, de forma similar a este proyecto y comparar la importancia de cada sitio fosforilable en cuanto al proceso de transformación.

## 12. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

- Este estudio podría verse limitado en que los anticuerpos anti-E7 no reconozcan la proteína E7 mutada en el aminoácido 5, debido a la no exposición de los epitopos correspondientes en caso de los anticuerpos monoclonales. Sin embargo, se cuenta con anticuerpos policlonales de conejo anti-E7 que nos permitieron monitorear el comportamiento de la proteína mutada todo el tiempo y discriminar si la falta de reconocimiento es un problema de los anticuerpos o de estabilidad de la proteína generada por la mutación.

- Otra limitante del estudio es que la proteína E7 mutada para fosforilación sea letal para el crecimiento celular de manera que no se pueda establecer una línea celular. Para resolver este problema se llevaron a cabo transfecciones transitorias, lo que permitió expresar la proteína 16E7-T5G mutante en grandes cantidades a corto plazo y poder realizar algo de la caracterización de la mutante en el sistema celular.
- Una limitante más para este estudio es que los “pools” seleccionados, de la transfección estable, es que se trata de poblaciones heterogéneas lo que se reflejó en la baja expresión tanto de RNA como de proteína generada. Esto se resolvió al realizar la inmunoprecipitación, lo que permitió concentrar la proteína E7 a pesar de la posible baja expresión en las células.

### 13. REFERENCIAS

1. Antinore, M.J., Birrer, M.J., Patel, D., Nader, L. & McCance, D.J. 1996; The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J.*, 15, (8): 1950-1960
2. Armstrong Deborah J. & Roman Ann; 1993; The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues; *Biochemical and biophysical research communications*, 192, (3)
3. Arroyo, M., Bagchi, S., Raychaudhuri, P., 1993; Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2F-cyclin A complex. *Mol. Cell. Biol.* (13): 6537–6546
4. Barbosa Miguel S., Edmonds Caroline, Fisher Christopher, Schiller John T., Lowy Douglas R., Vousden Karen H; 1990; The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and SV40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase 11 phosphorylation; *The EMBO Journal* (9) 1: 153–160
5. Barnard, P. & McMillan, N.A. 1999. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology*. 259, (2): 305-313
6. Bernard Hans-Ulrich, Burk Robert D., Chen Zigui, Doorslaer Koenraad van , Hausen Harald zur , De Villiers Ethel-Michele, 2010, Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments, *Virology* (401): 70–79.
7. Bernat, A., Avvakumov, N., Mymryk, J.S., Banks, L., 2003. Interaction between the HPV E7 oncoprotein and the transcriptional coactivator p300; *Oncogene* (22): 7871–7881
8. Brehm, A., Nielsen, S.J., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J. & Kouzarides, T.; 1999; The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.*, 18, (9): 2449-2458
9. Brokaw Jane L., Yef Carole L., Münger Karl, 1994, A mutational analysis of the amino terminal domain of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein, *Virology* (205): 603-607
10. Burk Robert D., Chen Zigui, Doorslaer Koenraad Van; 2009, Human Papillomaviruses: *Genetic Basis of Carcinogenicity, Public Health Genomics*; (12): 281–290
11. Cheng, Y.W., Lee, H., Shiau, M.Y., Wu, T.C., Huang, T.T. & Chang, Y.H.; 2008; Human papillomavirus type 16/18 upregulates the expression of interleukin-6 and antiapoptotic Mcl-1 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 4, (15): 4705–4712
12. Choi Moonju, Lee Sungjin, Choi Taekyu, Lee Choongho; 2014; Roles of the PDZ domain-binding motif of the human papillomavirus type 16 E7 on the immortalization

- and differentiation of primary human foreskin keratinocytes; *Virus Genes* (48): 224-232
13. Demers, G.W., Espling, E., Harry, J.B., Etscheid, B.G., Galloway, D.A., 1996. Abrogation of growth arrest signals by human papillomavirus type 16 E7 is mediated by sequences required for transformation; *J. Virol.* (70): 6862–6869
  14. Doorbar John, 2006, Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer, *Clinical Science* (110): 525–541
  15. Doorbar John, 2013, The E4 protein; structure, function and patterns of expression, *Virology* (445): 80–98
  16. Doorbar John, Quint Wim, Banks Lawrence, Bravo Ignacio G., Stoler Mark, Broker Tom R., Stanley Margaret A., 2012, The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses, *Vaccine* (30S): F55–F70
  17. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN; 2012, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; Available from: <http://globocan.iarc.fr>
  18. Firzlauff, J.M., Luscher, B., Eisenman, R.N., 1991; Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (88): 5187–5191
  19. Gage Julia R., Meyers Craig, Wettstein, 1990; The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties; *Journal of Virology*: 723-730
  20. Ganguly Niladri, Parihar Suraj P., 2009, Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis; *J. Biosci.* 34 (1): 113–123
  21. Giarre, M., Caldeira, S., Malanchi, I., Ciccolini, F., Leao, M.J., Tommasino, M., 2001. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle arrest. *J. Virol.* (75): 4705–4712
  22. González Martín A., 2007, Molecular biology of cervical cancer, *Clin Transl Oncol* (9): 347-354
  23. Gonzalez Sonia L., Stremlau Matt, He Xi, Basile John R., Münger Karl; 2001; Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7; *Journal of Virology*: 7583 – 7591
  24. Gottschling Marc, Göker Markus, Köhler Anja, Lehmann Mandy D., Stockfleth Eggert, Nind Ingo, 2009, Cutaneotropic Human b-/c-Papillomaviruses Are Rarely Shared between Family Members, *Journal of Investigative Dermatology* (129): 2427–2434

25. Guccione Ernesto, Massimi Paola, Bernat Agnieszka, Banks Lawrence, 2002, comparative Analysis of the Intracellular Location of the High-and Low-Risk Human Papillomavirus Oncoproteins, *Virology* (293): 20–25
26. Gulliver Gene A., Herber Renee L., Liem Amy, Lambert Paul F., 1997, Both Conserved Region 1 (CR1) and CR2 of the Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncogene Are Required for Induction of Epidermal Hyperplasia and Tumor Formation in Transgenic Mice, *Journal of virology*: 5905-5914
27. Heck Donald V., Yee Carole L., Howley Peter M., Münger Karl; 1992; Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses, *Biochemistry* (89): 4442-4446
28. Helt, A.M., Galloway, D.A., 2001. Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. *J. Virol* (75): 6737–6747
29. Huh Kyung-Won, DeMasi Joseph, Ogawa Hidesato, Nakatani Yoshihiro, Howley Peter M., Münger Karl; 2005; Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600; *PNAS*, 102, (32): 11492-11497
30. Huh Warner K., 2009, Human Papillomavirus Infection a Concise Review of Natural History, *Obstetrics & gynecology*, 114, (1): 139-143
31. Ishii Y, Nakahara T, Kataoka M, Kusumoto-Matsuo R, Mori S.; 2013; Identification of TRAPPC8 as a Host Factor Required for Human Papillomavirus Cell Entry; *PLoS ONE* 8 (11): e80297. doi:10.1371/journal.pone.0080297
32. Juárez-Figueroa LA, Wheeler CM, Uribe-Salas FJ, Conde-González CJ, Zamilpa-Mejía LG, García-Cisneros S. 2001; Human Papillomavirus, a highly prevalent sexually transmitted disease among female sex workers from Mexico City. *Sex Transm Dis*; (28): 125-130
33. Kanda Tadahito, Furuno Akemi, Yoshiike Kunito, 1988, Human Papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells, *Journal of virology*: 610-613
34. Lazcano-Ponce Eduardo, Herrero Rolando, Muñoz Nubia, Cruz Aurelio, V. Shah Keerti, Alonso Patricia, Hernandez Pilar, Salmeron Jorge, Hernandez Mauricio; 2001; Epidemiology of HPV infection among Mexican women with Normal cervical cytology; *Int. J. Cancer*: (91): 412–420
35. Lee Sung-Jong, Lee Ah-Won, Kang Chang-Suk, Park Jong-Sup, Park Dong-Choon, Lee Keun-Ho, Yoon Joo-Hee, Hur Soo-Young, Kim Tae-Jung, 2014, Clinico-pathological Implications of Human Papilloma Virus (HPV) L1 Capsid Protein Immunoreactivity in HPV16-Positive Cervical Cytology, *Int. J. Med. Sci*; 11
36. Lee, D., Lim, C., Seo, T., Kwon, H., Min, H. & Choe, J., 2002; The viral oncogene human papillomavirus E7 deregulates transcriptional silencing by Brm-related gene 1 via molecular interactions. *J Biol Chem*. 277, (50): 48842-48848

37. Lee, D.K., Kim, B.C., Kim, I.Y., Cho, E.A., Satterwhite, D.J. & Kim, S.J. 2002; The human papilloma virus E7 oncoprotein inhibits transforming growth factor-beta signaling by blocking binding of the Smad complex to its target sequence. *J Biol Chem.* 277, (41): 38557-38564
38. Liang YJ, Chang HS, Wang CY, Yu WC. 2008; DYRK1A stabilizes HPV16E7 oncoprotein through phosphorylation of the threonine 5 and threonine 7 residues. *Int J Biochem Cell Biol*; 40 (11): 2431-2441
39. Liu Xin, Clements Adrienne, Zhao Kehao, Marmorstein Ronen, 2006; Structure of the Human *Papillomavirus* E7 Oncoprotein and Its Mechanism for Inactivation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor, *The journal of biological chemistry*, 281 (1): 578–586
40. Lizano-Soberón Marcela, Carrillo-García Adela, Contreras-Paredes Adriana, 2009; Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis, *Cancerología* (4): 205-216
41. Longworth Michelle S., Laimins Laimonis A., 2004, Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia, *Microbiology and molecular biology reviews*: 362–372
42. López Saavedra Alejandro, Lizano Soberón Marcela, 2006, Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina, *Cancerología* (1): 31- 55
43. Lüscher-Firzlaff, J.M., Westendorf, J.M., Zwicker, J., Burkhardt, H., Henriksson, M., Müller, R., Pirollet, F. & Lüscher, B. 1999; Interaction of the fork head domain transcription factor MPP2 with the human papilloma virus 16 E7 protein: enhancement of transformation and transactivation. *Oncogene.* 18, (41): 5620-5630
44. Massimi, P. & Banks, L., 2000; Differential phosphorylation of the HPV-16 E7 oncoprotein during the cell cycle. *Virology* (276): 388–394.
45. Matlashewski G, Schneider J, Banks L, Jones N, Murray A, Crawford L. 1987; Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *EMBO J* (6): 1741- 1746
46. McLaughlin-Drubin, M.E., Huh, K.W., Munger, K., 2008; Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6; *J. Virol* (82): 8695–8705
47. Mileo, A.M., Abbruzzese, C., Mattarocci, S., Bellacchio, E., Pisano, P., Federico, A., Maresca, V., Picardo, M., Giorgi, A., Maras, B., Schinina, M.E., Paggi, M.G., 2009; Human papillomavirus-16 E7 interacts with glutathione S-transferase P1 and enhances its role in cell survival; *PLoS One* (4), e7254
48. Mileo, A.M., Piombino, E., Severino, A., Tritarelli, A., Paggi, M.G. & Lombardi, D., 2006, Multiple interference of the human papillomavirus-16 E7 oncoprotein with the functional role of the metastasis suppressor Nm23-H1 protein. *J Bioenerg Biomembr.* 38, (3-4): 215-225
49. Pedroza-Saavedra Adolfo, Plett-Torres Tanya, Chihu-Amparán Lilia, Maldonado-Gama Minerva, González-Jaimes Ana M., Esquivel-Guadarrama Fernandp, Gutiérrez-Xicotencatl Lourdes; 2012; Cap libro 10 Molecular Bases of Human Papillomavirus

Pathogenesis in the development of cervical cancer, Libro Human Papillomavirus and Related diseases From Bench to bedside-Research Aspects edited by Davy Vanden Broeck; p.249- 290

50. Phelps WC, Yee CL, Münger K, Howley PM. 1988; The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A; *Cell*; (53): 539-547
51. Rautava Jaana, Syrjanen Stina, 2012, Biology of Human Papillomavirus Infections in Head and Neck Carcinogenesis, *Head and Neck Pathol* (6): S3–S15
52. Sam Soto Selene, Ortiz de la Peña y Carranza Alejandro, Lira Plascencia Josefina, 2011, Virus del papiloma humano y adolescencia, *Ginecol Obstet*, 79 (4): 214-224.
53. Sato Hironori, Watanabe Sumie, Furuno Akemi, Yoshike Kunito; 1989; Human papillomavirus type 16 E7 protein expressed un *Escherichia coli* and Monkey COS-1 cells: Immunofluorescence detection of nuclear E7 protein, *Virology* (170): 311-315
54. Stanley Margaret A; 2012, Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus, *Clinical Microbiology*: 215–222
55. Storey A, Almond N, Osborn K & Crawford L. 1990; Mutations of the human papillomavirus type 16 E7 gene that affect transformation, transactivation and phosphorylation by E7 protein; *Journal of General Virology* (71): 965-970
56. Todorovic, B., Hung, K., Massimi, P., Avvakumov, N., Dick, F.A., Shaw, G.S., Banks, L., Mymryk, J.S., 2012; Conserved region 3 of human papillomavirus 16 E7 contributes to deregulation of the retinoblastoma tumor suppressor; *J. Virol.* (86): 13313 –13323
57. Valdovinos-Torres H., Orozco-Morales M., Pedroza-Saavedra A., Padilla-Noriega L., Esquivel-Guadarrama F., Gutierrez-Xicotencatl L., 2008, Different Isoforms of HPV-16 E7 Protein are Present in Cytoplasm and Nucleus, *The Open Virology Journal* (2): 15-23
58. Wang Li, Dai Shu-Zhen, Chu Hui-Jun, Cui Hong-Fei, Xu Xiao-Yan, 2013, Integration Sites and Genotype Distributions of Human Papillomavirus in Cervical Intraepithelial Neoplasia, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* (14)
59. Watanabe S, Kanda T, Sato H, Furuno A, Yoshike K. 1990; Mutational Analysis of Human Papillomavirus Type 16 E7 Functions; *J Virol* 64 (1): 207-214
60. Zur Hausen H.; 1977; Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas; *Curr Top Microbiol Immunol* (78): 1–30
61. Zwerschke, W., Mannhardt, B., Massimi, P., Nauenburg, S., Pim, D., Nickel, W., Banks, L., Reuser, A.J., Jansen-Durr, P., 2000; Allosteric activation of acid phosphatase by the human papillomavirus E7 protein; *J. Biol. Chem* (275): 9534–9541