



**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO FACULTAD DE  
CIENCIAS QUÍMICAS**



**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

**“Obtención de la proteína rE1 y ensayos de interacción del complejo de inicio  
de la replicación del VPH16”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y  
CELULAR**

**PRESENTA**

**Q.F.B. BIANCA NAYELI CAMPOS PARGA**



**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO FACULTAD DE  
CIENCIAS QUÍMICAS**



**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

**“Obtención de la proteína rE1 y ensayos de interacción del complejo de inicio  
de la replicación del VPH16”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y  
CELULAR**

**PRESENTA**

**Q.F.B. BIANCA NAYELI CAMPOS PARGA**

Durango, Dgo.

Noviembre 2017



**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**



**“Obtención de la proteína rE1 y ensayos de interacción del complejo de inicio de la replicación del VPH16”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

**PRESENTA**

**Q.F.B. BIANCA NAYELI CAMPOS PARGA**

**APROBADA POR EL DIRECTOR DE TESIS**

**DC. MARÍA LETICIA SAUCEDO MENDIOLA**



**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**



**“Obtención de la proteína rE1 y ensayos de interacción del complejo de inicio de la replicación del VPH16”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

**PRESENTA**

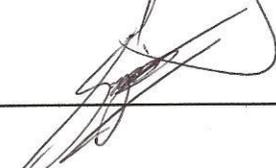
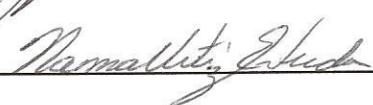
**Q.F.B. BIANCA NAYELI CAMPOS PARGA**

**APROBADA POR EL COMITÉ DE TESIS**

**DC. MARIA LETICIA SAUCEDO MENDIOLA**  
**PRESIDENTE**

**DC. GERARDO ALFONSO ANGUIANO VEGA**  
**SECRETARIO**

**DC. NORMA URTIZ ESTRADA**  
**VOCAL**

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

## DEDICATORIA

A Dios

Por permitirme superar los momentos difíciles que me han hecho valorar los buenos momentos de mi vida.

A mis padres Rosa y Esteban

Por estar siempre presentes y darme su apoyo incondicional, por sus consejos y valores que me han ayudado a ser la persona que soy ahora.

A mi hermano Abraham

Que siempre ha estado junto a mí a pesar de nuestras diferencias de opiniones.

Y a mis familiares y amigos que estuvieron conmigo y me apoyaron durante esta etapa.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer especialmente a mis padres, a mi mamá que siempre me ha ayudado cuando lo necesito y que ha tenido una palabra de motivación para mí, a mi papá que siempre se ha preocupado y estado pendiente de mis estudios. A mi hermano por estar a mi lado siempre que lo he necesitado.

A la DC Ma. Leticia Saucedo Mendiola y al DC Gerardo Alfonso Anguiano Vega, mis directores de tesis, por su guía y asesoramiento durante la elaboración de este proyecto.

A Rosa mi amiga de muchos años con la cual he compartido toda mi experiencia académica profesional y por supuesto la maestría no fue la excepción. A mis amigas Fátima y Yazmín que siempre me apoyaron para poder terminar con éxito la tesis.

A Diana, Paty, Marlenne y Alonso mis amigos compañeros de maestría, por lo que hemos pasado juntos para terminar una etapa más.

Gracias a todos los doctores y maestros que compartieron sus ideas y recomendaciones respecto a esta investigación.

Agradezco sinceramente a aquellas personas que me ayudaron con la conclusión de esta tesis.

## ABREVIATURAS

3D	Tridimensional
A	Adenina
ATP	Adenosín trifosfato
C-terminal	Carboxilo terminal
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CaCu	Cáncer cérvico uterino
D.O	Densidad óptica
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
E	Early
EDTA	Ácido etilendianotetraacético
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
EtOH	Etanol
F	Oligonucleótido directo
GC%	Contenido guanina y citosina en porcentaje
GST	Glutati3n S-transferasa
Hrs	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
ICO	Institut Català d'Oncologia
IMAC	Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
L	Late
LB	Luria Bertani
LCR	Región larga de control
M	Molaridad
MBP	Proteína de unión a maltosa
min	Minutos
mg	Miligramo
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N/A	No aplica
N-terminal	Amino terminal
NaCl	Cloruro de sodio
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
Ng	Nanogramo

PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PaVE	Papillomavirus Episteme (página de internet)
Pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Promotor temprano
PL	Promotor tardío
PV	Papilomavirus
r	Proteína recombinante
R	Oligonucleótido reverso
RFC	Factor de replicación C
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Segundos
SDS	Dodecilsulfato sódico
T	Timina
TAD	Dominio de transactivación
TB	Tris, Borato
TBE	Tris, Borato, EDTA
Tm	Temperatura de fusión
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VPH	Virus del papiloma humano
V	Voltios
X	Veces
x g	Fuerza centrífuga relativa
µL	Microlitro
%	Porcentaje
°C	Grado centígrado

# INDICE

DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
ABREVIATURAS.....	viii
ÍNDICE .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
RESUMEN .....	xiv
ABSTRACT.....	xv
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Virus del papiloma humano .....	2
1.1.1 Taxonomía .....	2
1.1.2 Genoma viral .....	4
1.1.2.1 Gen E1 y su producto de expresión .....	5
1.2 Infección por VPH .....	5
1.2.1 Replicación viral .....	7
1.2.2 Cáncer cervicouterino .....	8
1.3 Tratamiento .....	9
1.4 Vacunas .....	10
II. ANTECEDENTES .....	11
III. JUSTIFICACIÓN .....	13
IV. OBJETIVOS.....	14
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo .....	15
5.2 Amplificación de la LCR por PCR punto final .....	15
5.2.1 Diseño de oligonucleótidos para la LCR .....	15
5.2.2 PCR punto final para la amplificación de la LCR del VPH16 .....	17
5.2.3 Purificación .....	18
5.3 Amplificación de la E1 por PCR punto final .....	19
5.3.1 Diseño de oligonucleótidos para el gen E1 .....	19
5.3.2 Amplificación del gen E1 por PCR punto final .....	19
5.3.3 Purificación .....	21
5.4 Clonación del gen E1 en vector pCR-Blunt II-TOPO .....	22
5.4.1 Ligación del gen E1 y el vector de clonación pCR-Blunt II-TOPO .....	22
5.4.2 Preparación de células competentes y transformación en <i>E.coli DH5α</i> .....	22
5.4.2.1 Extracción del ADN plasmídico .....	23
5.4.2.2 Digestión del ADN plasmídico.....	24
5.4.3 Secuenciación del plásmido TOPO-E1 .....	24
5.5 Subclonación del gen E1 en vector de expresión pET-28a(+) .....	25
5.5.1 Digestión y purificación del vector pET-28a(+) .....	25

5.5.2 Digestión y purificación del fragmento E1 .....	25
5.5.3 Ligación del fragmento E1 y el vector pET-28a .....	26
5.5.4 Preparación de células competentes y transformación en <i>E.coli DH5α</i> .....	27
5.5.4.1 Extracción de ADN plasmídico y digestión <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III .....	28
5.5.5 Preparación de células competentes y transformación en <i>E.coli BLR</i> .....	28
5.5.5.1 Extracción de ADN plasmídico y digestión con <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III .....	29
5.6 Obtención de la proteína rE1 purificada .....	30
5.6.1 Expresión del gen E1 y extracción de las proteínas .....	30
5.6.2 Purificación de la proteína rE1 del VPH16 .....	31
5.7 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) de las interacciones E1-LCR y E1-E2-LCR .....	32
VI. RESULTADOS.....	33
6.1 Amplificación de la LCR por PCR punto final .....	33
6.2 Amplificación del gen E1 por PCR punto final .....	33
6.3 Plásmido TOPO-E1 y digestión con <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III .....	34
6.4 Purificación del producto de digestión del plásmido TOPO-E1 .....	34
6.5 Secuencia del plásmido TOPO-E1 .....	36
6.6 Linealización del plásmido pET-28a(+) .....	37
6.7 Plásmido pET-28a(+)/E1 y digestión con <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III .....	38
6.8 Análisis de los extractos de proteínas después de la inducción con IPTG .....	39
6.9 Purificación de la proteína rE1 por cromatografía de afinidad .....	39
6.10 Ensayos por cambio en la movilidad electroforética (EMSA) de LCR y la proteína rE1 en ausencia y presencia de la proteína rE2 .....	41
VII. DISCUSIÓN .....	43
VIII. CONCLUSIÓN .....	47
IX. PERSPECTIVAS .....	48
IX. REFERENCIAS .....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Páginas</b>
<b>1</b>	Cápside del VPH16	3
<b>2</b>	Genoma del VPH16	4
<b>3</b>	Dominios funcionales de la proteína E1	6
<b>4</b>	Ciclo de vida del VPH	7
<b>5</b>	Replicación del ADN viral	8
<b>6</b>	Secuencia del LCR del VPH16	16
<b>7</b>	Marco de lectura abierto del gen E1 del VPH16	20
<b>8</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del amplicón LCR	33
<b>9</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del amplicón E1	34
<b>10</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del plásmido TOPO-E1 y digestión con <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III	35
<b>11</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la purificación de E1	35
<b>12</b>	Alineamiento de la secuencia del gen E1 ligado en el vector pCR–Blunt II-TOPO y la secuencia reportada en PaVE	36
<b>13</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del plásmido pET-28a y digestión con <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III	38
<b>14</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del plásmido pET-28a/E1 y digestión con <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III	39
<b>15</b>	Análisis de los extractos celulares inducidos con IPTG en SDS-PAGE al 10%	40
<b>16</b>	SDS-PAGE al 10% de las fracciones de rE1 obtenidas en la purificación por cromatografía de afinidad	41
<b>17</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ensayo de interacción de E1-LCR y E1-E2-LCR por EMSA	42

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Páginas	
1	Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la LCR	16
2	Condiciones de los componentes de la reacción de PCR para la LCR	17
3	Condiciones de PCR para LCR	17
4	Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen E1	19
5	Condiciones de los componentes de la reacción de PCR para E1	21
6	Condiciones de PCR para E1	21
7	Reacción de ligación TOPO-E1	22
8	Transformación de cepa <i>E.coli DH5α</i> con TOPO-E1	23
9	Choque térmico de células competentes de <i>E.coli DH5α</i>	23
10	Condiciones de la restricción de TOPO-E1	24
11	Condiciones de la restricción del plásmido pET-28a(+)	25
12	Digestión de TOPO-E1 con <i>HindIII</i>	26
13	Digestión de TOPO-E1 con <i>BamHI</i>	26
14	Reacción de ligación de pET-28a(+)/E1	27
15	Transformación de <i>E.coli DH5α</i> con pET-28a(+)/E1	27
16	Choque térmico de células competentes de <i>E.coli DH5α</i>	28
17	Condiciones de restricción del plásmido pET-28a(+)/E1	28
18	Transformación de <i>E.coli BLR</i> con pET-28a(+)/E1	29
19	Condiciones de restricción del plásmido pET-28a(+)/E1	29
20	Condiciones de inducción de la expresión de la proteína rE1 en <i>E.coli BLR</i>	30
21	Reacción del ensayo de interacción E1-LCR	32
22	Reacción del ensayo de interacción E1-E2-LCR	32

## RESUMEN

**Introducción:** El virus del papiloma humano (VPH) es un virus relativamente pequeño compuesto por una molécula de doble cadena de ADN circular de aproximadamente 8,000 pares de bases, que contiene generalmente de ocho marcos de lectura abierto, divididos en tres regiones: la región larga de control (LCR), una región temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), y la región tardía (L1 y L2). La proteína E1 es una helicasa hexamérica dependiente de ATP, que participa en la replicación del ADN viral. La interacción entre E1 y E2 es un componente esencial de la capacidad de E1 para estimular la replicación del ADN viral y la infección causada por el virus del papiloma humano (VPH) ha sido reconocido como el principal factor etiológico para el desarrollo del cáncer cervicouterino (CaCu), el cual a nivel mundial es uno de los tipos de cáncer más comunes en mujeres ocupando el segundo lugar con un estimado de 265,000 muertes y 527,000 casos nuevos al año. El objetivo de este trabajo fue obtener la proteína rE1 del VPH16 y realizar ensayos de interacción de las proteínas virales E1-E2 y LCR *in vitro*.

**Material y Métodos:** El gen E1 del VPH16 fue amplificado por PCR punto final y clonado con el vector pCR-Blunt II-TOPO y transformados en el fondo genético de *E.coli DH5α*, después el gen E1 fue digerido, purificado y subclonado con el vector pET-28a(+) en el fondo genético de *E.coli BLR*, la expresión del gen se indujo con IPTG 0.5 mM por 10 horas a 37°C/200rpm y la proteína rE1 de 71kDa fue purificada usando cromatografía de afinidad. Se realizaron los ensayos de interacción por cambio en la movilidad electroforética (EMSA) entre las proteínas virales E1, E2 y la LCR del VPH16.

**Resultados:** El análisis en SDS-PAGE al 10% de la purificación de proteínas mostró una banda en cada fracción correspondiente a 71kDa de peso molecular y los ensayos EMSA mostraron una banda con retardo en comparación al control.

**Conclusión:** Se obtuvo la proteína rE1 purificada y los ensayos EMSA mostraron la interacción del complejo E1-E2-LCR.

## ABSTRACT

**Introduction:** The human papillomavirus (HPV) is a relatively small virus with a single molecule of circular double-stranded DNA genome of approximately 8,000 base pairs, which contains eight open reading frames (ORF) divided into three regions: the long control region (LCR), an early region (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) and the late region (L1 y L2). E1 protein is an ATP-dependent hexameric helicase, who participates in the viral DNA replication. The interaction between E1 and E2 is an essential element of E1 capacity to stimulate the viral DNA replication and the infection with human papillomavirus is the major etiological factor of the development of cervical cancer (CaCu), which worldwide is one of the most common cancer on women, holding second place with 265,000 deaths and 527,000 new cases a year. This research work objective was to get the rE1 protein of HPV16 and to perform interaction assays of E1-E2 viral proteins and LCR *in vitro*.

**Material and Methods:** the E1 gene of HPV16 was amplified by Endpoint PCR and cloned into pCR-Blunt II-TOPO vector and transformed into the *E.coli* DH5 $\alpha$  strain, later the insert was digested, purified and subcloned into pET-28a(+) expression vector and transformed into the *E.coli* BLR strain for gene expression, it was induced with IPTG 0.5 mM for 10 hours at 37°C/200 rpm and the rE1 protein of 71kDa was purified using affinity chromatography. Interaction assays between E1-E2 viral proteins and LCR were carried out by electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

**Results:** SDS-PAGE 10% protein purification analysis showed a band on each fraction of 71kDa of molecular weight and the EMSA showed a delayed band in comparison to the probe.

**Conclusion:** Purified rE1 protein was obtained and the EMSA assays showed the E1-E2-LCR complex interaction.

# I. INTRODUCCIÓN

La infección causada por el virus del papiloma humano (VPH) está reconocida como el principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer cérvicouterino (CaCu) y como factor relevante para el desarrollo de otros tipos de cáncer en el área anogenital entre los cuales están el cáncer de ovario, colon y ano (López, 2016; Bernard, 2010; Zaldivar, 2012).

Los papilomavirus humanos pertenecientes a la familia Papillomaviridae son clasificados en 92 tipos diferentes y aproximadamente 35 son los que infectan la mucosa anogenital, estos tipos de VPH son divididos como de bajo y alto riesgo dependiendo de su capacidad de causar lesiones benignas no oncogénicas o lesiones malignas u oncogénicas respectivamente (Lizano 2009a; Zaldivar, 2012; Van Doorslaer, 2013). De acuerdo al reporte del ICO information centre on HPV and cancer en el 2017 los tipos 16 y 18 de VPH son responsables de alrededor del 70% de los casos de cáncer cérvicouterino del mundo.

El cáncer cérvicouterino se encuentra entre los tipos de cáncer más comunes en mujeres a nivel mundial, con 527,000 diagnósticos y 265,000 muertes al año, el CaCu ocupa el segundo lugar en mujeres de entre 15 a 44 años (ICO HPV Information Center, 2017). En México el INEGI reportó 4,009 muertes por CaCu en mujeres en el 2015 ocupando el segundo lugar como causa de muerte femenina (INEGI, 2015).

Aunque hay vacunas contra los tipos de VPH más comunes, estas no funcionan en mujeres que ya están infectadas con el VPH y actualmente no hay tratamientos antivirales para la infección por VPH. Para el desarrollo de un antiviral es necesario conocer a detalle el ciclo de vida viral para así comprender como se desarrolla la enfermedad y su transmisión (Carrillo, 2012; Lehoux, 2012).

El VPH está compuesto por un genoma de ADN dividido en tres regiones, entre ellas, la región temprana consiste en seis marcos de lectura abierto (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), los que codifican para proteínas no estructurales implicadas en la replicación y oncogénesis (Beltrán, 2014).

E1 es una proteína helicasa hexamérica dependiente de ATP, que participa en la replicación del ADN viral. La interacción entre E1 y E2 es un componente esencial de la capacidad de E1 para estimular la replicación (Kasukawa et al, 1998; Beltrán, 2014).

La interacción de ambas proteínas es un importante blanco terapéutico para el posible desarrollo de un antiviral en el tratamiento de la infección por VPH. Por lo anterior, en este estudio se realizó la obtención de la proteína recombinante E1 y los ensayos de interacción de las proteínas virales E1 y E2 con la LCR mediante la técnica de cambio en la de movilidad electroforética (electrophoretic mobility shift assay EMSA).

## **1.1 Virus del papiloma humano**

Los papilomavirus humanos son un grupo de virus pequeños de 52 a 55nm de diámetro con un genoma de ADN de doble cadena, no cuentan con envoltura si no con una cápside proteica icosaédrica con 72 capsómeros pentaméricos (Figura 1) (Lizano, 2009a; Zaldivar, 2012).

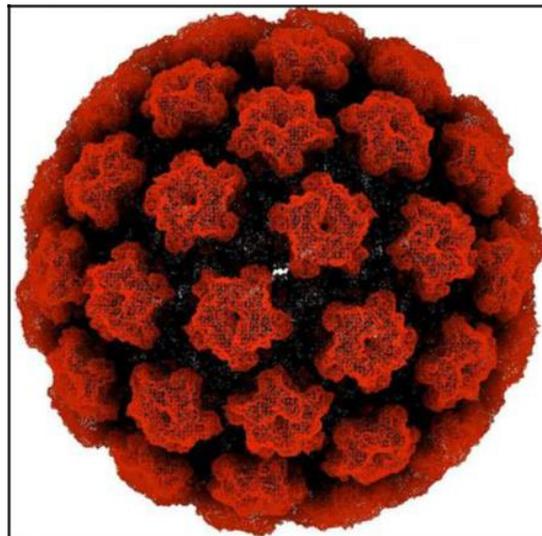
### **1.1.1 Taxonomía**

Los papilomavirus (PV), de acuerdo con el octavo reporte realizado por el Comité Internacional de Taxonomía Viral, pertenecen a la Familia *Papillomaviridae*, dentro de esta Familia los papilomavirus fueron clasificados en 92 tipos humanos y 24 tipos animales. Además, fueron asignados en géneros y especies donde la variación para su clasificación recae en la secuencia nucleotídica del gen L1 de los PV. El nombre de la especie consiste en una letra griega combinada con un número y corresponde a un

tipo de papilomavirus. Los virus del papiloma humano son miembros de cinco géneros (Alfa, Beta, Gamma, Mu y Nu-PVs) (Bernard, 2010; Doorslaer, 2013).

Los alfa papilomavirus se dividen en tipos cutáneos y tipos mucosos y estos últimos que son alrededor de 35 tipos de VPH se encuentran en lesiones benignas y malignas de tracto anogenital tanto de hombres como de mujeres y estos a su vez se dividen en los de alto riesgo y de bajo riesgo según su potencial de malignidad. Se consideran carcinogénicos o de alto riesgo a los tipos VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67, 68, 73, 82; probables carcinogénicos a los tipos VPH 26, 53 y 66. Los de bajo riesgo a los VPH de tipo 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 57, 61, 62, 64, 69, 70, 71, 72, 81, 83, 84.

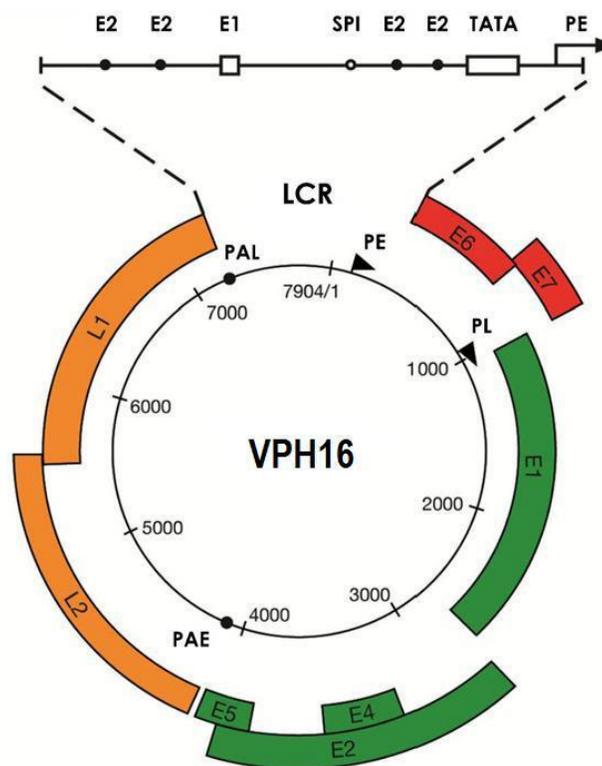
El papilomavirus tipo 16 a nivel mundial es el más prevalente de los VPH oncogénicos, responsable de más de la mitad de los tumores, mientras que el papilomavirus tipo 18 está involucrado en el 20% de los mismos (Lizano, 2009a; Doorbar, 2012; Castro, 2013).



**Figura 1. Cápside del VPH16.** Modelo atómico de la cápside del VPH16 formada por la proteína L1 (PDB:1LOT Modis, 2002).

### 1.1.2 Genoma viral

El genoma de ADN de doble cadena viral tiene aproximadamente 8,000 pares de bases, contiene 8 marcos de lectura abierta divididos en tres regiones (Figura 2). La primera es una región larga de control (LCR, de sus siglas en inglés Long Control Region) no codificante que contiene sitios de unión para factores de transcripción celulares (como SP1) y para las proteínas virales. La segunda es la región temprana (E, de su sigla en inglés Early), que consiste en seis marcos de lectura abierto (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), los que codifican para proteínas no estructurales implicadas en la replicación y oncogénesis, la tercera es la región tardía (L, de su sigla en inglés Late) la cual codifica las proteínas estructurales L1 y L2 (Doorbar, 2012; Beltrán, 2014). En el genoma también se encuentra el promotor temprano (PE) y el promotor tardío (PL) (Figura 2).



**Figura 2. Genoma del VPH16.** Esquema del genoma viral que muestra las tres regiones: LCR, E, L. Se muestra la posición en el genoma del promotor temprano (PE), promotor tardío (PL) y los sitios de poliadenilación temprana (PAE) y tardía (PAL) (Doorbar, 2012).

### 1.1.2.1 Gen E1 y su producto de expresión

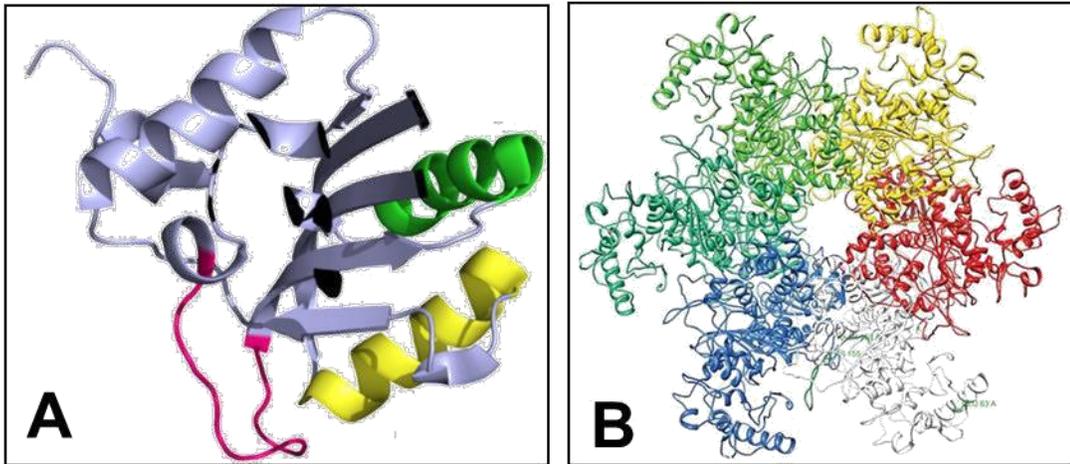
El gen E1 es el más grande y uno de los más conservados de los papilomavirus, cuenta con casi 2 Kb de secuencia. El marco de lectura abierto de este gen empieza en el nucleótido 865 y termina en el 2814 del genoma viral y codifica a la proteína E1. La proteína E1 de 67.5 a 76.2 kDa tiene de entre 600 a 650 aminoácidos, dependiendo del tipo de PV. Esta proteína es una ADN helicasa hexamérica que realiza la replicación del episoma viral en el núcleo de queratinocitos infectados, es la única enzima y está altamente conservada entre los PV. Tiene una débil afinidad por su sitio de unión en la LCR, la secuencia de este (5'-ATTGTT-3') se repite 6 veces en el origen de replicación viral (López, 2006; Bergvall, 2013; PaVE, 2014).

La estructura se divide en tres dominios funcionales (Figura 3), el dominio amino terminal que es la región reguladora y es esencial para la replicación óptima *in vivo*. La región central de longitud variable que contiene el dominio de unión al origen (DBD) reconoce sitios específicos en el *ori* aunque con baja afinidad, consiste en una secuencia de aproximadamente 60 pb y esta secuencia contiene tres elementos, una secuencia rica en A y T, una secuencia palindrómica que se encuentra en la LCR, formando hexámeros y dobles hexámeros y una secuencia de 12 pb que constituyen un sitio de unión para la proteína E2, y la tercer región es el carboxilo terminal con la actividad de helicasa/ATPasa que participa en la replicación del ADN viral e incluye secuencias involucradas en la oligomerización de la proteína (Enemark, 2000; Chen, 2001; Stenlund, 2003; Titolo, 2000 y 2003; Morin, 2011; Schuck, 2013).

## 1.2 Infección por VPH

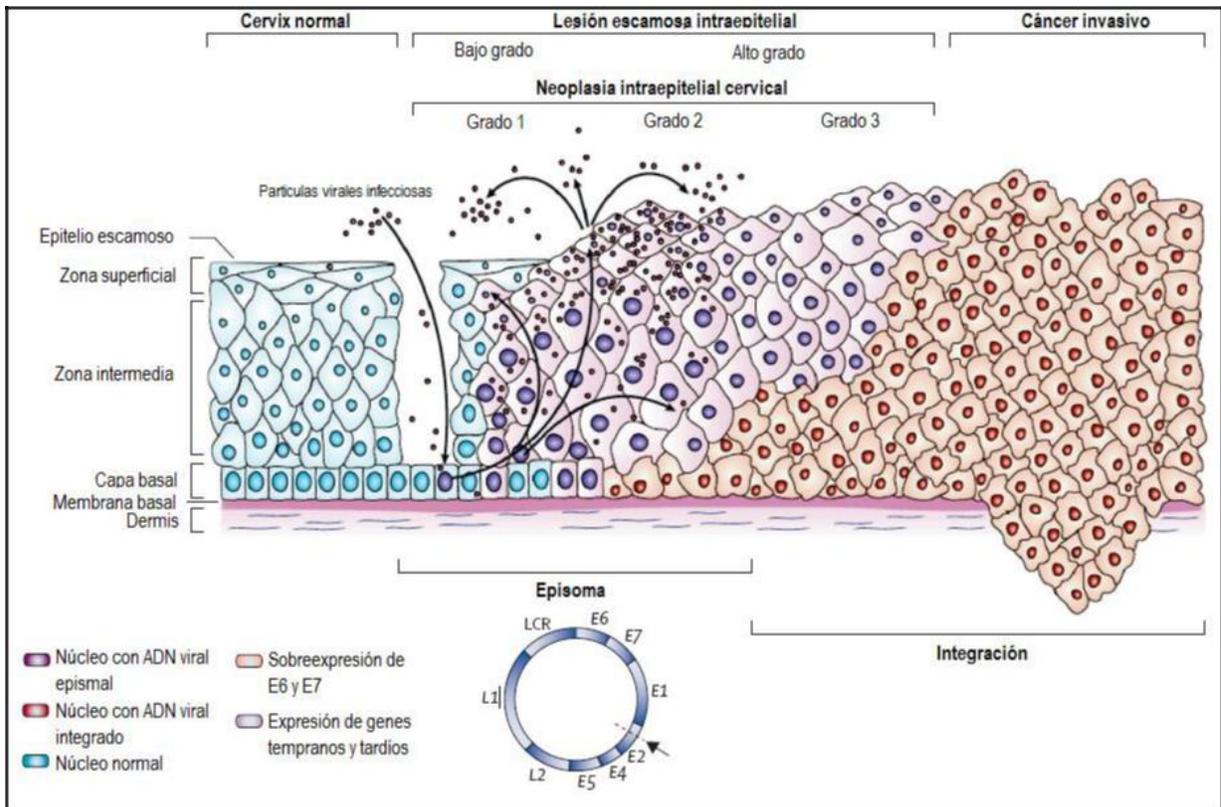
El factor etiológico para el desarrollo del cáncer cérvicouterino es la infección por VPH (zur Hausen, 2002) y esta es una enfermedad de transmisión sexual y por esto los factores de riesgo están relacionados con el comportamiento sexual.

Las infecciones genitales por VPH pueden detectarse en cérvix, vagina y vulva en mujeres; glande, prepucio y piel del pene y escroto en hombres; y en canal anal y perianal tanto de mujeres como de hombres (Lizano, 2009a).



**Figura 3. Dominios funcionales de la proteína E1.** A) Se muestra la estructura 3D del dominio de unión al ADN (PDB 1KSX, 2002). B) Estructura del dominio C-terminal (PDB 2GXA, 2006).

El VPH infecta las células de la capa basal del tejido epitelial cervical y depende de la diferenciación epitelial para que llegue a término el ciclo de vida viral (Figura 4). En las células basales el virus puede permanecer de forma latente o replicarse como un episoma expresando las proteínas E6, E7, E1 y E2 en las capas inferiores del tejido. Los oncogenes virales (E6 y E7) retrasan el proceso de diferenciación epitelial y estimulan la proliferación celular. En las capas intermedias y superficiales del tejido se expresan los genes E1, E2, E4, y E5. Las proteínas E1 y E2 se unen al origen de replicación para la activación de la replicación del genoma viral. Las proteínas de la cápside L1 y L2 son sintetizadas y ensamblan con el genoma viral para formar las partículas virales en las células completamente diferenciadas de las capas superficiales del tejido epitelial cervical. Para que las lesiones causadas por la infección pasen a cáncer se requiere una expresión continua de los genes E6 y E7 (Lizano, 2009b).

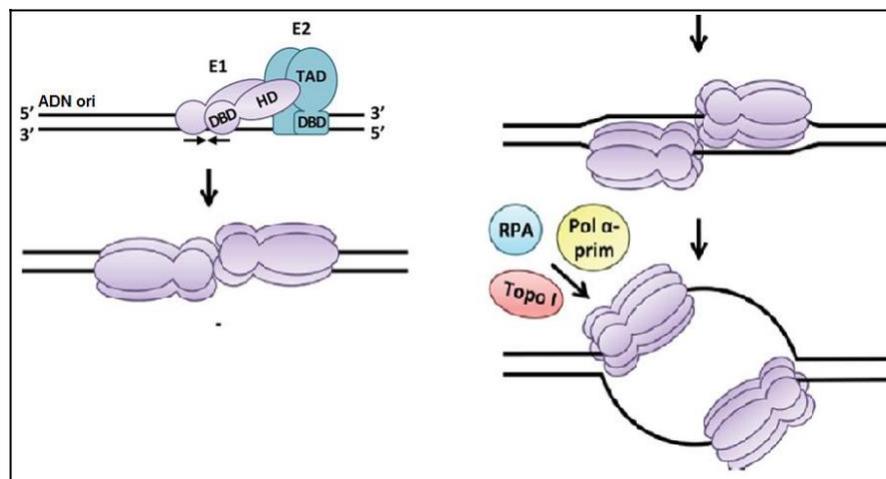


**Figura 4. Ciclo de vida del VPH.** Los VPH acceden a la capa basal del tejido epitelial a través de microabrasiones. Después de la infección, se expresan los genes tempranos y el genoma viral se replica del ADN episomal. En las capas que siguen, el ADN viral sigue replicándose y en las capas superficiales se expresan los genes L1 y L2 para formar los viriones. Las infecciones de alto riesgo progresan a neoplasias intraepiteliales cervicales. La integración de los episomas virales al genoma de la célula está asociado al cáncer (Crosbie, 2013).

### 1.2.1 Replicación viral

La replicación del ADN viral se inicia por la unión cooperativa de E1 y E2 al origen de replicación viral (Figura 5). Para el ensamble del complejo E1-E2-ori se requiere la unión al ADN de E1 y E2, así como una interacción entre las dos proteínas. La proteína E2 se une al dominio de activación N-terminal de la proteína E1 y se une al origen de replicación, a una secuencia palindrómica de 18 pb rica en A y T que se halla en la región LCR, formando hexámeros y dobles hexámeros. El hexámero rodea al ADN de modo que el sustrato pasa a través del centro del anillo hexámero. La unión de E1 al sitio de origen causa una curvatura, crítica para el correcto ensamblaje del complejo

de iniciación y para las primeras etapas del desenrollamiento de la doble hélice. E1 interacciona directamente con la ADN polimerasa  $\alpha$ , mientras que esta necesita las proteínas de replicación A, que estabilizan la cadena sencilla del dúplex abierto, las topoisomerasas I y II y los cofactores PCNA y RFC (factor de replicación C) para que se lleve a cabo la replicación. La unión de E1 a su sitio en la región LCR depende a su vez, de su acomplejamiento con la proteína viral E2, la cual aumenta la especificidad de E1 por su secuencia, así como su capacidad para desenrollar la doble hélice. Las interacciones E2-E1 hacen que E2 atraiga otras moléculas de E1 a un complejo inicial E2-E1-ADN. Conforme se ensamblan oligómeros más grandes de E1 y E2 este es finalmente desplazado mediante una reacción dependiente de ATP (Acheson, 2007; Pittayakhajonwut, 2010).



**Figura 5. Replicación del ADN viral.** Se forma el complejo E1-E2-ori y se ensambla el doble trímero de E1 con el reclutamiento de más moléculas de E2. A través de la hidrólisis de ATP se forma el doble hexámero de E1 el cual coopera con los factores celulares (Proteína A de replicación, Polimerasa  $\alpha$  y Topoisomerasas I y II) (Bergvall, 2013).

### 1.2.2 Cáncer cervicouterino

El cáncer de cérvix ocurre en dos formas predominantes: carcinoma escamoso y adenocarcinoma. El tipo histológico más comúnmente encontrado en las mujeres es

el carcinoma escamoso (80% de los casos) y está más frecuentemente asociado al VPH 16. Los VPH de alto riesgo persisten en promedio mucho más tiempo infectando el epitelio en comparación con otros tipos de VPH, de tal manera que aquellas lesiones que la presentan podrían progresar a un cáncer más rápidamente que aquellas que no presentan VPH o tienen otro tipo viral.

La historia natural del cáncer cervicouterino implica la progresión gradual de una serie de etapas secuenciales en que las células del cérvix presentan ciertas anomalías histológicas conocidas como Neoplasia Intraepitelial Cervical (Figura 4), NIC I (displasia leve), NIC II (displasia moderada), NIC III (displasia severa/carcinoma *in situ*) y finalmente un cáncer invasor (Lizano, 2009a).

### **1.3 Tratamiento**

En la actualidad no existe algún fármaco específico contra el VPH de uso sistémico, que presente un bajo perfil de toxicidad y con eficacia comprobada. La solución ha sido la utilización de métodos terapéuticos que destruyen las células infectadas (físicos, químicos o quirúrgicos).

El podofilino es un extracto alcohólico de rizomas y raíces de plantas y el podofilotoxino es el extracto purificado del *Podophyllum peltatum* que constituye la primera opción costo-beneficio en verrugas genitales. La primera y segunda línea incluye el tratamiento quirúrgico y el uso de imiquimod, este es un análogo de nucleótidos que, aplicado en forma tópica, actúa como un modificador de la respuesta inmune. La crioterapia y el ácido tricloro-acético son generalmente terapias de tercera línea, salvo en el caso de verrugas del meato urinario y mujeres embarazadas, respectivamente. En las verrugas recalcitrantes genitales, se recomienda emplear terapia de tercera línea, incluyendo cirugía, en combinación con imiquimod y cidofovir, este es un análogo de nucleótidos que actúa sobre el ADN viral (Concha, 2007).

## 1.4 Vacunas

Tanto vacunas preventivas como terapéuticas se encuentran en actual desarrollo, constituyendo una gran esperanza en el tratamiento del VPH.

Las primeras vacunas desarrolladas, con finalidad profiláctica, están conformadas por sub-unidades de pseudo-cápsides virales-PCV generadas por autoensamblaje de L1, la principal proteína capsular (Concha, 2007), estas son: Cervarix, vacuna recombinante producida por GlaxoSmithKline y comercializada desde el 2010, que protege contra los tipos de alto riesgo del VPH 16 y 18; y Gardasil, vacuna cuadrivalente producida por Merck y comercializada desde el 2006, que además de los tipos de anteriores confiere protección contra los tipos de bajo riesgo del VPH 6 y 11, por lo que a diferencia de Cervarix protege contra los condilomas benignos. Sin embargo, estas vacunas no tienen efecto terapéutico contra la infección ya establecida (Pang, 2012; Castle, 2015). Actualmente está en desarrollo por Merck una vacuna nonavalente que en adición a los tipos de VPH anteriores, protegerá contra los tipos 31, 33, 45, 52 y 58 por lo que tiene el potencial de prevenir un 20% más de los cánceres cervicales en comparación a Gardasil (Riethmuller, 2015; Drolet, 2014).

Las vacunas terapéuticas inducen inmunidad contra E6 y E7, y otros antígenos expresados en el epitelio infectado post VPH, e inducen una respuesta antígeno específica mediada por linfocitos T. Estas vacunas serían capaces de inducir una regresión tumoral y se utilizarían como terapia oncológica (Concha, 2007).

## II. ANTECEDENTES

E1 es la proteína principal encargada de la iniciación de la replicación viral y se ha estudiado su participación en las diferentes etapas del ciclo viral, en un estudio realizado por Egawa y cols., en el 2012 se reporta que esta proteína es indispensable en la etapa de establecimiento, pero no para la etapa de mantenimiento de la replicación viral. Para determinar el requerimiento de la proteína E1 en las diferentes etapas de la replicación viral se usó genoma del VPH 16 deficiente de E1 y se monitoreó la habilidad del genoma VPH16 mutante para poder replicarse como episomas nucleares con y sin expresión del E1 exógeno y se observó que el genoma mutante VPH16 se estableció en los queratinocitos solo en presencia del E1 exógeno, ya establecido se pudo replicar de manera eficiente aun cuando se removió el E1 exógeno, pero al monitorear la replicación en queratinocitos diferenciados se observó que vuelve a ser dependiente del E1 exógeno. Por lo tanto, la proteína E1 es esencial para las etapas de establecimiento y la etapa productiva de la replicación, pero necesario para el mantenimiento de la misma.

La proteína E1 está encargada de la iniciación de la replicación del ADN viral pero se ha demostrado que la E1 requiere de la unión con la proteína E2 para llevarse a cabo la replicación, y esto es porque la proteína E1 se une con baja especificidad de secuencia a la LCR, esto se ve demostrado en un trabajo realizado por Dixon y cols., en el 2000, donde la cantidad de E1 que se une al ori se ve aumentada con la adición de E2 y la interacción de las proteínas es mediante los dominios N-terminal de E2 y C-terminal de E1 lo cual ya estaba descrito en el estudio de Yasugi y col., en 1997, en el cual se caracterizó los dominios de las proteínas E1 y E2 que interaccionan para formar el complejo E1-E2.

Es por esto que la interacción de estas proteínas es un importante blanco terapéutico en la búsqueda de inhibidores para el desarrollo de un fármaco contra la infección del VPH. Actualmente ya se han reportado estudios donde realizan la interacción de las

proteínas, usando diferentes sistemas de expresión y purificación, así como de técnicas para evaluar la interacción. En el 2002, Chen y Stenlund para expresar el gen E1 usaron el vector de expresión pET11C-GST y la cepa *E.coli BL21 (DE3)*, induciendo con 0.4 mM de IPTG y obtuvieron una proteína de fusión con una cola de Glutación S-transferasa (GST) que les permitió purificar con cromatografía de afinidad GST y adicionalmente removieron la cola de GST con trombina, de igual manera obtuvieron la proteína E2. La LCR que tiene los sitios de unión a estas proteínas fue amplificado y para los ensayos de interacción fue marcado con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, para estos ensayos usaron la técnica EMSA, donde hicieron una reacción con las proteínas, el ADN y buffer de unión. Otros autores también usaron esta estrategia, como en los trabajos de Titolo y cols., en el 2003, y en 2013 por Schuck y cols., que de igual manera usaron un vector que expresa una proteína con cola GST y la técnica EMSA usando como marcador de ADN un radioisótopo.

Una estrategia diferente fue la realizada por Kantang y cols., en el 2016 donde realizaron un estudio para diseñar péptidos que funcionaran como inhibidores del complejo E1-E2 del VPH16, y para esto utilizaron el vector pMAL-c5x que expresa una proteína de fusión, que le adiciona una cola de proteína de unión a maltosa (MBP) a la proteína E1 y para la proteína E2 usaron el vector pET-28b que adiciona una cola de histidinas, la purificación la hicieron a través de cromatografía de afinidad, con sus respectivas resinas: amilosa-sefarosa para E1 y níquel-sefarosa para E2 y realizaron de manera exitosa la interacción del complejo mediante la técnica ELISA.

En comparación con otras técnicas, EMSA ha sido usada más ampliamente en trabajos donde realizan ensayos de interacción proteína-ácidos nucleicos, y por lo tanto se han desarrollado variantes de esta técnica, una de ellas es el uso geles de agarosa en vez de poliacrilamida y el marcaje no radioactivo, como esta reportado en el trabajo realizado por Ream y cols., en el 2016 donde ellos buscan mejorar la técnica en geles de agarosa, aumentando el voltaje y reduciendo el tiempo de electroforesis, ellos logran establecer estas condiciones usando un buffer de corrida TB 0.5X (Tris 40mM, Ácido bórico 45mM), que les da como resultado una alta resolución de banda.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

El cáncer cérvicouterino representa un problema de salud pública a nivel mundial, produciendo aproximadamente 265,000 muertes y 527,000 casos nuevos al año. El CaCu ocupa el segundo lugar como causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas, su principal agente etiológico es el VPH.

Actualmente no existe cura para la infección por el VPH, lo que hace imperante la necesidad de un antiviral VPH para el tratamiento del CaCu.

La interacción de las proteínas virales E1/E2, que da inicio a la replicación del virus, es un importante blanco terapéutico para la búsqueda de moléculas líder que puedan ser utilizadas en el desarrollo de un antiVPH.

## IV. OBJETIVOS

### Objetivo General

Obtener la proteína rE1 del VPH16 y realizar ensayos de interacción de las proteínas virales E1-E2 y LCR *in vitro*.

### Objetivos específicos

1. Amplificar la región larga de control (LCR) del VPH 16.
2. Amplificar el gen E1 del VPH 16 y clonar el vector pCR-Blunt II-TOPO.
3. Subclonar el gen E1 en el vector de expresión pET-28a y obtener la proteína E1 purificada.
4. Realizar ensayos de interacción entre las proteínas E1, E2 y la LCR por cambio en la movilidad electroforética (electrophoretic mobility shift assay EMSA).

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo es un estudio descriptivo, que se desarrolló en la Facultad de Ciencias Químicas de la UJED, campus Durango en un periodo comprendido de Agosto del 2015 a Noviembre de 2017.

### 5.1 Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo

Se usaron las cepas de *Escherichia coli* (Invitrogen™): (*E.coli DH5α*), genotipo F–Φ80*lacZΔM15*, Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK–,mK+) *phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1*. (*E.coli BLR*), genotipo F– *ompT gal dcm hsdSB*(rK–mB–) Δ(*srl-recA*)306::Tn10(TetR). Así como los plásmidos: pCR-Blunt II-TOPO y pET-28a+.

Para el crecimiento y mantenimiento de la cepa se utilizó el medio Luria Bertani (LB) el cual contiene (p/v): extracto de levadura (0.5%); peptona de caseína (1.0%); cloruro de sodio (1.0%); agar bacteriológico (2%). Cuando se requirió los medios fueron suplementados con kanamicina a una concentración final de 50μg/mL. Las cepas se cultivaron a 37°C en medio LB líquido y/o sólido. Los cultivos en medio líquido se mantuvieron en agitación a 200 rpm.

### 5.2 Amplificación de la LCR por PCR punto final

#### 5.2.1 Diseño de oligonucleótidos para la LCR

Se diseñó un par de oligonucleótidos, uno directo y otro reverso con el programa Primer3 y se analizaron en el programa IDT Olygoanalyzer. Las características de los oligonucleótidos diseñados se muestran en la Tabla 1. La secuencia de la LCR del VPH 16 (Figura 6) se obtuvo de la página Papillomavirus Episteme (<https://pave.niaid.nih.gov/>).

**Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la LCR**

Oligonucleótidos	Posición en la secuencia	Tamaño	GC%	Tm
F 5'CAC CCA CCA CCT CAT CTA CC3'	1	20	60	57.2°C
R 5'CCT GTG GGT CCT GAA ACA TT3'	928	20	50	55.1°C

```

CACCCACCACCTCATCTACC TCTACAAC T GCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAAGTATTGT
ATGTATGTTGAATTAGTGTTGTTTGTGTTGTATATGTTTGTATGTGCTTGTATGTGCTTGTAAAT
ATTAAGTTGTATGTGTGTTTGTATGTATGGTATAATAAACACGTGTGTATGTGTTTTAAATGCT
TGTGTAAC TATTGTGTCATGCAACATAAACTTATTGTTTCAACACCTACTAATTGTGTTG
TGGTTATTCATTGTATATAAACTATATTTGCTACATCCTGTTTTGTTTTATATACTATATTTTG
TAGCGCCAGCGGCCATTTTGTAGCTTCAACCGAATTCGGTTGCATGCTTTTTGGCACAAAAT
GTGTTTTTTTAAATAGTTCTATGTCAGCAACTATGGTTAACTTGTACGTTTCCTGCTTGCCA
TGCGTGCCAAATCCCTGTTTTCTGACCTGCACTGCTTGCCAACCATTCCATTGTTTTTTACA
CTGCACTATGTGCAACTACTGAATCACTATGTACATTGTGTCATATAAAATAAATCACTATGCG
CCAACGCCTTACATACCGCTGTTAGGCACATATTTTTGGCTTGTTTTAACTAACCTAATTGCAT
ATTTGGCATAAGTTTTAACTTCTAAGGCCAACTAAATGTCACCCTAGTTCATACATGAACTGT
GTAAAGGTTAGTCATACATTGTTTCAATTTGTAACACTGCACATGGGTGTGTGCAAACCGTTTTG
GGTTACACATTTACAAGCAACTTATATAATAACTAACTACAATAATTCATGTATAAACTAAG
GGCGTAACCGAAATCGGTTGAACCGAAACCGGTTAGTATAAAAGCAGACATTTTATGCACCA
AAAGAGAACTGC AATGTTTCAGGACCCACAGG AGCGACCCAGAAAGT

```

**Figura 6. Secuencia del LCR del VPH16.** Se muestra la secuencia del LCR del VPH16 (PaVE, HPV16REF.1), donde la secuencia en amarillo corresponde al oligonucleótido directo y en azul al oligonucleótido reverso.

## 5.2.2 PCR punto final para la amplificación de la LCR del VPH16

Los oligonucleótidos fueron diluidos con agua libre de nucleasas a una concentración de 100 mM para usar una solución de trabajo de 10 mM, el ADN genómico utilizado fue donado por el Dr Gerardo Alfonso Anguiano Vega. La LCR fue amplificada en un SureCycler 8800 Thermal Cyclayer de Agilent Technologies, la mezcla de la reacción de PCR se muestran en la Tabla 2 y las condiciones de amplificación en la Tabla 3.

**Tabla 2. Condiciones de los componentes de la reacción de PCR para la LCR**

Reacción de PCR		
Reactivo	Concentración	Volumen
Buffer 5X	1X	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	0.065 mM	3 $\mu$ L
dNTPs	0.25 mM	0.5 $\mu$ L
Oligonucleótidos	0.02 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Taq Polimerasa	0.5 U	0.1 $\mu$ L
ADN genómico	100 ng	0.4 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	N/A	15 $\mu$ L

**Tabla 3. Condiciones de PCR para la LCR**

Etapas	Condiciones de PCR	Tamaño de amplicón (pb)
Desnaturalización inicial	94°C 5 min	913 pb
Desnaturalización Alineación Elongación	40 ciclos: 94°C 1 min, 57.6°C 30 s 72°C 1 min	
Elongación final	72°C 5 min	

Los fragmentos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X (Tris 40Mm, Ácido acético 20Mm, EDTA 1mM) y teñidos con bromuro de etidio para su visualización bajo luz UV en un fotodocumentador ChemiDoc de Bio-Rad. Se utilizó marcador de tamaño molecular de 1kb de Invitrogen.

### **5.2.3 Purificación**

La digestión fue corrida en una electroforesis en gel de agarosa a 1% teñido con bromuro de etidio, después el gel fue visualizado bajo luz UV en un transiluminador y la purificación se realizó con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Se cortaron las bandas correspondientes a la LCR, se transfirieron a un microtubo de 1.5 mL estéril. Al tubo se le añadió 100µL de la solución de unión a membrana y se mezcló en vórtex, posteriormente la mezcla fue incubada a 80°C hasta que se fundió el gel y este se transfirió a una columna insertada en un tubo recolector, se incubó por 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó por 1 min/13,000 rpm y se desechó el filtrado luego se añadieron 700µL de la solución de lavado, se centrifugó por 1 min/13,000 rpm y se desechó el filtrado, después 500 µL de la solución de lavado fue agregado, se centrifugó por 5 min/13,000 rpm y se desechó el filtrado. Se centrifugó la columna por 1min/13,000 rpm, se pasó la columna a un microtubo de 1.5 mL estéril y se añadió 30 µL de agua libre de nucleasas, la columna se incubó a temperatura ambiente por 1 min, se centrifugó por 1min/13,000 rpm y el amplicón LCR purificado se guardó a - 20°C.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio y después el gel fue visualizado bajo luz UV en un fotodocumentador ChemiDoc de Bio-Rad. Se utilizó marcador de tamaño molecular de 1kb de Invitrogen.

## 5.3 Amplificación del gen E1 por PCR punto final

### 5.3.1 Diseño de oligonucleótidos para el gen E1

Se diseñó un par de oligonucleótidos, uno directo y otro reverso con el programa Primer3 y se analizaron en el programa IDT Olygoanalyzer. Las características de los oligonucleótidos diseñados se muestran en la Tabla 4. La secuencia del gen E1 del VPH 16 (Figura 7) se obtuvo de la página Papillomavirus Episteme (<https://pave.niaid.nih.gov/>). Se añadieron los sitios de corte para HindIII (Oligonucleótido directo) y BamHI (Oligonucleótido reverso)

**Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen E1**

Oligonucleótidos	Posición en la secuencia	Tamaño	GC%	Tm
F 5'GGATCC GCT GAT CCT GCA GGT AC3'	865	23	60.9	61.5°C
R 5'AAGCTT TCA TAA TGT GTT AGT ATT TTG TCC TGA C3'	2814	34	32.4	57.5°C

### 5.3.2 Amplificación del gen E1 por PCR punto final

Los oligonucleótidos fueron diluidos con agua libre de nucleasas a una concentración de 100 mM para usar una solución de trabajo de 10 mM, el gen E1 fue amplificado en un SureCycler 8800 Thermal Cyclayer de Agilent Technologies, la mezcla de PCR se muestran en la Tabla 5 y las condiciones de amplificación en la Tabla 6.

Los fragmentos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X (Tris 40Mm, Ácido acético 20Mm, EDTA 1mM) y teñidos con bromuro de etidio para su visualización bajo luz UV en un fotodocumentador ChemiDoc de Bio-Rad. Se utilizó marcador de tamaño molecular de 10,000 pb de Invitrogen.

```

GGATCCGCTGATCCTGCAGGTACCAATGGGGAAGAGGGTACGGGATGTAATGGATGGTTTTATGTAGAGGCT
GTAGTGGAAAAAACAGGGGATGCTATATCAGATGACGAGAACGAAAATGACAGTGATACAGGTGAAGATTT
GGTAGATTTTATAGTAAATGATAATGATTATTTAACACAGGCAGAAACAGAGACAGCACATGCGTTGTTTACTGC
ACAGGAAGCAAAACAACATAGAGATGCAGTACAGGTTCTAAAACGAAAGTATTTGGGTAGTCCACTTAGTGATA
TTAGTGGATGTGTAGACAATAATATTAGTCCTAGATTAAGCTATATGTATAGAAAAACAAAGTAGAGCTGCAAA
AAGGAGATTATTTGAAAGCGAAGACAGCGGGTATGGCAACTGAAGTGAAACTCAGCAGATGTTACAGGTA
GAAGGGCGCCATGAGACTGAAACACCATGTAGTCAGTATAGTGGTGGAAAGTGGGGGTGGTTGCAGTCAGTAC
AGTAGTGGAAAGTGGGGGAGAGGGTGTAGTAAAAGACACACTATATGCCAAACACCACTTACAAATATTTAAA
TGACTAAAACTAGTAATGCAAAGGCAGCAATGTTAGCAAAATTTAAAGAGTTATACGGGGTGAGTTTTTCAGA
ATTAGTAAGACCATTTAAAAGTAATAAATCAACGTGTTGCGATTGGTGTATTGCTGCATTTGGACTTACACCCAG
TATAGCTGACAGTATAAAACACTATTACAACAATATTGTTTATATTACACATTCAAAGTTTAGCATGTTTCATGGG
GAATGGTTGTGTTACTATTAGTAAGATATAAATGTGGAAAAATAGAGAAACAATTGAAAAATTGCTGTCTAACT
ATTATGTGTGCTCCAATGTGTATGATGATAGAGCCTCCAAAATTGCGTAGTACAGCAGCAGCATTATATTGGTAT
AAAACAGGTATATCAAATATTAGTGAAGTGTATGGAGACACGCCAGAATGGATACAAAGACAAACAGTATTACAA
CATAGTTTAAATGATTGTACATTTGAATTATCACAGATGGTACAATGGGCCTACGATAATGACATAGTAGACGATA
GTGAAATTGCATATAAATATGCACAATTGGCAGACACTAATAGTAATGCAAGTGCCTTTCTAAAAAGTAATCACA
GGCAAAAATTGTAAAGGATTGTGCAACAATGTGTAGACATTATAAACGAGCAGAAAAAAACAAATGAGTATGA
GTCAATGGATAAAAATAGATGTGATAGGGTAGATGATGGAGGTGATTGGAAGCAAATTGTTATGTTTTAAGGT
ATCAAGGTGTAGAGTTTATGTCATTTTAACTGCATTA AAAAGATTTT GCAAGGCATACCTAAAAAAATTGCAT
ATTACTATATGGTGCAGCTAACACAGGTAAATCATTATTTGGTATGAGTTTAAATGAAATTTCTGCAAGGGTCTGTA
ATATGTTTTGTAAATCTAAAAGCCATTTTGGTTACAACCATTAGCAGATGCCAAAATAGGTATGTTAGATGATG
CTACAGTGCCCTGTTGAACTACATAGATGACAATTTAAGAAATGCATTGGATGGAAATTTAGTTTCTATGGATG
TAAAGCATAGACCATTGGTACAACATAAATGCCCTCCATTATTAATTACATCTAACATTAATGCTGGTACAGATTCT
AGGTGGCCTTATTTACATAATAGATTGGTGGTGTTCATTTCCTAATGAGTTTCCATTTGACGAAAACGGAAAT
CCAGTGTATGAGCTTAATGATAAGAACTGGAAATCCTTTTTCTCAAGGACGTGGTCCAGATTAAGTTTGCACGA
GGACGAGGACAAGGAAAACGATGGAGACTCTTTGCCAACGTTTAAATGTGTGTCAGGACAAAATACTAACACA
TTATGATTCGAA

```

**Figura 7. Marco de lectura abierto del gen E1 del VPH16.** Se muestra el marco de lectura abierto del VPH16 (PaVE, HPV16REF.1) de 1,950pb. Donde la secuencia en amarillo corresponde al oligonucleótido directo y en azul al oligonucleótido reverso, y la secuencia en verde al sitio de corte de *Bam*HI y el gris al sitio de corte de *Hind*III.

**Tabla 5. Condiciones de los componentes de la reacción de PCR para E1**

<b>Reacción de PCR</b>		
<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen</b>
Buffer 5X	1X	5 $\mu$ L
dNTPs	0.10 mM	0.5 $\mu$ L
Oligonucleótidos	0.02 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Vent ADN Polimerasa	0.5 U	0.2 $\mu$ L
ADN genómico	100 ng	0.4 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	N/A	17.9 $\mu$ L

**Tabla 6. Condiciones de PCR para E1**

<b>Etapas</b>	<b>Condiciones de PCR</b>	<b>Tamaño de amplicón (pb)</b>	
Desnaturalización inicial	94°C 1 min	1,950 pb	
Desnaturalización	30 ciclos:		
Alineación	95°C 1 min,		
Elongación	64.3°C 45 s		
	72°C 2 min		
Elongación final	72°C 5 min		

Los fragmentos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X (Tris 40Mm, Ácido acético 20Mm, EDTA 1mM) y teñidos con bromuro de etidio para su visualización bajo luz UV en un fotodocumentador ChemiDoc de Bio-Rad. Se utilizó marcador de tamaño molecular de 10,000 pb de Invitrogen.

### **5.3.3 Purificación**

El protocolo que se uso es el mismo empleado en 5.2.3.

## 5.4 Clonación del gen E1 en vector pCR-Blunt II-TOPO

### 5.4.1 Ligación del gen E1 y el vector de clonación pCR-Blunt II-TOPO

El fragmento de PCR E1 fue ligado en el vector de clonación pCR-Blunt II-TOPO, la reacción de ligación se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Reacción de ligación TOPO-E1

Reactivos	Volumen	Concentración	Incubación
pCR-Blunt II-TOPO	1 $\mu$ L	10 ng	16°C/Toda la noche
Fragmento E1	4 $\mu$ L	40 ng	
Solución salina	1 $\mu$ L	24 mM	

### 5.4.2 Preparación de células competentes y transformación de *E.coli DH5 $\alpha$*

Se inoculó con una colonia de *E.coli DH5 $\alpha$*  3 mL de medio LB y el cultivo se incubó toda la noche a 37°C/200 rpm. 300  $\mu$ L del preinóculo fueron añadidos a 25 mL de medio LB y el cultivo se incubó a 37°C/200rpm hasta que se llegó a una D.O<sub>600nm</sub> de 0.5. Después el inóculo se incubó en hielo por 10 minutos y se transfirió a un tubo de policarbonato estéril, se centrifugó por 10 min/4,500 rpm a 4°C, el sobrenadante fue decantado y la pastilla se resuspendió con 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM /Tris-HCl 10 mM pH8, se incubó por 15 min en hielo y se centrifugó por 15 min/4,500 rpm a 4°C, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1.3 mL de la solución de CaCl<sub>2</sub> 50 mM /Tris-HCl 10 mM pH8. En tubos de ensaye estériles se llevó a cabo la transformación de las células con la ligación previa (Tabla 8) y estas fueron sometidas a choque térmico (Tabla 9). Se añadieron a cada tubo 800  $\mu$ L de medio LB y se incubaron a 37°C/200 rpm durante 90 min. De cada tubo se tomaron 500  $\mu$ L y se

sembraron en placas con LB estéril adicionado con kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron por 18 hrs a 37°C.

**Tabla 8. Transformación de cepa *E.coli DH5α* con TOPO-E1**

<b>Tubo</b>	<b>Células competentes (µL)</b>	<b>Muestra</b>	<b>ADN (µL)</b>
Control negativo	200 µL	-	-
Control positivo	200 µL	pET-28a	10 µl
E1	200 µL	TOPO-E1	6 µl

**Tabla 9. Choque térmico de células competentes de *E.coli DH5α***

<b>Incubación</b>	<b>Tiempo</b>
Hielo	30 min
Baño maría 42°C	30 s
Hielo	1 min

#### **5.4.2.1 Extracción de ADN plasmídico**

De la placa con transformantes TOPO-E1, se picaron colonias con las cuales se prepararon perinóculos cada uno en 3mL de LB adicionado con kanamicina (50 µg/mL) se incubó toda la noche a 37°C/200rpm.

La extracción del ADN plasmídico se realizó con el kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System. El inóculo se transfirió a un microtubo de 1.5 mL estéril, se

centrifugó por 3 min/14,000 rpm y se decantó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió con 250 µL de la solución de resuspensión de células y se mezcló con vórtex, se añadió 250 µL de la solución de lisis, se mezcló invirtiendo el tubo 4 veces, se añadió 10 µL de proteasa alcalina, se mezcló invirtiendo 4 veces y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 350 µL de la solución de neutralización, se mezcló invirtiendo 4 veces el tubo y se centrifugó por 10 min/14,000 rpm. Se ensambló la columna en el tubo colector, se pasó el sobrenadante a la columna, se centrifugó por 1 min/14,000 rpm y se descartó el filtrado en el tubo recolector. Se añadió 750 µL de la solución de lavado y se centrifugó por 1 min/13,000 rpm, se repitió con 250 µL de solución de lavado. La columna se pasó a un microtubo de 1.5mL estéril y se centrifugó por 1 min/13,000 rpm y se agregaron 50 µL de agua libre de nucleasas. El ADN plasmídico se guardó a -20°C

#### 5.4.2.2 Digestión del ADN plasmídico

El ADN plasmídico TOPO-E1 se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. Las condiciones de la restricción se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10. Condiciones de la restricción de TOPO-E1**

Reactivo	Volumen	Concentración	Incubación
Buffer E	1.5 µL	10X	37°C/3 hrs
TOPO-E1	0.5 µL	155 ng	
Enzima <i>Bam</i> HI	0.5 µL	5 U	
Enzima <i>Hind</i> III	0.5 µL	5 U	
Agua libre de nucleasas	7 µL	N/A	

#### 5.4.3 Secuenciación del plásmido TOPO-E1

El plásmido TOPO-E1 fue secuenciado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

## 5.5 Subclonación del gen E1 en vector de expresión pET-28a(+)

### 5.5.1 Digestión y purificación del vector pET-28a(+)

Para linealizar el plásmido se realizó una digestión con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*. Las condiciones de la restricción se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de la restricción del plásmido pET-28a(+)

Reactivo	Volumen	Concentración	Incubación
Buffer E	10 $\mu$ L	10X	37°C/Toda la noche
pET-28a(+)	5 $\mu$ L	1,500 ng	
Enzima <i>BamHI</i>	2 $\mu$ L	20 U	
Enzima <i>HindIII</i>	2 $\mu$ L	20 U	
Agua libre de nucleasas	31 $\mu$ L	N/A	

Para la purificación del pET-28a(+) linealizado se usó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System siguiendo el mismo protocolo descrito en 5.2.3.

### 5.5.2 Digestión y purificación del fragmento E1

Para la digestión del ADN plasmidico TOPO-E1 se le agregó la enzima *HindIII* (Tabla 12), y el ADN se precipitó agregando 7  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M y etanol 96% hasta la marca de 1.5 del microtubo, se mezcló en vórtex y se dejó precipitando toda la noche a -20°C después se centrifugó por 20 min/14,000 rpm a 4°C y cuidadosamente se decantó el sobrenadante, nuevamente se le agregó 1mL de etanol 96% y se decantó. La muestra se dejó secar y se resuspendió en 30 $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Para verificar la recuperación del ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% con buffer TAE1X (Tris 40Mm, Ácido acético 20Mm, EDTA 1mM) teñido con bromuro de etidio y después el gel fue visualizado bajo luz UV en un fotodocumentador

ChemiDoc de Bio-Rad. Se utilizó marcador de tamaño molecular de 1kb de Invitrogen. Posteriormente se le agregó la enzima *Bam*HI (Tabla 13). Para la purificación del fragmento E1 liberado se usó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System siguiendo el mismo protocolo descrito en 5.2.3.

**Tabla 12. Digestión de TOPO-E1 con *Hind*III**

Reactivo	Volumen	Concentración	Incubación
Buffer E	10 µL	10X	37°C/4 hrs
TOPO-E1	5 µL	1,750 ng	
Enzima <i>Hind</i> III	2 µL	20 U	
Agua libre de nucleasas	83 µL	N/A	

**Tabla 13. Digestión de TOPO-E1 con *Bam*HI**

Reactivo	Volumen	Concentración	Incubación
Buffer E	8 µl	10X	37°C/4 hrs
TOPO-E1	27 µL	890 ng	
Enzima <i>Bam</i> HI	2 µL	20 U	
Agua libre de nucleasas	13 µL	N/A	

### 5.5.3 Ligación del fragmento E1 y el vector pET-28a(+)

El fragmento E1 fue ligado con el vector de expresión pET-28a(+), la reacción de ligación se muestra en la Tabla 14.

**Tabla 14. Reacción de ligación de pET-28a(+)/E1**

Reactivos	Volumen	Concentración	Incubación
pET-28a(+)	2 µL	20 ng	4°C/Toda la noche
E1	5 µL	55 ng	
Buffer 10x T4 ADN Ligasa	1.5 µL	10X	
T4 ADN Ligasa	1.5 µL	3 U	
Agua libre de nucleasas	5 µL	N/A	

#### 5.5.4 Preparación de células competentes y transformación de *E.coli DH5α*

Se preparó un preinóculo de *E.coli DH5α* y el protocolo usado para la preparación de las células competentes fue descrito en 5.4.2. Los controles, la muestra para la transformación se muestran en la Tabla 15 y las condiciones del choque térmico se muestran en la Tabla 16.

**Tabla 15. Transformación de *E.coli DH5α* con pET-28a(+)/E1**

Tubo	Células competentes (µL)	Muestra	ADN (µL)
Control negativo	200 µL	-	-
Control positivo	200 µL	TOPO-E1	10µl
E1	200 µL	pET-28a(+)/E1	15µl

**Tabla 16. Choque térmico de células competentes de *E.coli DH5α***

<b>Incubación</b>	<b>Tiempo</b>
Hielo	30 min
Baño maría 42°C	2 min
Hielo	2 min

#### **5.5.4.1 Extracción de ADN plasmídico y digestión con *Bam*HI y *Hind*III**

Se inoculó una colonia de *E.coli DH5α* transformada con pET-28a(+)/E1 en 3mL de medio LB adicionado con kanamicina ( $\mu\text{g/mL}$ ) y el cultivo se incubó durante toda la noche a 37°C/200rpm. Para la extracción del plásmido se usó el protocolo descrito en 5.3.2.1. El plásmido pET-28a(+)/E1 se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. Las condiciones de la restricción se muestran en la Tabla 17.

**Tabla 17. Condiciones de restricción del plásmido pET-28a(+)/E1**

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración</b>	<b>Incubación</b>
Buffer E	1.5 $\mu\text{L}$	10X	37°C/3 hrs
pET-28a(+)/E1	0.5 $\mu\text{L}$	157 ng	
Enzima <i>Bam</i> HI	0.5 $\mu\text{L}$	20 U	
Enzima <i>Hind</i> III	0.5 $\mu\text{L}$	20 U	
Agua libre de nucleasas	7 $\mu\text{L}$	N/A	

#### **5.5.5 Preparación de células competentes y transformación de *E.coli BLR***

Se preparó un preinóculo de *E.coli BLR*, el protocolo fue el descrito en 5.4.2. Las

condiciones del choque térmico y la transformación de las células competentes muestran en las Tabla 16 y 18 respectivamente

**Tabla 18. Transformación de *E.coli BLR* con pET-28a(+)/E1**

<b>Tubo</b>	<b>Células competentes (µL)</b>	<b>Muestra</b>	<b>ADN (µL)</b>
Control negativo	200 µL	-	-
Control positivo	200 µL	TOPO-E1	10 µl
E1	200 µL	pET-28a(+)/E1	15 µl

#### 5.5.5.1 Extracción de ADN plasmídico y digestión con *Bam*HI y *Hind*III

Se inoculó una colonia de *E.coli BLR* transformada con pET-28a(+)/E1 3 mL de medio LB adicionado con kanamicina (µg/mL) y el cultivo se incubó durante toda la noche a 37°C/200 rpm. Para la extracción del plásmido se usó el protocolo descrito en 5.4.2.1

El plásmido pET-28a(+)/E1 se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. Las condiciones de la restricción se muestran en la Tabla 19.

**Tabla 19. Condiciones de restricción del plásmido pET-28a(+)/E1**

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración</b>	<b>Incubación</b>
Buffer E	1.5 µL	10X	37°C/3 hrs
pET-28a(+)/E1	0.5 µL	160 ng	
Enzima <i>Bam</i> HI	0.5 µL	20 U	
Enzima <i>Hind</i> III	0.5 µL	20 U	
Agua libre de nucleasas	7 µL	N/A	

## 5.6 Obtención de la proteína rE1 purificada

### 5.6.1 Expresión del gen E1 y extracción de las proteínas

Se preparó un preinóculo de *E.coli* BLR transformado con pET-28a(+)/E1 en 3 mL de medio LB adicionado con kanamicina ( $\mu\text{g/mL}$ ) y se dejó crecer toda la noche a  $37^\circ\text{C}/200\text{rpm}$ . Se inocularon 6 matraces con 300  $\mu\text{L}$  del preinóculo por cada 25 mL de medio LB/Kanamicina (50  $\mu\text{g/mL}$ ), se incubaron hasta llegar a una D.O<sub>600nm</sub> de 0.5, y se tomó una muestra de 1 ml para control negativo. La inducción de la proteína rE1 se hizo a diferentes concentraciones de IPTG y a diferentes tiempos de incubación como se muestran en la Tabla 20, la temperatura de incubación fue de  $37^\circ\text{C}$ . Luego se tomó una muestra de 1 mL de cada inóculo para el control positivo y el resto se transfirió a tubos cónicos de 50 mL el cual se centrifugó por 10 min/13,000 rpm y los controles a 5min/13,000 rpm. Se lavó con 5 y 1mL de Tris/NaCl 50 mM pH8 respectivamente, se centrifugó por 10min/13,000 rpm  $4^\circ\text{C}$  y por 5min/13,000 rpm los controles, el sobrenadante se eliminó, y los controles fueron resuspendidos en una proporción 3:1 (muestra:buffer) en buffer de carga (4x Laemmli sample buffer,  $\beta$ -mercaptoetanol 355mM) y se lisaron por calor por 8 minutos, después se enfriaron a temperatura ambiente y se analizaron en un gel de electroforesis de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie (Bio-Safe<sup>TM</sup> Coomassie G-250 Stain).

**Tabla 20. Condiciones de inducción de la expresión de la proteína rE1 en *E.coli* BLR**

Inóculo	IPTG (mM)	Tiempo (Hrs)
I	0.25	4
II	0.50	
III	0.25	6
IV	0.50	
V	0.50	10
VI	1.00	



Posteriormente se hizo una inducción con un volumen inicial de inóculo de 200 mL, con 0.5 mM IPTG y se incubó a 37°C/200 rpm por 10 horas. Se transfirió a tubos cónicos de 50 mL esteriles y se centrifugó por 10 min/13,000 rpm. La pastilla se lavó con 10 mL de Tris/NaCl 50 mM pH8 y se centrifugó por 15 min/13,000 rpm 4°C, el sobrenadante se eliminó y las pastillas obtenidas fueron resuspendidas en un volumen final de 9 mL de Tris/NaCl 50 mM pH8, después en agitación se agregó el buffer de lisis (Lisozima 100 mg/ml, Tris-NaCl 50 mM pH8) y se incubó toda la noche a 37°C/200 rpm. El extracto celular lisado se centrifugó por 20 min/4,000 rpm y después se separó el sobrenadante.

Para visualizar las proteínas se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y se tiñó con azul de Coomassie (Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain).

### **5.6.2 Purificación de la proteína rE1 de VPH16**

La proteína recombinante E1 se purificó por cromatografía de afinidad IMAC-Cobalto, utilizando el kit TALON Metal Affinity Resin (Clontech), el procedimiento se llevó a cabo a 4°C.

2 mL de la resina previamente resuspendida se agregó a la columna (TALON 2 ml Disposable Gravity Columns) y el buffer de almacenamiento de resina se drenó por flujo de gravedad, después la columna fue equilibrada con 20 mL del buffer de equilibrio (HisTALON Buffer Set). La muestra de proteínas se agregó a la columna y luego se lavó con 16mL de buffer de equilibrio seguido de 14 mL de buffer de lavado (660 µL del buffer de elución HisTALON mezclado con 9.34 mL del buffer de equilibrio HisTALON). Al final la proteína recombinante se eluyó con 10 mL de buffer de elución (HisTALON Buffer Set) y se recolectaron en microtubos de 1.5 mL fracciones de 1 mL. La concentración de la proteína fue medida en el NanoDrop™ 2000 de Thermo Fisher Scientific.

Para visualizar las fracciones de la proteína recombinante purificada se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y se tiñó con azul de Coomassie (Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain).

## 5.7 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) de las interacciones E1-LCR y E1-E2-LCR

Se realizaron reacciones de unión entre la LCR y la proteína rE1 en presencia (Tabla 21) y ausencia de la proteína rE2 (Tabla 22). Las reacciones se corrieron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X (Tris 40Mm, Ácido acético 20Mm, EDTA 1mM), a 90V por 40min.

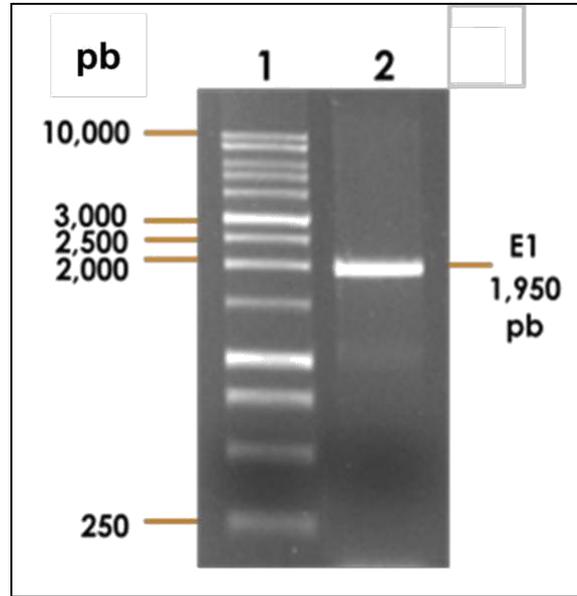
**Tabla 21. Reacción del ensayo de interacción E1-LCR**

Reactivo	Volumen	Concentración	Incubación
Proteína rE1	15 µL	60 ng	25°C/15 min
LCR	5 µL	25 ng	
Buffer de unión	10 µL	N/A	

**Tabla 22. Reacción del ensayo de interacción E1-E2-LCR**

Reactivo	Volumen	Concentración	Incubación
Proteína rE1	15 µL	60 ng	25°C/15 min
Proteína rE2	8 µL	64 ng	
LCR	5 µL	25 ng	
Buffer de unión	10 µL	N/A	





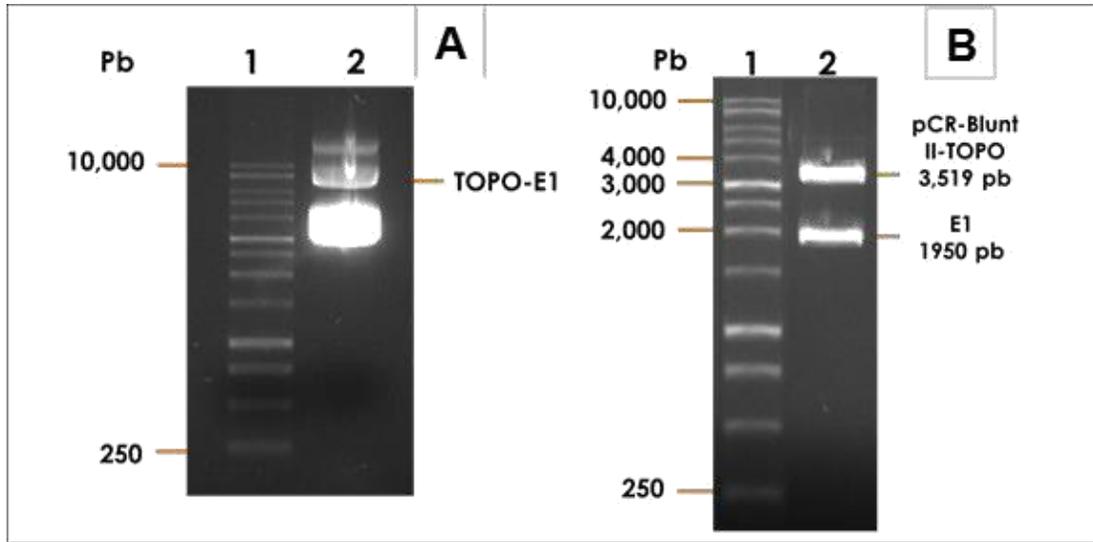
**Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del amplicón E1.** Carril 1. Marcador de tamaño molecular 10kb. Carril 2. Amplicón del gen E1 de 1,950 pb.

### 6.3 Plásmido TOPO-E1 y digestión con *Bam*HI y *Hind*III

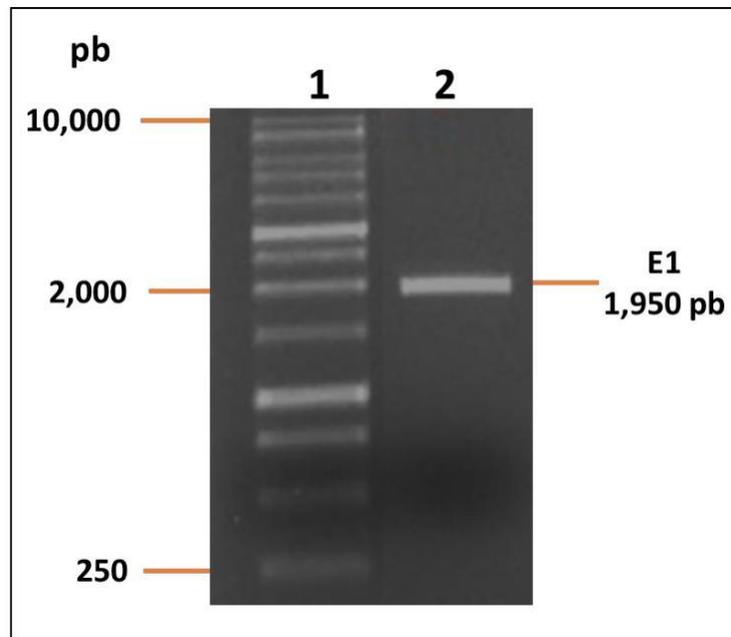
Se obtuvieron transformantes de *E.coli DH5α* con el plásmido TOPO-E1 como se describió en Materiales y Métodos, se analizó una de las colonias transformadas y se visualizó la presencia del plásmido, corroborando la presencia del inserto E1 por digestión con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observó para el vector pCR-Blunt II-TOPO una banda de aproximadamente 3,519 pb y para el gen E1 una banda de 1,950 pb (Figura 10).

### 6.4 Purificación del producto de digestión del plásmido TOPO-E1

El inserto de E1 liberado en la digestión fue purificado como se describe en Materiales y Métodos. En un gel de electroforesis se observó una banda de aproximadamente 1950pb correspondiente al gen E1 (Figura 11).

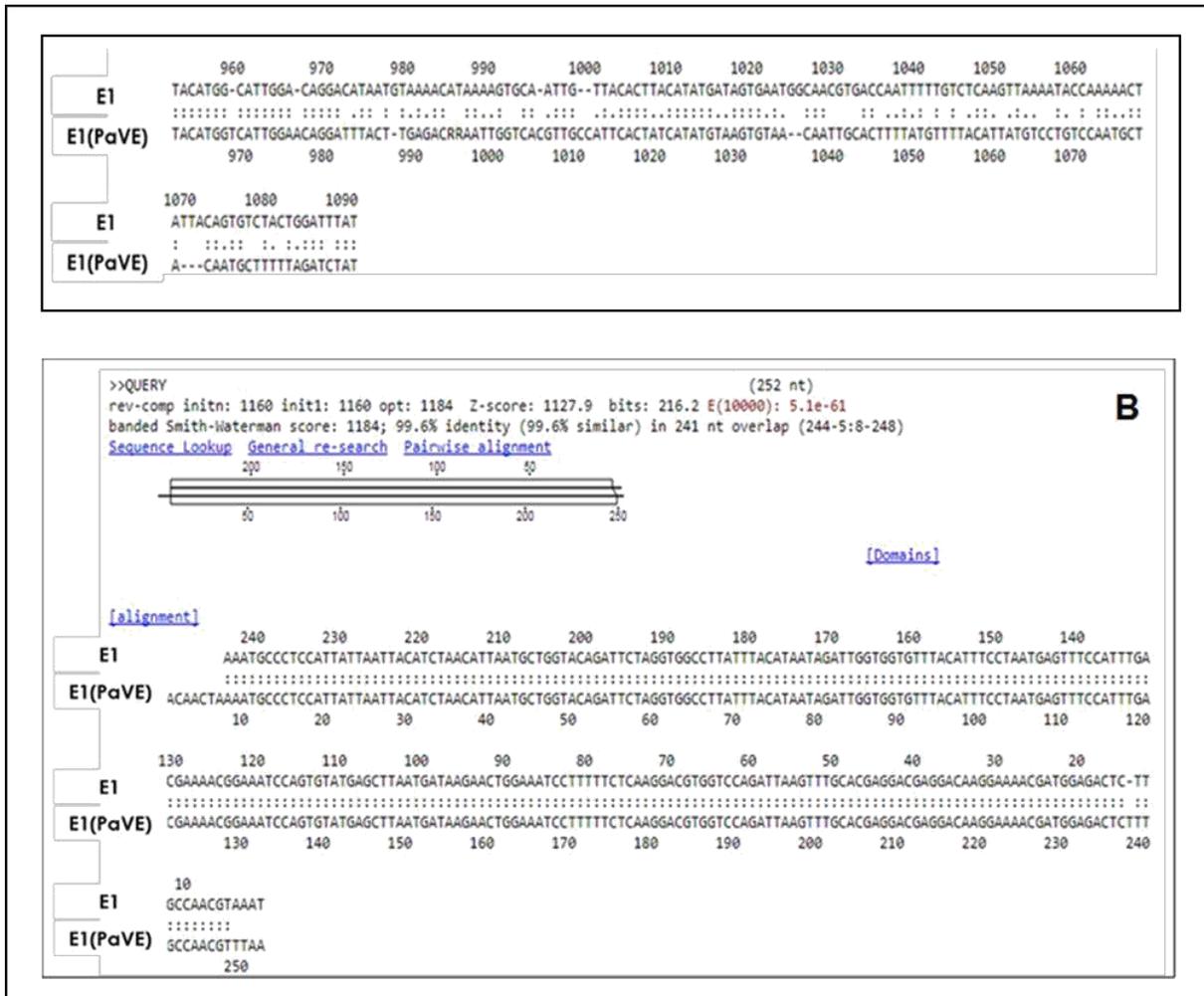


**Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del plásmido TOPO-E1 y digestión con *Bam*HI y *Hind*III.** A) Carril 1. Marcador de tamaño molecular 10 kb. Carril 2. Plásmido TOPO-E1. B) Carril 1. Marcador de tamaño molecular 10 kb. Carril 2. Vector pCR-Blunt II-TOPO de 3,519pb y gen E1 de 1,950pb.



**Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la purificación de E1.** Carril 1. Marcador de tamaño molecular 10 kb. Carril 2. Producto de 1,950 pb del gen E1purificado.

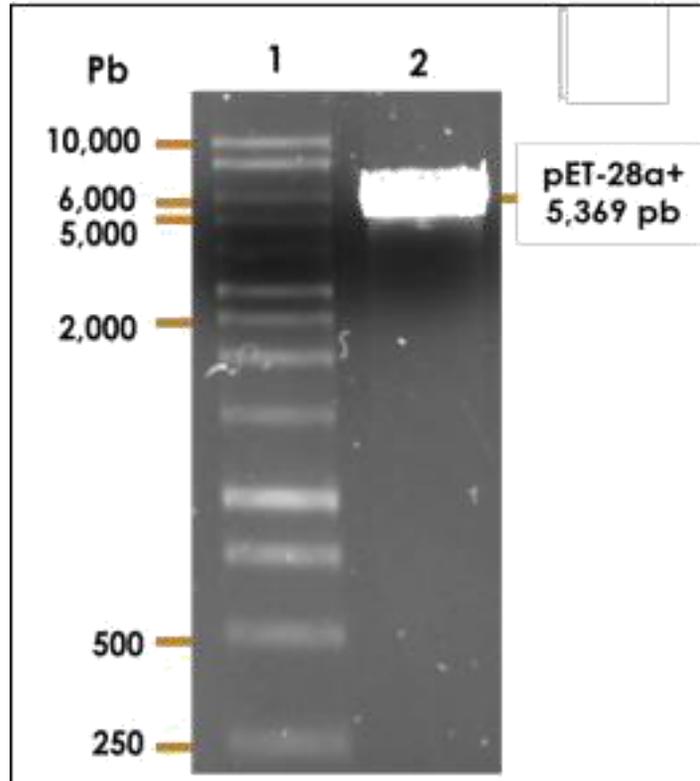




**Figura 12.** Alineamiento de la secuencia del amplicón E1 ligado en el vector pCR–Blunt II-TOPO y la secuencia reportada en PaVE A) Alineamiento con la secuencia directa, mostrando 93.5% de identidad B) Alineamiento con la secuencia reversa mostrando 99.6% de identidad.

## 6.6 Linealización del plásmido pET-28a(+)

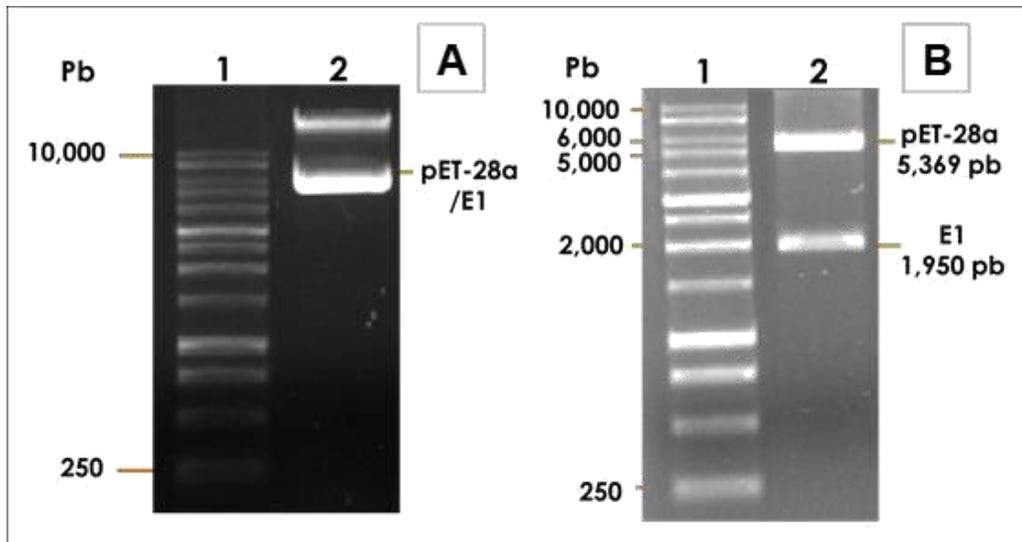
El plásmido pET-28a(+) fue linealizado como se describe en Materiales y método. En la Figura 13 se muestra el patrón electroforético de la digestión con *Bam*HI y *Hind*III, observando una sola banda de un tamaño molecular aproximado de 5,369 pb.



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del plásmido pET-28a(+) linealizado con *Bam*HI y *Hind*III. Carril 1. Marcador de tamaño molecular 10kb. Carril 2. Vector pET-28a(+) linealizado de 5,369pb.

### 6.7 Plásmido pET-28a(+)/E1 y digestión con *Bam*HI y *Hind*III

Se obtuvieron transformantes de *E.coli* BLR con el plásmido pET-28a(+)/E1 como se describió en la sección 5.3 de Materiales y Métodos, se analizó una de las colonias y se visualizó la presencia del plásmido y se comprobó la presencia del inserto E1 por digestión con *Bam*HI y *Hind*III por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se observó para el pET-28a(+) una banda de aproximadamente 5,369pb y para el gen E1 una banda de 1,950pb (Figura 14).



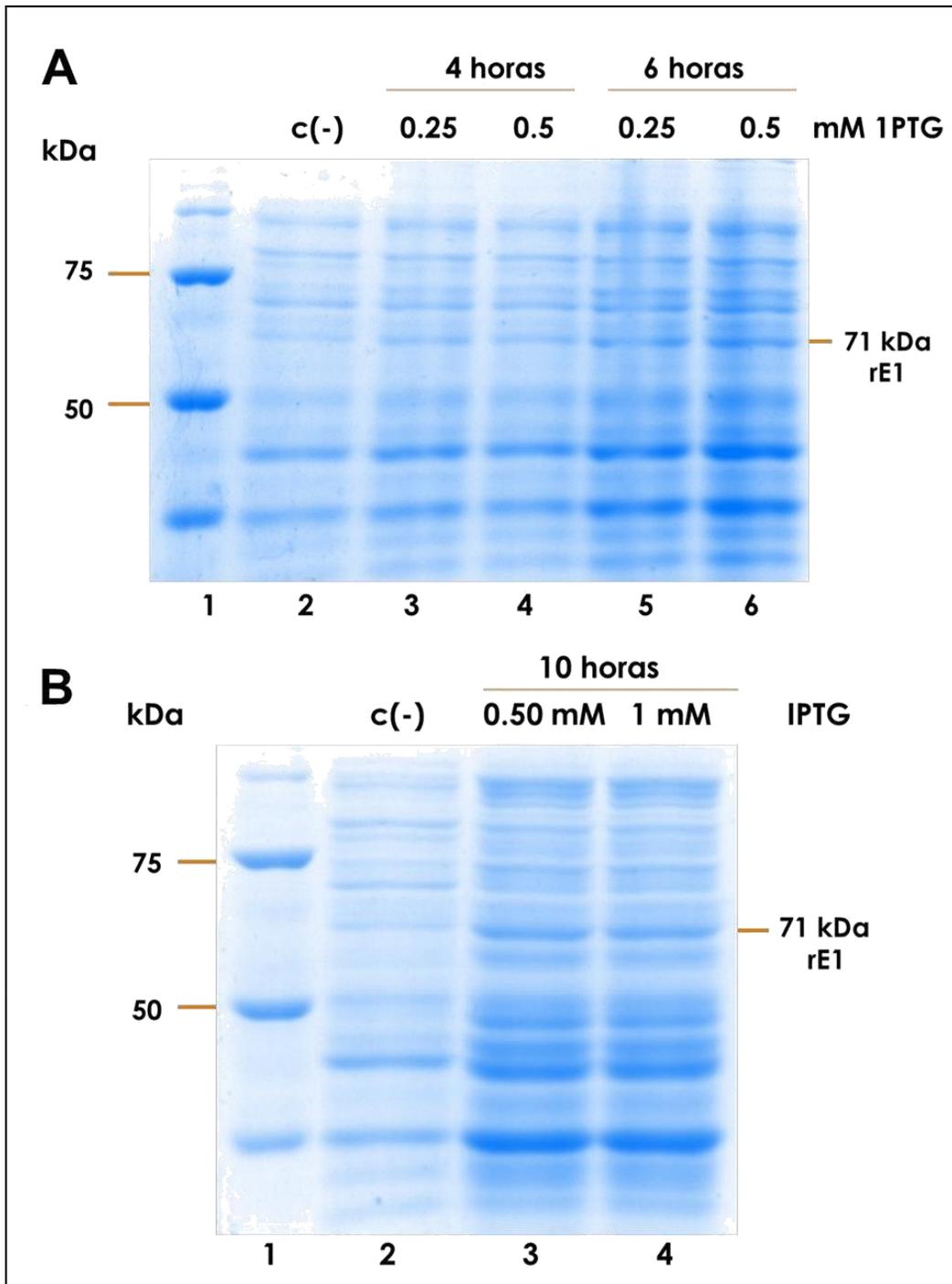
**Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del plásmido pET-28a(+)/E1 y digestión con *Bam*HI y *Hind*III.** A) Carril 1. Marcador de tamaño molecular 10kb. Carril 2. Plásmido pET-28a(+)/E1. B) Carril 1. Marcador de tamaño molecular 10kb. Carril 2. Vector pET-28a(+) linealizado de 5,369 pb y gen E1 de 1,950 pb.

## 6.8 Análisis de los extractos de proteínas después de la inducción con IPTG

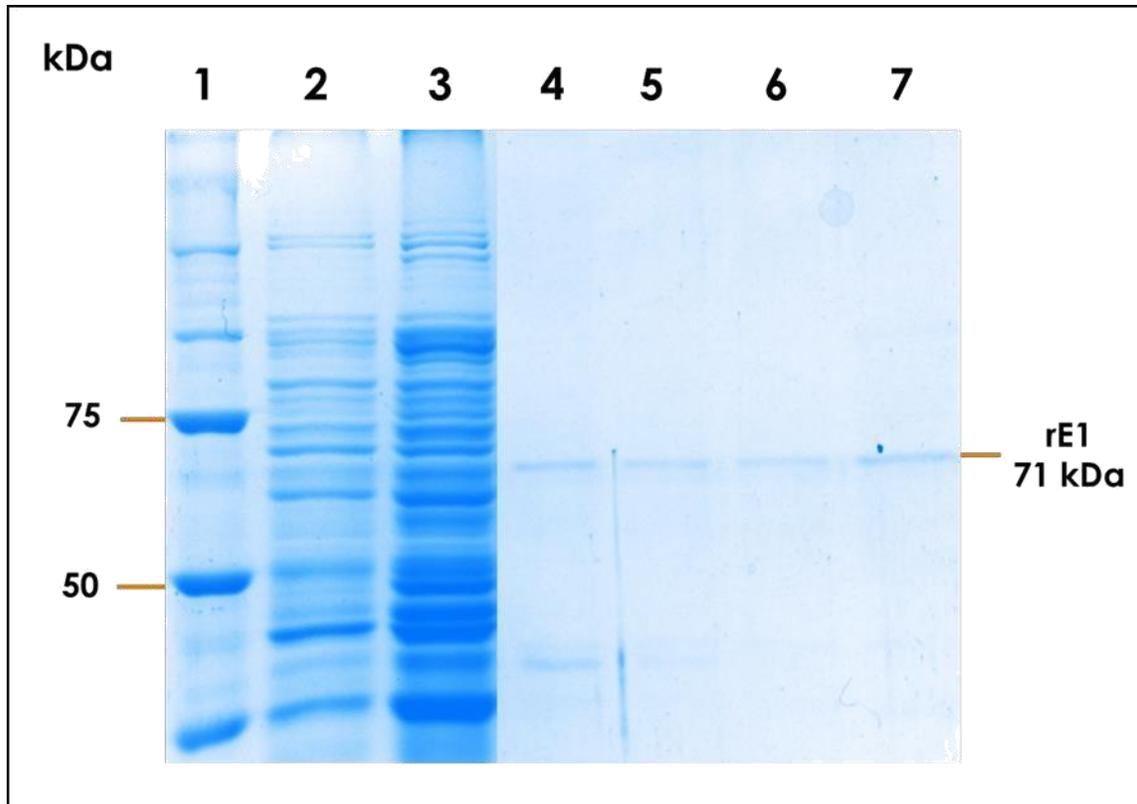
En la Figura 15 se muestra el análisis de los extractos celulares tras inducción en SDS-PAGE al 10%, se observó la banda correspondiente a rE1 de 71 kDa (Figura 15 A y B). No se observa diferencia en la expresión de la proteína cuando fue inducida con IPTG 0.5 mM y 1 mM por 10 horas (Figura 15 B).

## 6.9 Purificación de la proteína rE1 por cromatografía de afinidad

Las condiciones finales de inducción fueron usando 0.5 mM de IPTG por 10 Hrs a 37°C y la purificación de la proteína rE1 se hizo por cromatografía de afinidad como se describió en Materiales y Métodos, las diferentes fracciones fueron analizadas en SDS-PAGE al 10%, como se observa en la Figura 16, la fracción correspondiente al carril 6 presentó la mayor pureza de la proteína rE1 (71 kDa), dando una concentración de 4ng/μL a 280 nm.



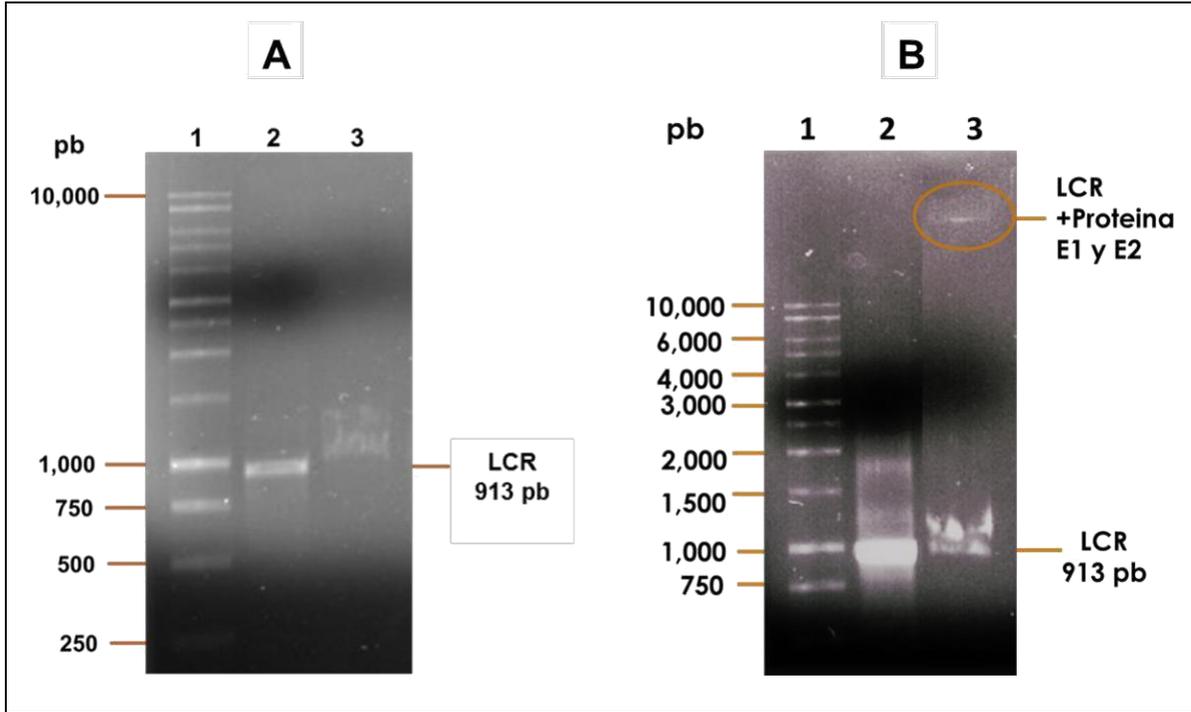
**Figura 15. Análisis de los extractos celulares inducidos con IPTG en SDS-PAGE al 10%** A) Carril 1. Marcador de peso molecular de proteínas de 10 a 250 kDa. Carril 2. Control negativo: extracto celular sin inducción con IPTG. Carril 3. Inducción con IPTG 0.25 mM /4 horas. Carril 4. Inducción con IPTG 0.5 mM /4 horas. Carril 5. Inducción con IPTG 0.25mM /6 Hrs. Carril 6. Inducción con IPTG 0.5 mM /6 Hrs. B) Carril 1. Marcador de peso molecular de proteínas de 10 a 250 kDa. Carril 2. Control negativo. Carril 3. Inducción con IPTG 0.5mM /10 Hrs. Carril 4. Inducción con IPTG 1mM/10 Hrs.



**Figura 16. SDS-PAGE al 10% de las fracciones de rE1 obtenidas en la purificación por cromatografía de afinidad.** A) Carril 1. Marcador de peso molecular de proteínas de 10 a 250 kDa. Carril 2. Control negativo. Carril 3. Control positivo. Carril 4-7 fracciones de proteína rE1 inducida con 0.5 mM de IPTG a 37°C/10 Hrs.

### **6.10 Ensayos por cambio en la movilidad electroforética (EMSA) de LCR y la proteína rE1 en ausencia y presencia de la proteína rE2**

Las reacciones de interacción E1-LCR y E1-E2-LCR se llevaron a cabo por la técnica EMSA en gel de agarosa 1% a través del retardo en la corrida tomando como control a la LCR. Las Figuras 17 A y B muestran la interacción de E1-LCR en presencia y ausencia de la proteína E2, como se puede observar en ausencia de la proteína E2 no se observó banda correspondiente a la interacción de la proteína rE1 y la LCR (Figura 17 A), en presencia de la proteína E2 se observó interacción del complejo E1-E2-LCR (Figura 17 B).



**Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ensayo de interacción de E1-LCR y E1-E2-LCR por EMSA. A)** Carril 1. Marcador de tamaño molecular 10 kb. Carril 2. LCR 913 pb. Carril 3. No se observa banda correspondiente a E1-LCR, la banda inferior corresponde al LCR no unido a proteínas. **B)** Carril 1. Marcador de tamaño molecular 10 kb. Carril 2 LCR 913 pb. Carril 3. Banda superior correspondiente al complejo E1-E2-LCR, y la banda inferior corresponde al LCR no unido a proteínas.

## VII. DISCUSIÓN

El VPH es el agente causal de una de las infecciones de transmisión sexual más comunes en todo el mundo, que afectan principalmente a la población femenina. La infección persistente con VPH de alto riesgo está reconocida como factor de riesgo para el desarrollo del cáncer cervicouterino, el cual se encuentra entre los tipos de cáncer más comunes en mujeres a nivel mundial (Castro y Pérez, 2013; Beltran, 2014). De entre los diferentes tipos de VPH el 16 es el más prevalente alrededor del mundo encontrándose de entre el 50% al 70% de los casos de CaCu (ICO HPV Information Center, 2016).

La necesidad del desarrollo de un nuevo fármaco antiVPH viene de la falta de un tratamiento específico contra la infección y actualmente solo se han desarrollado vacunas con finalidad profiláctica (Concha, 2007). En respuesta a esta necesidad, el uso de blancos terapéuticos está siendo implementada en la búsqueda de moléculas líder para el desarrollo de un fármaco. Un atractivo blanco terapéutico de estudio es la interacción de las proteínas virales E1-E2, que conforman el complejo del inicio de la replicación, siendo la proteína E1 la enzima encargada de la replicación viral (Acheson, 2007; Pittayakhajonwut, 2010).

En este trabajo de investigación se tuvo como objetivo la obtención de la proteína recombinante E1 del VPH16 como una futura aplicación en la búsqueda de moléculas líder. Con base a este objetivo se realizó la amplificación, clonación y secuenciación del gen E1 del VPH16 y se hizo el análisis molecular mediante el programa GGSEARCH/GLSEARCH confirmándose la secuencia del gen E1 del VPH16.

Para la expresión de la proteína E1 recombinante, se utilizó el vector pET-28a(+), en el que esta es expresada como proteína de fusión con una cola de histidinas en su extremo N-terminal. Existen diversos trabajos en los que se han utilizado otros vectores de expresión como el vector pGEX-4T-1 (Benson *et al.*, 1995 y Titolo *et al.*,

2003), o el vector pMAL-c5x (Kantang *et al.*, 2016) para obtener la proteína recombinante E1. Sin embargo los vectores pET que cuentan con el promotor T7, son frecuentemente usados para expresión de proteínas recombinantes, por producir altos niveles de transcripción en *E.coli* (Rosano *et al.*, 2014).

La inducción de la expresión de la proteína se llevó a concentraciones de 0.25, 0.5 y 1mM de IPTG; con IPTG 0.25 mM la expresión fue muy baja, con IPTG 0.5 mM y 1 mM no se observó diferencia en la expresión. Titolo *et al.* en el 2003 expresaron la proteína E1 del VPH 11 utilizando IPTG 1mM, mientras que Kantang *et al.* en el 2016 expresaron la proteína E1 del VPH 16 con IPTG 0.3 mM. Con base a lo anterior, la concentración de IPTG utilizada en este trabajo fue de 0.5 mM.

La fusión de una cola de afinidad a la proteína recombinante de interés permite la purificación de esta por medio de cromatografía de afinidad y este es un método ampliamente usado para la purificación de proteínas. En este trabajo se empleó este método para la purificación de la proteína rE1 usando una resina cobalto-sefarosa. Dependiendo de la cola de afinidad fusionada a la proteína de interés es la resina que se usa, en otros trabajos donde se presentaba el caso se usaron resinas con GST-sefarosa (Benson *et al.*, 1995; Titolo *et al.*, 2003; Schuck *et al.*, 2013) o amilosa-sefarosa (Kantang *et al.*, 2016). Es relevante mencionar que el tamaño pequeño y la carga de la cola de histidinas asegura que raramente afecte la función de la proteína (Bornhorst y Falke, 2000). A pesar que existe la resina de níquel para proteínas fusionadas a una cola de histidinas, la resina de cobalto en comparación se une con más especificidad a esta y las eluye con menor concentración de imidazol (Clontech, 2017).

Con el objetivo de determinar si la proteína rE1 podía unirse a la proteína rE2 (obtenida en otro trabajo de investigación) y a la LCR, se empleó la técnica EMSA, utilizando geles de agarosa al 1%. La técnica EMSA se ha realizado en diversos trabajos para el análisis de interacción entre proteínas y ADN, si bien el protocolo usado generalmente es con geles de poliacrilamida, en estos trabajos usaron para el marcaje del ADN

radioisotopos (Chen *et al.*, 2002; Titolo *et al.*, 2003; Schuck *et al.*, 2013) o bien pueden ser usados compuestos quimioluminiscentes, en ambos casos es un proceso más lento que el usado en este trabajo, donde se usó un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, dicho protocolo también fue reportado en el trabajo realizado por Valdés en el 2015 y Ream *et al.*, en el 2016. En este trabajo la proteína rE1 se usó como proteína de fusión, tal como en los ensayos realizados por de Frattini *et al.*, 1994, donde reportan que la proteína E2 del VPH 31 se asoció eficientemente con la proteína de GST-E1, resultado consistente con observaciones previas con BPV-1 E1 y E2 (Blitz y Laimins, 1991, Lusky y Fontaine, 1991). En la reacción de unión no se observó una interacción entre la proteína E1 y la LCR (relación 3:1) en ausencia de E2, estos resultados concuerdan con los reportados por Sedman *et al.*, en 1997 y Bergvall *et al.*, en el 2013 en donde la interacción de E1 del VPB 1 y LCR mostró una débil afinidad por su sitio de unión en la LCR. Dixon *et al.*, en el 2000, mostraron que la proteína E1 del VPH11 se une con baja especificidad de secuencia a la LCR. Acheson en el 2007 y Pittayakhajonwut en el 2010 comprobaron que la unión de E1 a su sitio en la región LCR depende a su vez, de su acomplejamiento con la proteína viral E2.

En la interacción E1-LCR en presencia de E2 se pudo observar una banda retrasada correspondiente a la interacción (E1-E2-LCR) y otra banda correspondiente a la LCR no unida, de mayor intensidad a la banda de interacción. La concentración de ADN en la reacción de unión en otros trabajos fue variada (Seo *et al.*, 1993) o fija (Titolo *et al.*, 2003) en ambos casos probaron diferentes concentraciones de proteína E1, y reportaron que a mayor concentración de E1, observaban una banda de interacción más intensa, en el caso de Seo *et al.*, en 1993, al bajar la concentración de LCR la interacción no ocurría, pero en ambos casos la banda correspondiente al ADN no unido seguía igual de intensa en las diferentes concentraciones de proteína y ADN, igualmente era más intensa que la banda de interacción, y muy parecida a tamaño con la del control, estos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo.

Otros factores que afectan la interacción ADN-proteínas son el tiempo y la temperatura de incubación de la reacción, así como el voltaje de electroforesis, encontrándose que

a tiempos mayores de 30 min y temperaturas arriba de los 30°C no se observaba interacción, estos resultados concuerdan con los reportados por Chen *et al.*, en 1998 y Titolo *et al.*, en el 2003 donde manejaron tiempos de 20 a 30 min e incubaron a temperatura ambiente. En cuanto al tiempo y voltaje de electroforesis, se observó a 90V/45 min la banda de interacción que, en lo referente en otros trabajos, son condiciones que varían según el tamaño aproximado del complejo Proteína-ADN.

## VIII. CONCLUSIÓN

Con base en los resultados de la secuenciación (mayor a 93% de identidad) del plásmido TOPO-E1 y el peso molecular (71 kDa) en los ensayos electroforéticos SDS-PAGE, la proteína recombinante obtenida es la proteína E1 del VPH16.

El ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) mostró que la interacción de E1 en la LCR requiere de la proteína viral E2.

## IX. PERSPECTIVAS

Se cuenta con la técnica EMSA y con las proteínas recombinantes necesarias para realizar estudios de inhibición de la interacción E1-E2-LCR del VPH16 *in vitro* con el fin de encontrar moléculas líder que puedan ser utilizadas en el desarrollo de un tratamiento contra la infección del VPH16.

## X. REFERENCIAS

**Acheson NH.** 2007. Fundamentals of Molecular Virology. 1a Ed. Winesconsin: John Wiley & Sons Inc. 263-273.

**Beltrán L.** 2014. Aspectos generales sobre la estructura y función de las proteínas codificadas por el virus del Papiloma Humano. Revista CENIC. 2(45) 108-118.

**Benson JD,** Howley PM. 1995. Amino-Terminal Domains of the Bovine Papillomavirus Type 1 E1 and E2 Proteins Participate in Complex Formation. J Virol. 60(7): 4364-4372.

**Bergvall M,** Melendy T, Archambault J. 2013. The E1 proteins. Virology. 445(1-2):35-56.

**Bernard HU,** Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology. 401(1): 70–79.

**Blitz IL,** Laimins LA. 1991. Characterization of human papillomavirus type 11 E1 and E2 proteins expressed in insect cells. J Virol. 65:649-656.

**Bornhorst JA,** Falke JJ. 2000. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. Methods Enzymol.326: 245-254.

**Carrillo A,** Hernández M, Hernández T, Zárata A. 2012. Terapéutica en infección de virus del papiloma humano. Articuló de revisión. Ginecología y Obstetricia de México. 80(11):712-719.

**Castle PE,** Maza M. 2016. Prophylactic HPV vaccination: past, present, and future. Epidemiol. Infect 144(3); 449–468.

**Castro AA**, Pérez FM. 2013. Virus del Papiloma Humano. Rev Med Cos Cen. 70 (606): 211-217.

**Chen G**, Stenlund A. 1998. Characterization of the DNA-binding domain of the bovine papillomavirus replication initiator E1. J Virol. 72(4):2567-2576.

**Chen G**, Stenlund A. 2001. The E1 initiator recognizes multiple overlapping sites in the papillomavirus origin of DNA replication. J Virol. 75(1), 292-302.

**Chen G**, Stenlund A. 2002. Sequential and Ordered Assembly of E1 Initiator Complexes on the Papillomavirus Origin of DNA Replication Generates Progressive Structural Changes Related to Melting. Mol Cell Biol. 22(21): 7712–7720.

**Concha RM**. 2007. Diagnóstico y terapia del virus papiloma humano. Rev Chil Infect. 24 (3): 209-214.

**Crosbie EJ**, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. 2013. Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet. 382(9895):889-899.

**Dixon EP**, Pahel GL, Rocque WJ, Barnes JA, Lobe DC, Hanlon MH, Alexander KA, Chao SF, Lindley K, Phelps WC. 2000. The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. Virology. 270(2):345-357.

**Doorbar J**, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. 2012. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vaccine. 30(5): 55-70.

**Drolet M**, Laprise JF, Boily MC, Franco EL, Brisson M. 2014. Potential cost-effectiveness of the nonavalent human papillomavirus (HPV) vaccine. Int J Cancer. 134(9):2264-2268.

**Egawa N**, Nakahara T, Ohno S, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, Kiyono T. 2012. The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol.* 86(6):3276-8323.

**Enemark EJ**, Chen G, Vaughn DE, Stenlund A, Joshua-Tor L. 2000. Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation protein E1 from papillomavirus. *Mol Cell.* 6(1):149-58.

**Frattini MG**, Laimins LA. 1994. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(26): 12398-12402.

**ICO Information Centre on HPV and Cancer.** 2017. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Disponible en línea en: [www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf](http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf) [Fecha de consulta:20 de Noviembre del 2017].

**INEGI.** 2015. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. Disponible en línea en: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp> [Fecha de consulta: 20 de Noviembre del 2017].

**Kantang W**, Chunsrivirod S, Muangsin N, Poovorawan Y, Krusong K. 2016. Design of peptides as inhibitors of human papillomavirus 16 transcriptional regulator E1-E2. *Chem Biol Drug Des.* 88(4):475-484.

**Kasukawa H**, Howley PM, Benson JD. 1998. A fifteen-amino-acid peptide inhibits human papillomavirus E1-E2 interaction and human papillomavirus DNA replication in vitro. *Journal of Virology,* 72(10):166-173.

**Lehoux M**, Fradet-Turcotte A, Lussier-Price M, Omichinski JG, Archambault J. 2012. Inhibition of human papillomavirus DNA replication by an E1-derived p80/UAF1-binding peptide. *J Virol.* 86(7):3486-500.

**Lizano SM**, Carrillo GA., Contreras PA. 2009a. Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología. *Cancerología.*19(4): 205-216.

**Lizano M**, Berumen J, García-Carrancá A. 2009b. HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. *Arch Med Res.* 40(6):428-434.

**López SA**, Lizano SM. 2006. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*, 1: 31-55.

**Lusky M**, Fontaine E. 1991. Formation of the complex of bovine papillomavirus E1 and E2 proteins is modulated by E2 phosphorylation and depends upon sequences within the carboxyl terminus of E1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 6363-6367.

**Modis Y**, Trus BL, Harrison SC. 2002. Atomic modelo of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* 21(18): 4754–4762.

**Morin G**, Fradet-Turcotte A, Di Lello P, Bergeron-Labrecque F, Omichinski JG, Archambault J. 2011. A conserved amphipathic helix in the N-terminal regulatory region of the papillomavirus E1 helicase is required for efficient viral DNA replication. *J Virol.* 85(11):5287-5300.

**Pang CL**, Thierry F. 2012. Human papillomavirus proteins as prospective therapeutic targets. *Microb Pathog.* 58:55-65.

**Papillomavirus Episteme**, 2014. HPV16 Complete genome. Disponible en línea en: [https://pave.niaid.nih.gov/#explore/reference\\_genomes/human\\_genomes/locus\\_view/](https://pave.niaid.nih.gov/#explore/reference_genomes/human_genomes/locus_view/)

fetch?id=HPV16REF&format=Locus%20view&hasStructure=none [Fecha de consulta: 22 de Abril del 2016].

**Pittayakhajonwut D.** 2010. DNA Replication and Genome Maintenance of Human Papillomavirus Type 16 in Mammalian Cells. ETD collection for University of Nebraska-Lincoln.

**Ream JA,** Lewis LK, Lewis KA. 2016. Rapid agarose gel electrophoretic mobility shift assay for quantitating protein: RNA interactions. *Anal Biochem.* 15(511):36-41.

Rosano GL, Ceccarelli EA. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology.* 5(172): 1-17 Schuck S, Ruse C,

**Riethmuller D,** Jacquard AC, Lacau St Guily J, Aubin F, Carcopino X, Pradat P, Dahlab A, Prétet JL. 2015. Potential impact of a nonavalent HPV vaccine on the occurrence of HPV-related diseases in France. *BMC Public Health.* 15:453.

**Stenlund A.** 2013. CK2 phosphorylation inactivates DNA binding by the papillomavirus E1 and E2 proteins. *J Virol.* 87(13):7668-7679.

**Seo YS,** Müller F, Lusky M, Gibbs E, Kim HY, Phillips B, Hurwitz J. 1993. Bovine Papilloma Virus (BPV)-encoded E2 Protein Enhances Binding of E1 Protein to the BPV Replication Origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:2865-2869.

**Sedman T,** Sedman J, Stenlund A. 1997. Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus. *J Virol.* 71(4):2887-2896.

**Titolo S,** Pelletier A, Pulichino AM, Brault K, Wardrop E, White PW, Cordingley MG, Archambault J. 2000. Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin. *J Virol.* 74(16):7349-7361.

**Titolo S**, Brault K, Majewski J, White PW, Archambault J. 2003. Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus E1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein. *J Virol.* 77(9):5178-5191.

**Valdés RE.** 2015. Estabilización de cápsides virales para su potencial uso como bionanorreactores. Tesis. CICESE.

**Van Doorslaer K.** 2013. Evolution of the papillomaviridae. *Virology.* 445(1-2):11-20.

**Yasugi T**, Benson JD, Sakai H, Vidal M, Howley PM. 1997. Mapping and Characterization of the Interaction Domains of Human Papillomavirus Type 16 E1 and E2 Proteins. *J Virol.* 71(2):891-899.

**Zaldívar LG**, Martín MF, Sosa FC, Ávila MJ, Lloret RM, Román LM, Vega MG. 2012. Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 77(4): 315-321.

**zur Hausen.** 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2(5):342-350.