



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

*EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR V2 DEL GEN  
ST3GAL4 EN QUERATINOCITOS HUMANOS Y EL EFECTO DE LAS  
ONCOPROTEÍNAS E5, E6 Y E7 DEL VPH16*

Tesis que para obtener el título de  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:  
JOSÉ RICARDO MONTERROSAS SANTAMARIA

DIRECTORA  
D. EN C. LORENA MILFLORES FLORES

CO-DIRECTORA  
D. EN C. VERÓNICA VALLEJO RUÍZ



JUNIO 2018

*"Somos una raza avanzada de monos en un planeta menor en una estrella muy promedio. Pero podemos entender el Universo. Eso nos convierte en algo muy especial"*

Stephen Hawking

## **Agradecimientos**

Al Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) por el apoyo otorgado en el proyecto MIFL-NAT17-I

Al proyecto PROMEP como Nuevo Profesor de Tiempo Completo (NPTC) con folio PTC-478, numero de convenio 103.5/16/10420

Al laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Oriente del Instituto Mexicano del Seguro Social.

## Dedicatoria

A mis padres, por haberme brindado todo su cariño, amor, cuidados y por haberme escuchado en todo momento, por su apoyo para mi formación profesional, por enseñarme la importancia del trabajo, la constancia y el esfuerzo, sobre todo a nunca darme por vencido, es mi mayor mérito y no podría haberlo logrado sin todo su respaldo.

A mis hermanos Mariana y Francisco con quienes he compartido méritos y logros, tienen todo mi cariño y gratitud, por darme su apoyo y comprensión, por escucharme y por enseñarme tantas cosas sobre la vida.

A mi tía Rosy quien ha procurado lo mejor para mí y se ha convertido en una segunda mamá para mí, gracias por todo a mi abuelo, Boni quien ha sido un gran ejemplo para mí por inculcarme esa curiosidad por saber y enseñarme los primeros pasos para leer mediante pequeñas palabras en el diccionario y permitirme ser curioso hacía la naturaleza. Mi tío Boni por enseñarme la importancia de prepararme y aprender de todo un poco.

A la Dra. Verónica por haberme permitido estar en su laboratorio, brindarme su confianza y amistad aparte de cientos de enseñanzas y la voluntad de no decaer en momentos difíciles.

A mis mejores amigos Erick gracias por todo y por permitirme ser parte de tu vida, Laura mi mejor amiga y mi confidente, por escucharme y Luis eres mi primer amigo de la prepa y te agradezco todo lo que me has enseñado, ustedes me han proporcionado sus perspectivas, sueños y he crecido mucho como persona desde aquellos días en la prepa.

A mis amigos de la Universidad Saharai Vázquez, Mónica Flores y Adrián Mendoza con quien he compartido cosas increíbles y miles de momentos divertidos, por aprender mucho de ustedes: Claudia Ortiz, Gustavo Arellano, Fernanda Ascencio, Jonatán Reyes, Efraín Atenco, Kenia Tapia, Diego González, Carmen Téllez, Violeta Ortiz *grazie per tutto l' insegnato della vita e anche della scuola*, Estefanía Rodríguez por ser una persona especial en mi vida desde hace muchos años y

Lizbeth Arroyo por compartir etapas muy importantes en mi vida por haberme enseñado muchas cosas y por no dejarme rendir.

A mis nuevas amigas y amigos del CIBIOR por haberme enseñado cientos de cosas, en ese laboratorio aparte de conocimientos se hacen nuevos amigos, a la química Tony, Denisse, Lili, Ile, Rosy, Jocelyn, Arely y Fernando.

A las Doctoras Dalia Molina, Berenice Venegas por las enseñanzas extras, por haber convivido tanto tiempo conmigo y los buenos momentos.

## Resumen

La enzima ST3Gal IV de 333 aminoácidos cataliza la transferencia del ácido siálico a un residuo de galactosa unida mediante un enlace  $\beta$ 1,3 a una N-acetilgalactosamina y es determinante en la síntesis del antígeno Sialyl Lewis X. Esta enzima se encuentra codificada por el gen *ST3GAL 4* que se encuentra en el cromosoma 11q24-25, se sabe que presenta diferentes variantes de RNAm que dan origen a seis isoformas nombradas A1, A2, B1, B2, B3 y Bx que son expresadas por medio de splicing alternativo y por el uso de distintos promotores. Las isoformas del tipo A son encontradas en testículos, ovario y placenta, las isoformas del tipo B en colon y leucemia. Estudios *in silico* realizados por nuestro grupo de trabajo mostraron un cambio en la nomenclatura de las variantes, entre ellas la llamada Bx a la cual nos referiremos como V2. El promotor de la variante V2 fue reportado por primera vez por Colomb (2012) en la línea celular A459 de cáncer de pulmón. Sin embargo, se desconocen los niveles de expresión del promotor V2 en otras líneas celulares, en este caso fue evaluado en la línea celular HaCat en presencia de las oncoproteínas E5, E6 y E7 del Virus del Papiloma Humano tipo 16 que ha sido reportado como el principal agente etiológico del cáncer cervicouterino causante de miles de muerte al año entre la población femenina a nivel mundial.

Se realizaron análisis *in silico* mediante distintos software's que nos permitieron localizar al promotor V2 y los posibles factores de transcripción entre ellos Sp1, CREB, AP-1, Lun 1, TNF $\alpha$  que pudieran regular la actividad del promotor V2 en una línea celular de queratinocitos inmortalizados.

Posteriormente se amplificó y clono un fragmento de 664 pb que fue transfectado a la línea celular HaCat, donde se evaluó la actividad del promotor mediante ensayos de luciferasa.

Finalmente se evaluó si existían cambios en la actividad del promotor V2 en presencia de las oncoproteínas E5, E6 y E7 del VPH16 donde se encontró una regulación negativa en la actividad del promotor al ser evaluado con cada proteína viral concluyendo que este promotor reduce su expresión en presencia de las oncoproteínas virales E5, E6 y E7 del VPH16.

## Índice.

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumen .....                                                                                    | 6  |
| 1. INTRODUCCIÓN.....                                                                             | 9  |
| 1.1 Cáncer Cervicouterino y VPH.....                                                             | 9  |
| 1.2 Oncoproteínas E5, E6 y E7.....                                                               | 10 |
| 2. Glicosilación.....                                                                            | 14 |
| 2.1 Glicosiltransferasas.....                                                                    | 14 |
| 2.2 O-glicosilación .....                                                                        | 15 |
| 2.3 N-glicosilación.....                                                                         | 16 |
| 2.4 Clasificación de las glicosiltransferasas.....                                               | 17 |
| 2.4.1 Clasificación por estructura.....                                                          | 18 |
| 2.4.2 Clasificación por grupo que transfieren.....                                               | 18 |
| 2.5 Sialiltransferasas y ácido sialico.....                                                      | 19 |
| 2.5.1 Clasificación.....                                                                         | 19 |
| 2.5.2 $\alpha$ 2,8 sialiltransferasas.....                                                       | 20 |
| 2.5.3 $\alpha$ 2,6 sialiltransferasas y $\alpha$ 2,6 sialiltransferasas ligadas a<br>GalNAc..... | 20 |
| 2,3 sialiltransferasas.....                                                                      | 21 |
| 3. Antecedentes .....                                                                            | 22 |
| 3.1 Características generales de <i>ST3GAL4</i> .....                                            | 22 |
| 3.2 Isoformas de RNAm .....                                                                      | 22 |
| 3.3 <i>ST3GAL4</i> y cáncer.....                                                                 | 26 |
| 4. Justificación .....                                                                           | 28 |
| 5. Planteamiento del problema .....                                                              | 29 |
| 6. Hipótesis.....                                                                                | 30 |
| 7. Objetivo.....                                                                                 | 31 |
| 7.1 Objetivos específicos.....                                                                   | 31 |
| 8. Metodología .....                                                                             | 32 |
| 8.1 Análisis <i>in silico</i> .....                                                              | 32 |
| 8.2 Descripción del modelo de estudio.....                                                       | 33 |

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 8.3 Mantenimiento de la línea celular.....                               | 33 |
| 8.4 Plásmidos .....                                                      | 34 |
| 8.5 Amplificación del promotor V2.....                                   | 36 |
| 8.6 Obtención del fragmento a amplificar.....                            | 36 |
| 8.7 Clonación .....                                                      | 37 |
| 8.8 Ensayos de transfección .....                                        | 38 |
| 8.9 Metodología transfección .....                                       | 39 |
| 8.10 Evaluación de la actividad de luciferasa.....                       | 40 |
| 8.11 Análisis estadístico .....                                          | 41 |
| 9. Resultados .....                                                      | 42 |
| 9.1 Actividad del promotor V2 en presencia de la oncoproteína<br>E5..... | 49 |
| 9.2 Actividad del promotor V2 en presencia de la oncoproteína<br>E6..... | 50 |
| 9.3 Actividad del promotor V2 en presencia de la oncoproteína<br>E7..... | 51 |
| 10. Discusión.....                                                       | 52 |
| 11. Conclusiones.....                                                    | 57 |
| 12. Bibliografía.....                                                    | 58 |



## 1. Introducción

### 1.1 Cáncer Cervicouterino y VPH

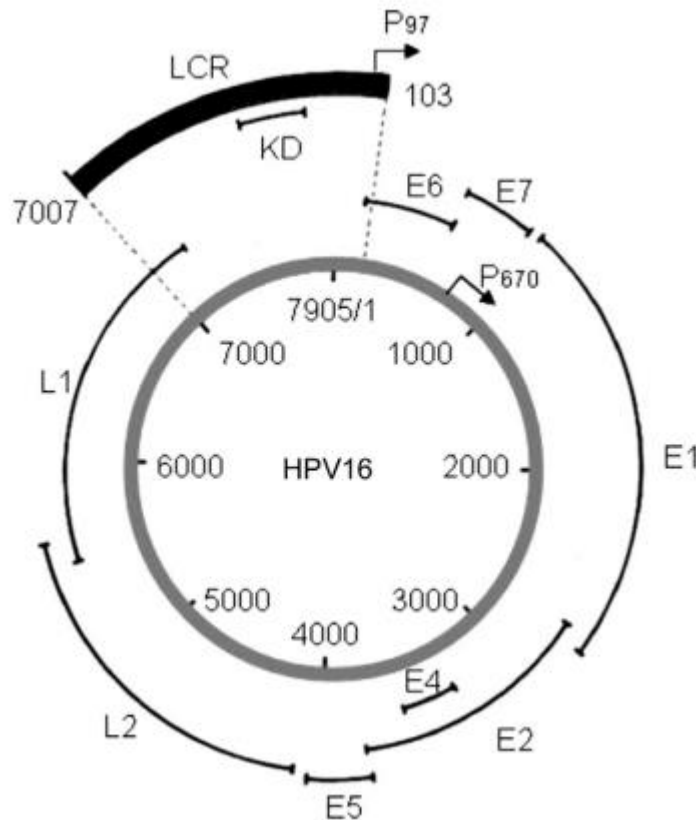
El cáncer cervicouterino (CaCu) es un tumor maligno que inicia en el cuello de la matriz consiste en la proliferación descontrolada de células que cubren el cuello del útero, ya sean las células escamosas en el exocérnix y/o en las células glandulares en el endocérnix (Salud, 2015). Se sabe que es la segunda neoplasia más frecuente entre la población femenina a nivel mundial, especialmente en países en vías de desarrollo con un número aproximado de 260,000 defunciones anualmente. En nuestro país se estimaron un promedio de 4,000 muertes al año (Salud, 2015).

Casi todos, aproximadamente el 99,8% de los casos de cáncer de cuello uterino se deben a tipos específicos del Virus del Papiloma Humano (VPH) (Saavedra y Soberón, 2006).

Los VPH pertenecen a la familia *Papillomaviridae* que se caracterizan por tener una cápside isocaédrica, estos virus son capaces de infectar los epitelios anal, bucal y vaginal de mamíferos. De los cuales se tienen registrados más de 200 agrupados en 16 géneros, entre los cuales destaca el género *Alphapapillomavirus* el cual posee más de 30 miembros, estos se clasifican en virus de bajo riesgo (BR) generalmente asociados a verrugas benignas y de alto riesgo (AR) asociados a cáncer entre los cuales se destacan los tipos VPH16 y VPH18 como los más prevalentes a nivel mundial (Tommasino, 2013, Morshed, *et al.*, 2014, Santos-López, *et al.*, 2015).

El genoma de los VPHs es un ADN circular de doble cadena (**figura 1**) con un tamaño de 8 kb, se puede dividir en 3 regiones diferentes: la región temprana (**Early-E**), tardía (**Late-L**) y la región larga de control Long Control Region (**LCR**). La región temprana está constituida por los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7, donde el producto de los genes E1 y E2 regulan la replicación y la transcripción viral, los genes E5, E6 y E7 codifican proteínas con alto poder oncogénico, la región LCR comprende secuencias promotoras y sitios de iniciación de la replicación del genoma viral (Venegas, *et al.*, 2008). Finalmente la región tardía conformada por los genes

estructurales L1 y L2 que codifican las proteínas que forman la cápside (Venegas *et al.*, 2008).



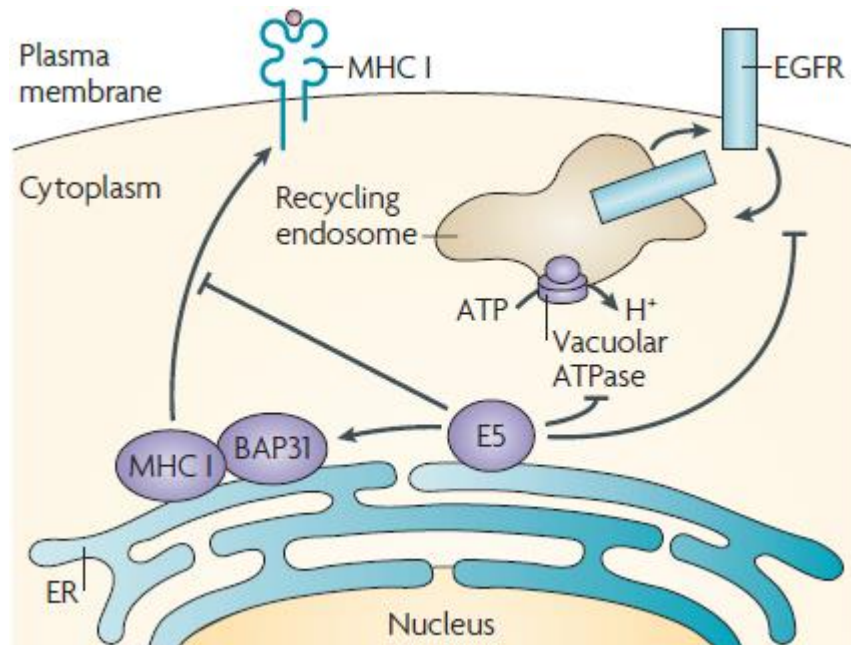
**Figura 1:** Representación esquemática del genoma del Virus del Papiloma Humano, se muestran las regiones, temprana (E), tardía (L) y región larga de control (LCR). Imagen tomada de Tommasino, 2013.

## 1.2. Oncoproteínas E5, E6 y E7

Las proteínas E5, E6 y E7 del VPH 16, tienen un alto potencial oncogénico, participan en la transformación de la célula hospedera, bloqueo de la apoptosis, tumorigénesis y desregulación del ciclo celular (Ardila *et al.*, 2008).

La oncoproteína E5 participa en la evasión de la respuesta inmune por medio de la reducción de la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase 1 (MHC1) su función es evitar el reconocimiento del cluster de diferenciación 8 (Cd8)

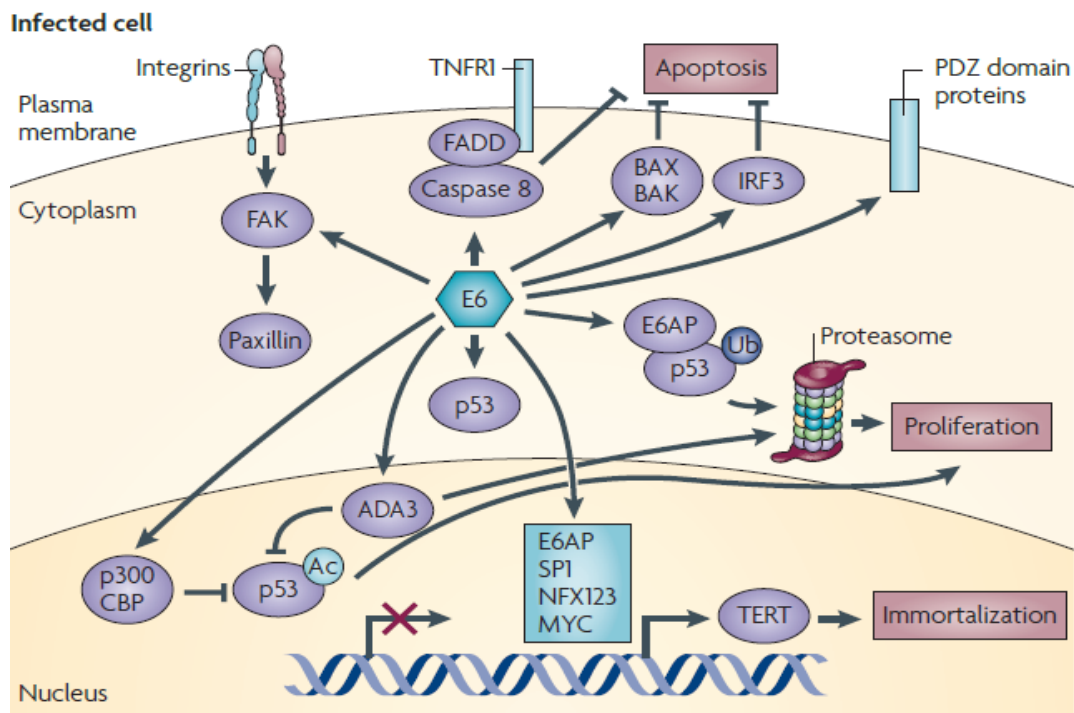
por parte de células T (**figura 2**). E5 Participa en procesos de tumorigenesis y proliferación celular anormal por medio de la activación de la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) lo cual activa a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK); regula el tráfico de proteínas a través de la unión a BAP31 en el retículo endoplásmico (Krawczyk *et al.*, 2008, Moody y Laimins, 2010, Venuti *et al.*, 2011, Müller *et al.*, 2015).



**Figura 2:** Acciones de la oncoproteína E5. Tomado de Moody y Laimins, 2010

La oncoproteína E6 es capaz de formar un dímero con Ubiquitina Ligasa Celular (E6AP) y por medio de ésta degradar a p53 promoviendo la proliferación celular anormal (**figura 3**). La proteína E6 también es capaz de activar el promotor de la telomerasa humana (TERT) a través de E6AP al interactuar con Myc, evitando el acortamiento de los telómeros, lo cual conduce a la célula a la inmortalización (Veldman *et al.*, 2003, Moody y Laimins, 2010, Senba y Mori, 2012).

La oncoproteína E6 tiene la capacidad de unirse a las acetiltransferasas CREB (elemento de respuesta de unión de cAMP), p300 y ADA3 (**figura 3**) esto evita la acetilación de p53 e inhibe la transcripción del gen que codifica para la proteína p53 (Moody y Laimins, 2010). Del mismo modo E6 puede inhibir la apoptosis por medio de la unión al receptor de factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) y la lisis de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak (Moody y Laimins, 2010).

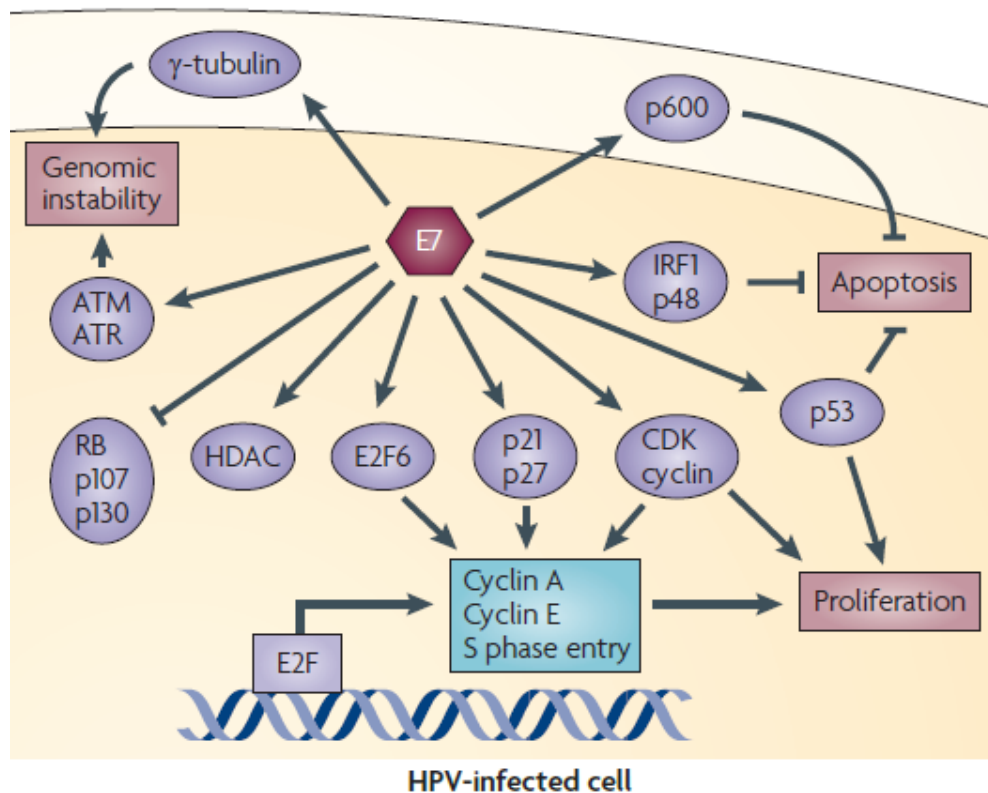


**Figura 3:** Funciones de la oncoproteína viral E6, participando en procesos de inmortalización, proliferación e inhibición de la apoptosis. Tomado de Moody y Laimins, 2010.

La oncoproteína E7 actúa como un regulador transcripcional durante las primeras etapas de la infección por VPH, (**Figura 4**) su función principal es la de unirse a la proteína pRB (retinoblastoma) esto interrumpe los complejos inhibidores de la transcripción por medio de la activación de E2F que regula la progresión del ciclo celular de la fase G2 a S lo cual facilita la inmortalización de la célula (Songock *et al.*, 2016). La oncoproteína E7 degrada a claspina que participa en el control del

ciclo celular durante la fase G2 lo cual induce mitosis en células infectadas y se promueve la replicación viral (Moody y Laimins, 2010).

E7 induce la síntesis anormal del centrómero a través del incremento de cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) y de  $\gamma$ -tubulin. contribuye a alterar la vía ataxia telangiectasia mutado (ATM) y serina-treonina cinasa (ATR) esto contribuye a la inestabilidad genómica (Jonhson *et al.*, 2017).



**Figura 4:** Acciones de la oncoproteína E7, se observa la inhibición de la apoptosis mediante p48/IRF1 entre otras funciones. Tomado de Moody y Laimins, 2010.

Durante los procesos tumorales se ha encontrado un cambio en los patrones de glicosilación debido a que las estructuras glicosiladas presentes en la membrana tienen la capacidad de interactuar con los componentes del microambiente que les rodea, como factores de crecimiento, citocinas, interacciones célula-célula y en

consecuencia se ven alterados los patrones de adhesión, movilidad y migración celular (Reymond *et al.*, 2013).

Estos cambios en los patrones de glicosilación se deben a la combinación de diversos mecanismos como la sobreexpresión o desregulación de genes que participan en vías involucradas en la síntesis de compuestos glicosilados (Carvalho *et al.*, 2016).

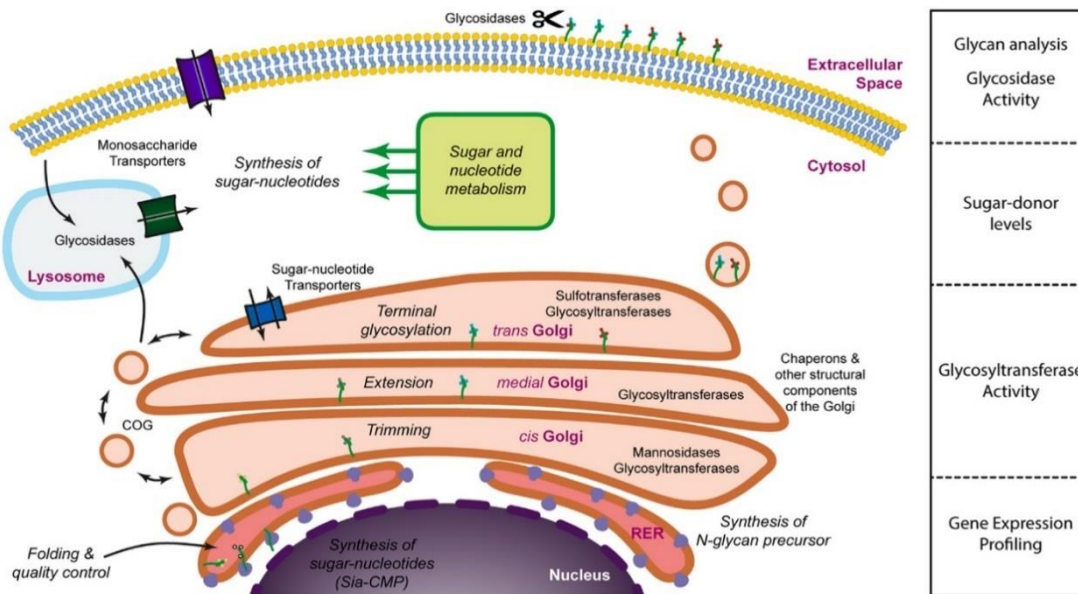
## 2. Glicosilación

Dentro del genoma de *Homo sapiens* existen aproximadamente 25,000 genes los cuales expresan distintas proteínas que cumplen distintas funciones, éstas proteínas sufren de cambios llamados modificaciones postraduccionales en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi previo a ser enviadas a distintos compartimentos celulares y extracelulares (Nussbaum, McInnes y Willard, 2007, Cooper, 2014).

Una de las modificaciones postraduccionales más importantes es la glicosilación, se calcula que más del 50% de las proteínas son glicosiladas (Julenius, 2005, Chang, 2015).

La glicosilación consiste en la adición de moléculas específicas como polisacáridos, oligosacáridos o monosacáridos a proteínas, lípidos u otros carbohidratos por medio de enzimas llamadas glicosiltransferasas (Blom *et al.*, 2004). Las proteínas glicosiladas participan en procesos de adhesión, solubilidad, sistema inmune, e interacciones célula-célula (Moremen *et al.*, 2012).

En la **figura 5** se muestra un esquema general del proceso de glicosilación, donde se observan los compartimentos subcelulares que participan en este proceso y las enzimas que participan en el mismo (Kooyk *et al.*, 2013).



**Figura 5:** Esquema general, donde se muestra el proceso de glicosilación. Tomada de Kooyk *et al.*, 2013.

## 2.1 Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas son un grupo de enzimas agrupadas en familias que utilizan un azúcar donante activado que es transferido a posiciones terminales no reducidas de carbohidratos que pueden estar unidos covalentemente a un lípido, proteína o incluso a un carbohidrato, formando enlaces glicosídicos (Lairson, 2008).

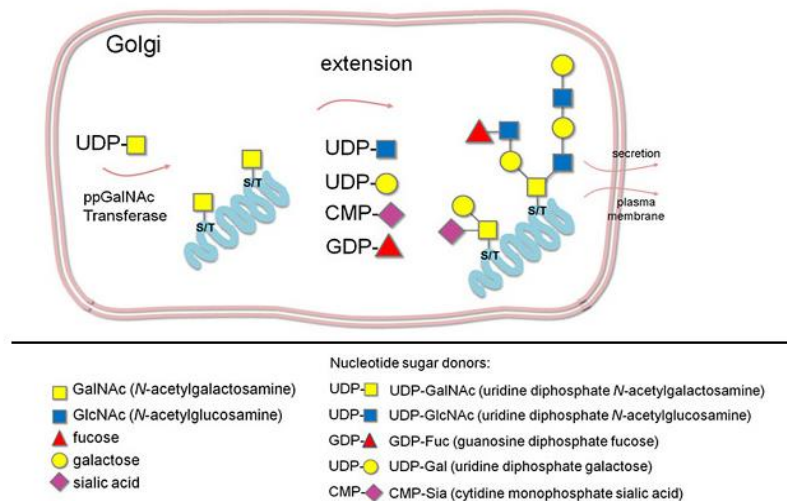
Los procesos de glicosilación generan diferentes tipos de gliconjugados que están clasificados en varios tipos sin embargo los principales son los N-glicanos y los O-glicanos, su clasificación es de acuerdo al tipo de enlace que se realiza (Ohtsubo y Marth, 2006).

### 2.1.1 O-Glicosilación

Durante el proceso de O-glicosilación una N-acetilgalactosamina (GalNAc) es unida covalentemente a residuo de serina o treonina en una secuencia consenso Ser/Thr-O, esta transferencia se realiza en el extremo hidroxilo del aminoácido del polipéptido naciente (Jiménez-Martínez *et al.*, 2012).

La O-glicosilación ocurre en el aparato de Golgi, (**Figura 6**) por la acción de glicosiltransferasas que van a transferir galactosa, fucosa, ácido siálico u otros azúcares provenientes de distintos sustratos donantes a las proteínas, lo que les confiere actividad biológica y solubilidad (Werner, 2007).

Ejemplo de proteínas O-glicosiladas son las mucinas, éstas proteínas se localizan en las membranas celulares , participan en la lubricación, resistencia a patógenos, procesos inflamatorios y defensa frente daños físicos y químicos (Gill *et al.*, 2011).



**Figura 6:** O-glicosilación en el aparato de Golgi donde se unen diferentes azúcares apartir de diferentes donantes formado estructuras O-glicosiladas (Werner, 2007).

### 2.1.3 N-glicosilación

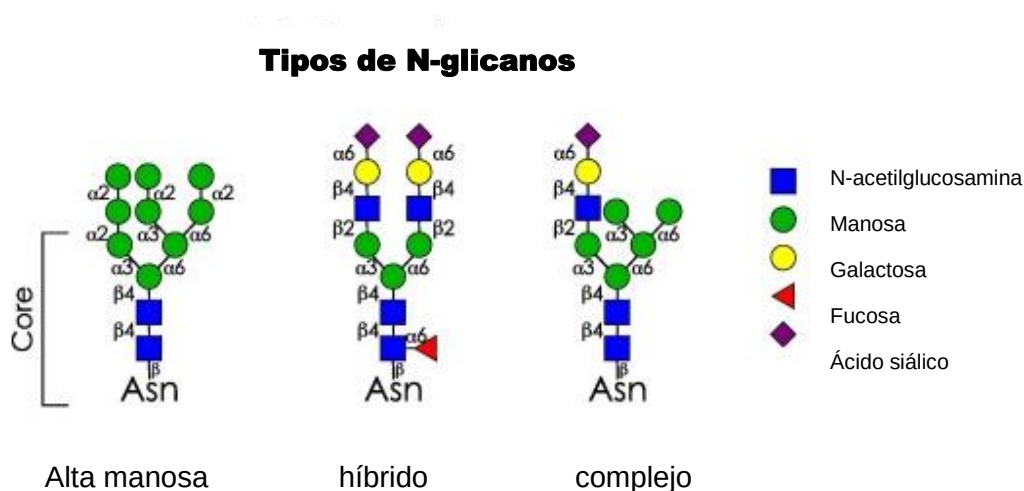
Consiste en una cadena de oligosacáridos unida de forma covalente a un residuo amino terminal de una asparagina dentro de una secuencia consenso: Asn X-Ser/Thr, donde la letra X representa cualquier aminoácido excepto prolina, el oligosacarido inicia con N-acetilglucosamina (GlcNAc), (Martínez *et al.*, 2012).

Los pasos iniciales ocurren en el lumen del reticulo endoplasmico (RE) donde se encuentra un lípido que ha sido translocado desde el citoplasma llamado dolicol fosfato unido a un oligosacárido de 14 azúcares (dos N-acetilglucosaminas, nueve



manosas y tres glucosas), donde la enzima oligosacariltransferasa (OST) se encarga de la transferencia del oligosacárido al polipéptido naciente en la secuencia consenso mencionada anteriormente (Freeze y Aebi, 2005; Aebi, 2009, Aebi, 2013).

Posteriormente tras la eliminación de tres glucosas y una manosa el polipéptido pasa al aparato de Golgi a un proceso llamado glicosilación terminal donde los glicanos presentan de 8-10 manosas, de las cuales son 5 manosas retiradas de su estructura por manosidasas quedando una estructura o core que recibe ácido siálico, fucosa u otros azúcares dependiendo del proceso de glicosilación terminal que tendrá y la enzima encargada de la reacción (Lodish *et al.*, 2002, Stanley, 2011) quedan como resultado glicanos (**Figura 7**) de tipo alta manosa, híbridos o complejos (Schulz, 2009).



**Figura 7:** Tipos de N-glicanos de acuerdo a su estructura y las principales moléculas que se adicionan a cada tipo. Tomado de Higuel *et al.*, 2015.

### 2.3.4 Clasificación de las glicosiltransferasas

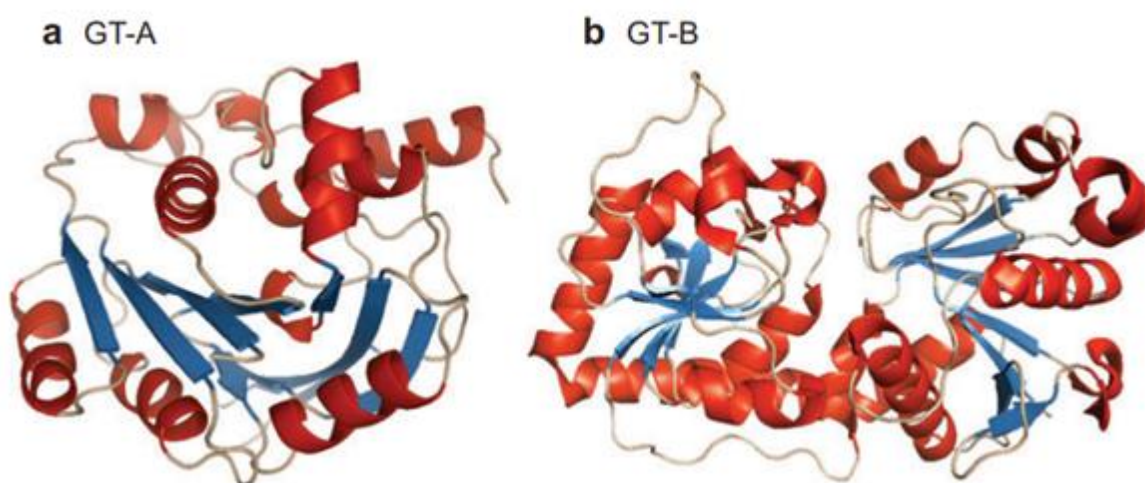
Las glicosiltransferasas que participan en los procesos de síntesis de N u O glicanos han sido clasificadas mediante su estructura o tipo de monosacárido que transfieren, se han descrito más de 12,000 enzimas en diferentes organismos, las cuáles se han agrupado en 78 familias (Breton, 2006).

### 2.3.4 Clasificación por estructura

Las glicosiltransferasas han sido clasificadas en dos grupos GT-A y GT-B de acuerdo a la estructura y similitud en su secuencia de aminoácidos (**figura 8**), dentro del grupo GT-A se encuentran aquellas que tienen una hoja  $\beta$  abierta rodeada por  $\alpha$  hélices en ambos lados, conocido como pliegue Rossmann y aquellas GT-B que consisten de dominios  $\beta/\alpha/\beta$  similares a los de tipo Rossmann, sin embargo, estos están menos estrechamente asociados (Rose *et al.*, 2004, Lairson *et al.*, 2008).

### 2.3.4 Clasificación por grupo que transfieren

Las glicosiltransferasas han sido clasificadas de acuerdo por el grupo funcional o monosacárido que transfieren, teniendo que las sialiltransferasas participan en la transferencia de ácido siálico, las fucosiltransferasas de fucosa, las galactosiltransferasas de galactosa a distintos grupos aceptores (Rini *et al.*, 2009).



**Figura 8:** Ejemplos de glicosiltransferasas del tipo GT-A representada por SpsA de *Bacillus subtilis* y del lado derecho una glicosiltransferasa del bacteriófago T4, representando una del tipo GT-B. Tomada de Lairson *et al.*, 2008.

## 2.4 Sialiltransferasas y ácido siálico

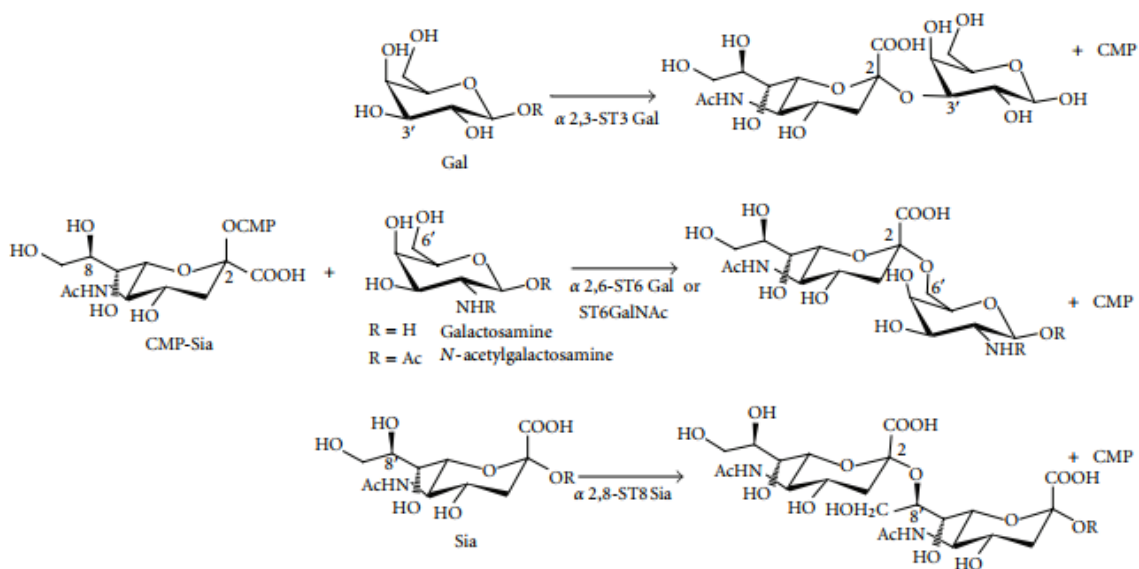
Las sialiltransferasas son una de las 78 familias de glicotransferasas, siendo catalogada como GT29 de tipo estructural GT-B, catalizan la transferencia de residuos de ácido siálico de un donante Citidin Monofosfato unido a ácido siálico (CMP- $\beta$ Neu5Ac) al grupo hidroxilo de un aceptor Gal (Galactosa), GlcNAc (N-Acetilglucosamina), GalNAc (N-Acetilgalactosamina) de los gliconjugados, pudiendo ser lípidos o proteínas (Ressa y Linhardt, 2004).

El ácido siálico forma parte familia de monosacáridos que comprende alrededor de 40 miembros derivados del ácido neuramínico (5-amino-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulsónico), que presentan diferentes sustituyentes en el grupo amino o hidroxilo (Schauer, 1982). Se encuentra sobreexpresado en procesos como cáncer, asociado a procesos inflamatorios y respuesta inmune, entre otros (Varki y Vark, 2007).

El ácido siálico está constituido de manera general por una estructura de 9 carbonos y son componentes de grandes cadenas de oligosacáridos, proteínas y lípidos en posiciones terminales, lo cual les confiere importancia biológica (Wang y Brand-Miller, 2003; Varki, 2007).

### 2.4 Clasificación

La familia de las sialiltransferasas comprende a 20 miembros que se clasifican de acuerdo al tipo de enlace que realizan y el sustrato aceptor que reconocen (**figura 9**) (Harduin-Lepers *et al.*, 2001, Martinez-Duncker *et al.*, 2011).



**Figura 9:** Tipos de sialiltransferasas  $\alpha 2,3$ ,  $\alpha 2,6$ , y  $\alpha 2,8$  y el tipo de enlace que realizan. Tomado de Martínez-Duncker *et al.*, 2011.

#### 2.4.2 Subfamilia $\alpha 2,8$ sialiltransferasas

La subfamilia  $\alpha 2,8$ -sialiltransferasas contiene 6 miembros (ST8SIA I-VI) catalizan la síntesis de GD3 (Neu5Ac $\alpha 2$ -8Neu5Ac $\alpha 2$ -3Gal $\beta 1$ -4Glc $\beta 1$ -O-Cer) estas estructuras participan procesos de crecimiento y adhesión celular, forman parte de los ganglios cerebrales y son parte importante de los procesos del sistema nervioso (Sasaki, 1994, Teinturier-Lelièvre *et al.*, 2005).

#### 2.4.3 Subfamilia $\alpha 2,6$ sialiltransferasas y $\alpha 2,6$ sialiltransferasas ligadas a GalNAc

Dentro de esta subfamilia se encuentra la ST6Gal I que realiza la transferencia de un residuo de ácido siálico a un residuo terminal de galactosa unido a una N-acetil glucosamina (Gal $\beta 1$ -4GlcNAc) formando un enlace  $\alpha 2,6$ , ésta estructura se encuentra en diferentes oligosacáridos ya sean de tipo N u O glicosilados (Weinstein *et al.*, 1987, Harduin-Lepers *et al.*, 2001).

ST6GalNAc I, II y IV son tres miembros de ésta subfamilia, catalizan la formación de enlaces  $\alpha 2,6$  en residuos de GalNAc. Los miembros ST6GalNAc III, V y VI catalizan la adición de ácido siálico en gangliósidos (Lee *et al.*, 1999, Rao *et al.*, 2009., Antony, 2014).

#### 2.4.4 Subfamilia $\alpha 2,3$ sialiltransferasas

La subfamilia  $\alpha 2-3$  sialiltransferasa presenta 6 miembros: ST3GalI-ST3GalVI, (**Tabla 1**) que han sido encontrados en diferentes tejidos como placenta, ovario, testículos, pulmón entre otros, catalizan la transferencia de ácido siálico a un residuo terminal de galactosa en una cadena de oligosacáridos Gal $\beta 1-3$ GalNAc (Sasaki *et al.*, 1993, Harduin-Lepers *et al.*, 2001).

| Nomenclatura      | Nombre de la enzima                                                                       |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ST3Gal I</b>   | CMP-N-acetilneuramina-<br>$\beta$ -galactosamida- $\alpha 2,3$ -<br>sialiltransferasa 1   |
| <b>ST3Gal II</b>  | CMP-N-<br>acetilneuramina— $\beta$<br>galactosamida- $\alpha$ 2,3-<br>sialiltransferasa 2 |
| <b>ST3Gal III</b> | ST3 $\beta$ -galactosil $\alpha 2,3$ -<br>sialiltransferasa 3                             |
| <b>ST3Gal IV</b>  | ST3 $\beta$ -galactosil $\alpha 2,3$ -<br>sialiltransferasa 4                             |
| <b>ST3Gal V</b>   | ST3 $\beta$ -galactosil $\alpha 2,3$ -<br>sialiltransferasa 5                             |
| <b>ST3Gal VI</b>  | ST3 $\beta$ -galactosil $\alpha 2,3$ -<br>sialiltransferasa 6                             |

### 3. Antecedentes

#### 3.1 Características generales de *ST3GAL4*

El gen *ST3GAL4* ( $\beta$ -galactosil alfa-2,3-sialiltransferasa 4) pertenece a la subfamilia  $\alpha$ 2,3 sialiltransferasa, se encuentra en el cromosoma 11 de la región q24-25 con un tamaño aproximado de 85kb se sabe que presenta 14 exones (Kitagawa y Paulson, 1993).

La proteína ST3GAL IV de 333 aminoácidos (**figura 10**) cataliza la transferencia del ácido siálico a un residuo de galactosa unida mediante un enlace  $\beta$ 1,3 a una N-acetilgalactosamina (Kitagawa y Paulson, 1993, Schnaar, 2014, Schnaar, 2014). Se sabe que participa en la síntesis del antígeno Sialyl Lewis x importante en procesos del sistema inmune (Zeng *et al.*,1999).



**Figura 10:** Estructura de la proteína ST3Gal IV diseñado con The Protein Model Portal.

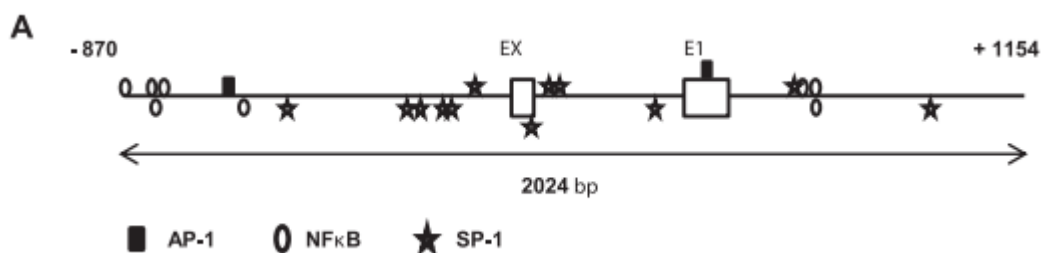
#### 3.2 Isoformas de ARNm del gen *ST3GAL4*

Se han realizado estudios sobre la regulación transcripcional de este gen encontrando que produce transcritos nombrados A1, A2, Bx, B1, B2, B3 y B4 diferentes entre sí y cuya expresión es de tipo tejido específico (Kitagawa *et al.*,

1996). Se sabe que los ARNm de las isoformas del tipo B están expresadas en células de leucemia y tejido epitelial, mientras que los ARNm de las isoformas tipo A se encuentran en placenta, ovario y testículos (Gassen *et al.*, 1998, Taniguchi *et al.*, 2001, Taniguchi *et al.*, 2003).

Al realizar estudios *in silico* sobre los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la regulación transcripcional de este gen, se encontró la carencia de cajas TATA y cajas CCAAT propias de promotores clásicos, sugiriendo que para su regulación se ocupan varios promotores y el mecanismo de *splicing* alternativo (Taniguchi, 1998).

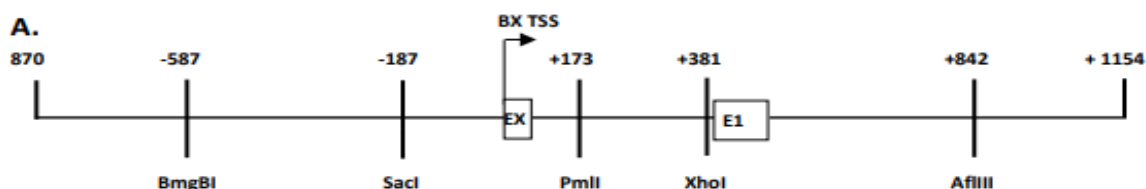
Estudios realizados *in silico* del exón Bx mostraron la presencia de una posible secuencia promotora de 2,024 pb y sus posibles elementos de respuesta a factores de transcripción que podrían regular su actividad como Sp1, Myc, TNF $\alpha$  (**Figura 11**) esta región fue amplificada, clonada y transfectada en la línea celular A459 (cáncer de pulmón) obteniendo actividad (Colomb *et al.*, 2012).



**Figura 11:** Representación esquemática del fragmento de 2024pb (Colomb *et al.* 2012), se muestran los posibles sitios de unión a factores de transcripción que regulan la actividad del promotor Bx.

El promotor de la variante Bx fue recortado mediante múltiples cortes a la secuencia de 2024pb (**figura 12**) tratando de caracterizar el comportamiento del mismo en la línea celular A459. Estos fragmentos fueron evaluados mediante transfecciones, donde se concluye que el fragmento nombrado -870/+173 de 1,043 pb presenta una mayor actividad respecto a la construcción de 2,024 pb, lo cual sugiere que el

promotor para esta variante podría encontrarse en esta región amplificada (Colomb *et al.*, 2016).



**Figura 12:** Se muestra la secuencia de 2,024 pb de Colomb y los distintos sitios donde reconocen las enzimas de restricción utilizadas para hacer las distintas versiones de su construcción. Tomado de Colomb *et al.*, 2016.

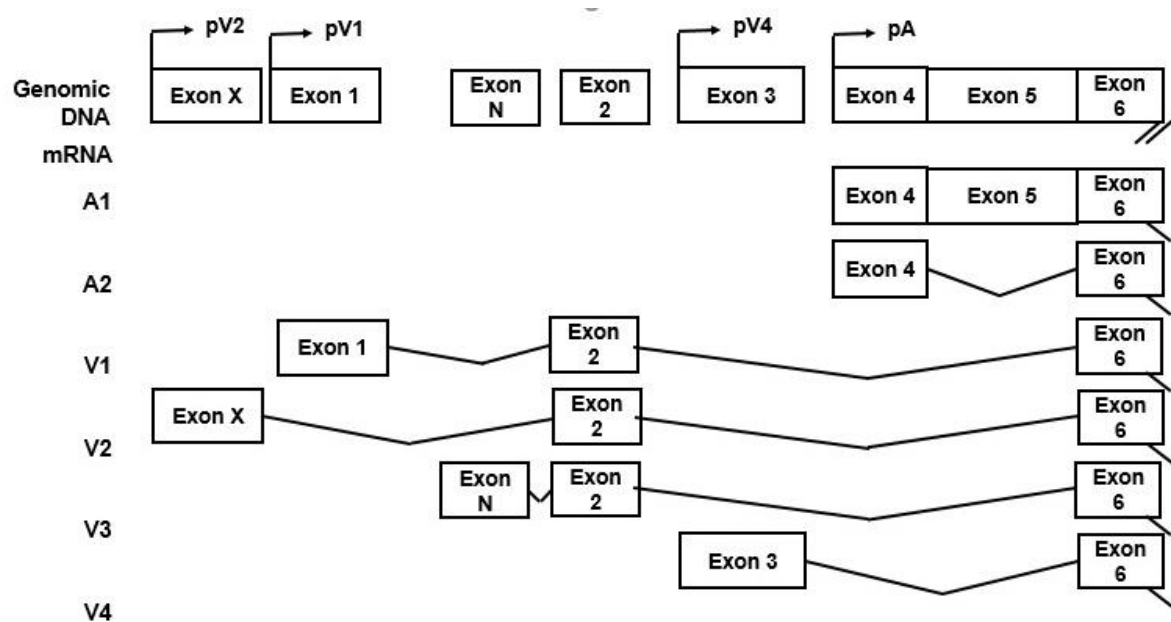
Posteriormente en nuestro grupo de trabajo se realizaron alineamientos entre las variantes de ARNm reportadas con las que se encuentran en la base de datos del *GenBank* (**Tabla 2**) donde se observó que las isoformas hasta entonces reportadas fueron renombradas de acuerdo a una nueva nomenclatura (donde se pasaron de llamarse B a llamarse V), y al analizar las secuencias se encontró que la isoforma B1 corresponde a la variante V1, Bx a la V2, B3 a la V4 mientras que la isoforma B2 no se encontró y finalmente se reporta la isoforma V3 que no había sido reportada (Roa-de la Cruz *et al.*, 2018).

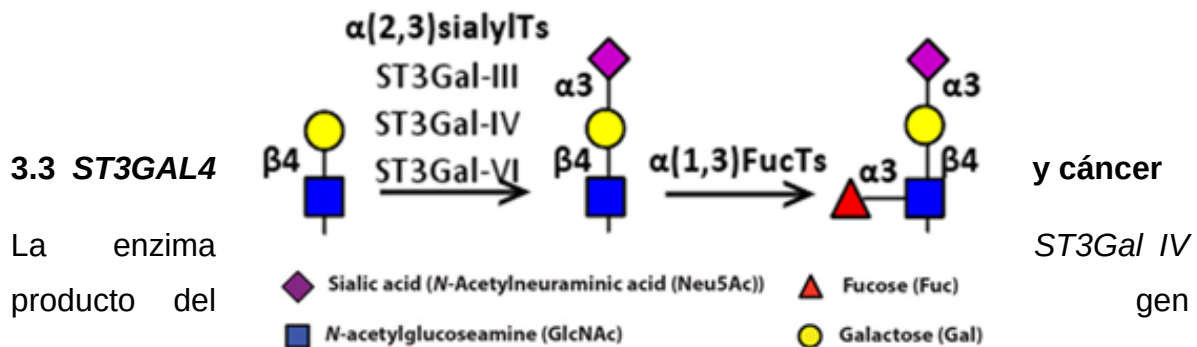
La identificación del promotor de la variante V3 fue reportada por Ortiz-Mateos, 2017, la actividad del promotor fue evaluada en la línea celular atumoral de queratinocitos inmortalizados llamada HaCat mostrando una actividad alta en comparación con otros promotores descritos de sialiltransferasas, demostrando la existencia de un promotor que no había sido descrito (**Figura13**).



**Tabla 2: Nomenclatura de las variantes reportadas por el NCBI y su correspondencia con las reportadas por Kitagawa hasta mayo de 2017.**

| Nomenclatura actual de las variantes del RNAm | Isoformas tipo B reportadas por Kitagawa | Tamaño del transcrito | Isoforma proteica y número de acceso |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| V1<br>NM_006278                               | B1                                       | 2053 b                | Isoforma 1<br>NP_006269              |
| V2<br>NM_001254757                            | BX                                       | 1854 b                | Isoforma 2<br>NP_001241686           |
| V3<br>NM_001254758                            | -                                        | 1727 b                | Isoforma 2<br>NP_001241687           |
| V4<br>NM_001254759                            | B3                                       | 1871 b                | Isoforma 3<br>NP_001241688           |
| -                                             | B2                                       | -                     | -                                    |





**Figura 14:** Representación esquemática de la síntesis del antígeno Sialyl Lewis x en la que participan diferentes sialiltransferasas. Tomado de Mondal *et al.*, 2012

*ST3GAL4* (**figura 14**) participa en la síntesis del antígeno Sialyl Lewis X (Zeng *et al.*, 1999).

El antígeno Sialyl Lewis X se ha reportado sobreexpresado en varios tipos de cáncer, y se ha sugerido que puede ser usado como un biomarcador en pruebas diagnósticas de metástasis y progresión de la enfermedad (Velázquez-Marquez, *et al.*, 2012, Trinchera, *et al.* 2017).

En el cáncer de colon y gástrico se ha detectado una sobreexpresión del antígeno Sialyl Lewis X asociada a metástasis y un diagnóstico reservado (Gomes *et al.*, 2013). Y se ha reportado un nivel elevado de ARNm de *ST3GAL4* en neoplasias cervicales intraepiteliales respecto a tejido sano (López-Morales *et al.*, 2009), sin embargo en cáncer de ovario se encontraron disminuidos los niveles del ARNm de esta sialiltransferasa (Wang *et al.*, 2005).

En cáncer colorectal se ha encontrado una disminución del transcrito de *ST3GAL4* en tejidos de pacientes en comparación a tejido sano (Petretti *et al.*, 2000).

#### **4. Justificación**

La expresión transcripcional del gen *ST3GAL4* ha sido reportada en diferentes tipos de tejidos, se sabe que presenta diferentes niveles de expresión debido al uso de distintos promotores y del mecanismo de splicing alternativo, algunos de estos promotores han sido descritos y evaluados en distintos tipos celulares, sin embargo se desconoce la actividad transcripcional del promotor V2, en modelos diferentes

de células, es por eso que este trabajo se enfocará en evaluar la actividad transcripcional del promotor V2 en una línea celular atumoral de queratinocitos inmortalizados.

El gen *ST3GAL4* produce a la proteína *ST3Gal IV* que ha sido reportada alterada en distintos tipos de cáncer, entre ellos cáncer cérvico-uterino, sin embargo, se desconoce si las oncoproteínas del VPH pudieran ejercer algún efecto sobre la regulación transcripcional de este gen.

## **5. Planteamiento del problema**

Se desconoce la actividad del promotor V2 del gen *ST3GAL4* en distintos tipos celulares humanos, en específico este trabajo abordará el estudio del nivel de expresión del promotor V2 en la línea celular HaCat.

Del mismo modo se conoce el papel de las oncoproteínas tumorales E5, E6 y E7 del VPH 16 durante el proceso de transformación maligna, sin embargo se

desconoce el papel que puedan desempeñar al ser evaluadas junto al promotor V2 del gen *ST3GAL4* en la línea celular HaCat. Por lo que nos surgen las siguientes preguntas:

- ¿Cuál es la actividad que presenta la región promotora para la variante V2 en la línea celular HaCat?
- ¿Las oncoproteínas E5, E6 y E7 del VPH 16 modifican la actividad de este promotor?

## **6. Hipótesis**

El promotor V2 de 664 pb en el gen *ST3GAL4* tendrá actividad transcripcional al ser evaluado en la línea celular de queratinocitos inmortalizados llamada HaCat.

Las oncoproteínas virales E5, E6 y E7 del VPH16 incrementan la actividad transcripcional del promotor V2 del gen *ST3GAL4* al ser evaluadas en la línea celular HaCat.

## **7. Objetivo general**

- Evaluar la actividad del promotor V2 del gen *ST3GAL4* y el efecto de las oncoproteínas E5, E6 y E7 del VPH tipo 16 en la línea celular HaCat.

## **7.1 Objetivos específicos**

- Identificar los posibles sitios de unión de factores de transcripción en el promotor de la variante V2 del gen *ST3GAL4* por ensayos *in silico*
- Evaluar la actividad transcripcional del promotor V2 del gen *ST3GAL4* en la línea celular HaCat
- Analizar la actividad del promotor V2 del gen *ST3GAL4* en presencia de las oncoproteínas E5, E6 y E7 del VPH tipo 16 en la línea celular HaCat.

## **8. Metodología**

### **8.1 Análisis *in silico***

Se realizó un análisis *in silico* buscando la secuencia del gen *ST3GAL4* de *H. sapiens* para ello se utilizaron distintas herramientas bioinformáticas que nos permitieran tener un panorama completo de este gen.

El programa *Ensembl*© (disponible en: <https://www.ensembl.org/index.html>) fue ocupado para descargar la secuencia completa del gen en un formato FASTA compatible con Microsoft Word™. Para comprobar la secuencia del gen se tomó un fragmento de la secuencia y se corroboró en el programa BLAST® (disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para la búsqueda de promotores dentro de la secuencia del gen se recurrieron a dos programas que presentan una matriz de datos experimentales y provenientes de análisis bioinformáticos, el primero fue *TRED Transcriptional Regulatory Element Database* que identifica elementos reguladores cis y trans, es de fácil acceso y permite el análisis de datos para estudios de un solo gen y genoma a escala (<https://cb.utdallas.edu/cgi-bin/TRED/tred.cgi?process=searchPromForm>).

El programa *EPD Eukaryotic Promoter Database* fue utilizado para la búsqueda de secuencias que tienen características de promotores, este software se describe como una colección de promotores eucariotas derivados de distintos artículos proporcionando una base de datos confiable sobre la diversidad de especies que maneja el programa, se encuentra disponible en <http://epd.vital-it.ch/index.php>.

Posterior a la búsqueda del promotor, se procedió a la búsqueda de posibles factores de transcripción que reconocieran la secuencia, para ello se utilizó el programa TRANSFAC™ el cual se encuentra disponible en: <http://gene-regulation.com/pub/programs.html#pmatch>.

Se generó una lista de los posibles factores de transcripción y se buscaron otros elementos que se encuentran en las regiones promotoras de genes eucariotas como cajas TATA, la cual tiene como secuencia consenso TATAa/tAa/t y sitios INR (secuencias iniciadoras de la transcripción) con una secuencia consenso



YYANa/tYY donde Y es Timina/Citosina y N cualquier nucleótido (Martínez-Trujillo *et al.*, 2004, Mejía-Guerra y Lareo, 2006).

Utilizando el programa *FastPCR* se diseñaron los oligonucleótidos que fueron utilizados para realizar la clonación (**tabla 2**).

## 8.2 Descripción modelo de estudio

La línea celular HaCaT, es una línea que viene de queratinocitos humanos que

| Tabla 2 : Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del promotor V2 |    |                             |                       |
|----------------------------------------------------------------------------|----|-----------------------------|-----------------------|
| Nombre del oligonucleótido                                                 | Pb | Secuencia                   | Enzima de restricción |
| V2-2ST3Gal4D                                                               | 27 | GTATGCAAGTGAGGGGTACCGAGAGAG | <i>Kpn</i> I          |
| V2-cST3Gal4R                                                               | 19 | GATCCGCTAGCCGCACCGA         | <i>Nhe</i> I          |

**Tabla 2:** Se muestran los oligonucleótidos diseñados y el sitio de corte de la enzima de restricción.

resultaron inmortalizados espontáneamente mediante su incubación a una alta temperatura y una baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio de cultivo, provienen de un individuo caucásico de 62 años, tienen una alta tasa de proliferación y fenotipo parecido al normal debido a que son atumorales, lo cual las convierte en un modelo optimo para evaluar la actividad transcripcional de nuestro promotor, y del efecto que ejercen las oncoproteínas E5, E6 y E7 del VPH 16 sobre la actividad del mismo debido a que el resultado de este estudio no se verá influido por variables externas (Boukamp *et al.*, 1988).

## 8.3 Mantenimiento de la línea celular

La línea celular HaCat fue crecida en monocapa utilizando el medio de cultivo DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium*) con un contenido alto en glucosa 13.4

g/L y este suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% y con antibiótico (10,000 U de penicilina, 10mg estreptomicina y 25µg/ml de anfotericina como antifúngico).

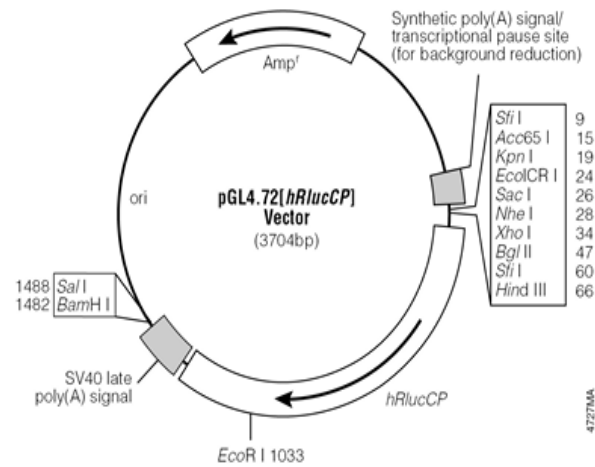
La línea celular fue mantenida, dando tres lavados suaves con PBS 1X y se retiró el medio cada tercer día y fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> manteniéndolas en óptimas condiciones.

#### 8.4 Plásmidos

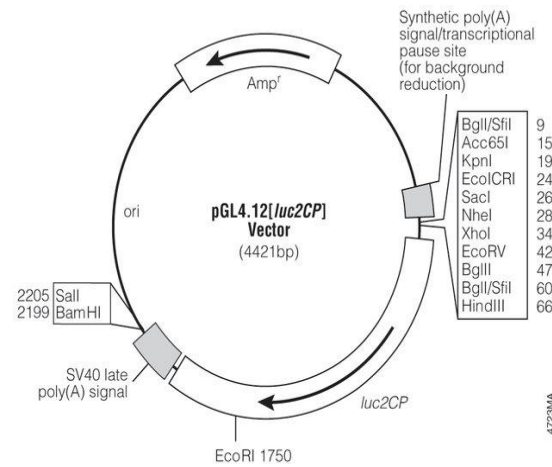
Se ocuparon los plásmidos pGL4.12 y pGL4.72 (**Figuras 15 y 16**), el plásmido pGL4.72 ocupado como control interno, mientras que el plásmido pGL4.12 utilizado como vector de clonación y como cepa receptora a *Escherichia coli* Top10 Shot 1 a partir de una transformación por choque térmico por cloruro de calcio y extraído mediante la metodología de lisis alcalina.

El plásmido pGL4.12 utilizado como vector de clonación presenta las siguientes características que incluyen gen reportero para luciferasa de *Photinus pyralis* y un gen de resistencia a ampicilina. El plásmido que contiene pGL4.72 utilizado como control interno contiene un promotor débil (pGL4.72) y el gen reportero de luciferasa de *Renilla reniformis*, cuenta con un gen de resistencia a ampicilina.

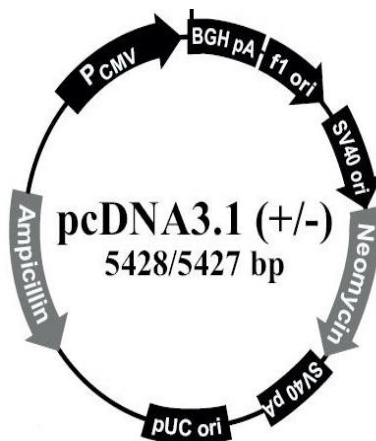
El plásmido pcDNA3.1 (**figura 17**) fue utilizado como vector de expresión para las oncoproteínas E5, E6 y E7 del VPH16, contiene un promotor de citomegalovirus el cual genera una alta expresión del fragmento insertado. Los nombres de los plásmidos son pcDNA 3.1 E5, pcDNA 3.1 E6 y pcDNA 3.1 E7 y ya se contaba con ellos en el laboratorio de Biología Molecular del CIBIOR, IMSS.



**Figura 15:** Representación esquemática del plásmido pGL4.72.



**Figura 16:** Representación esquemática del plásmido pGL4.12.



**Figura 17:** Representación esquemática del plásmido pcDNA3.1.

## 8.5 Amplificación del promotor $\nu 2$

El DNA genómico de *H. sapiens* se obtuvo de sangre de un individuo usando el kit *Quick-gDNA™ Miniprep* de la marca Zymo Research siguiendo el protocolo de la casa comercial (ver anexo).

### 8.6 Obtención del fragmento a clonar

Utilizando el termociclador UNO II de Biometra se diseñó el programa de amplificación del fragmento de 664 pb.

95°C por 5 minutos

|                   |   |           |
|-------------------|---|-----------|
| 95°C por 1 minuto | } | 40 ciclos |
| 48°C por 1 minuto |   |           |
| 72°C por 1 minuto |   |           |

72°C por 10 minutos

La reacción de amplificación contenía lo siguiente:

5 µl Master Mix Thermo Fischer

1 µl oligonucleótido delantero (concentración 10mM)

1 µl oligonucleótido reverso (concentración 10mM)

1 µl DNA templado (concentración 47.5 ng/ µl)

2 µl Agua desionizada estéril

Se realizó un gel de agarosa al 0.8% para observar el producto de PCR utilizando agarosa marca Pronadisa con TBE 0.5x y teñido con 1 µl de Midori Green Advance DNA Stain de Nippon Genetics™ se corrió la electroforesis por 45 minutos a 100V. Posteriormente el gel fue visualizado y se extrajo la banda de interés mediante el kit *Zymoclean Gel DNA recovery kit* de Zymo Reserach según las instrucciones del proveedor (anexos).

### 8.7 Clonación

Posteriormente se realizó una restricción del inserto de 664pb y del vector pGL4.12 utilizando el buffer correspondiente y la enzima *Kpn* I de la marca *Thermo Scientific* en una reacción ajustada 20 µl con agua durante tres horas a una temperatura de 37°C, pasado el tiempo de incubación se precipitó toda la noche a -20°C con 2.5µl de acetato de sodio 3M, isopropanol absoluto y agua destilada estéril.

Posteriormente se centrifugaron los tubos del vector e inserto por 15 minutos a 12,000 rpm, después se dio un lavado con etanol al 70% se dejó secar, para después re-suspenderlo en agua. Se agregó la enzima *Nhe* I con su respectivo buffer de la marca *Thermo Scientific* y se dejó la reacción a 37°C por 3 horas.

Se purificó tanto el vector como inserto en un gel de agarosa, para cortar después las bandas deseadas y purificarlas mediante el kit *Zymoclean Gel DNA recovery kit* de Zymo Reserach.

La ligación se realizó utilizando *T4 DNA Ligase* de la marca *Thermo Scientific* siguiendo las indicaciones del fabricante, manteniendo una relación 3:1 favor el inserto (considerando el tamaño del vector e inserto), se dejó incubar a 22°C (extremos cohesivos) por tres horas y a 4°C toda la noche.

Después del periodo de incubación se realizó la transformación por choque térmico del plásmido denominado pGL4.664V2 en bacterias competentes *E. coli* cepa one shot Top10 por cloruro de calcio (Anexos), posteriormente se incubaron toda la noche a 37°C en placa de LB con ampicilina (100mg/ml).

Al día siguiente se seleccionaron algunas UFC (Unidades Formadoras de Colonias) y fueron sembradas en 5ml de medio LB suplementado con ampicilina, incubándolas toda la noche para realizar un miniprep por medio del kit *Zyppy™ Plasmid Miniprep* de *Zymo Reseach* siguiendo las instrucciones del proveedor (anexos).

Finalmente se comprobó la clona pGL4.664V2 por medio de una restricción con las enzimas *Bam*H I y *Bgl* II de *Thermo Scientific* en un volumen ajustado a 10µl por 3 horas de restricción a 37°C.

Una vez que se comprobó la clona se procedió a realizar una extracción de plásmido a gran escala conocida como Maxiprep, para ello se sembraron las bacterias en 500 ml de medio LB suplementado con ampicilina, utilizando el kit *Nucleobond Purification Xtra Maxi Plus* con la finalidad de extraer una gran cantidad de plásmido y con un alto grado de pureza necesario para la transfección.

## 8.8 Ensayos de transfección

Se realizaron transfecciones de plásmido en la línea celular HaCat para ello utilizamos 600 nanogramos (ng) de la construcción pGL4.664V2 junto con 20 ng del plásmido pGL4.72 como control interno para evaluar la actividad del promotor V2 (**Tabla 3**).

Para evaluar la actividad de las oncoproteínas E5, E6 y E7 del VPH16 sobre el promotor se co-transfectaron 600 ng de los plásmidos pcDNA E5, pcDNA E6 y pcDNA E7, por separado junto a la construcción pGL4.664V2 y 20 ng del control interno (**Tabla 4**).

| Tabla 3: Condiciones transfección            |                                    |
|----------------------------------------------|------------------------------------|
| 1) Evaluación para la actividad del promotor | pGL4.72 20 ng<br>pGL4.664V2 600 ng |
| 2) Control negativo                          | pGL4.72 20 ng<br>pGL4.12 600 ng    |

**Tabla 4: Condiciones de co-transfección para evaluar el efecto de las oncoproteínas E5, E6 y E7 sobre el promotor pGL4.664V2**

|                     |                                                             |
|---------------------|-------------------------------------------------------------|
| 1) Control negativo | pGL4.72 20 ng<br>pGL4.664V2 600 ng<br>pcDNA negativo 600 ng |
| 2) E5               | pGL4.72 20 ng<br>pGL4.664V2 600 ng<br>pcDNA E5 600 ng       |
| 3) E6               | pGL4.72 20 ng<br>pGL4.664V2 600 ng<br>pcDNA E6 600 ng       |
| 4) E7               | pGL4.72 20 ng<br>pGL4.664V2 600 ng<br>pcDNA E7 600 ng       |

### 8.9 Metodología de la transfección

Se ocupó la línea celular HaCat para ello se sembraron 110,000 células por pozo en placas de 24 pozos cada uno con 500µl de medio DMEM sin antibiótico y con 10% Suero Fetal bovino (SFB) a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> que se incubaron por 24 horas.

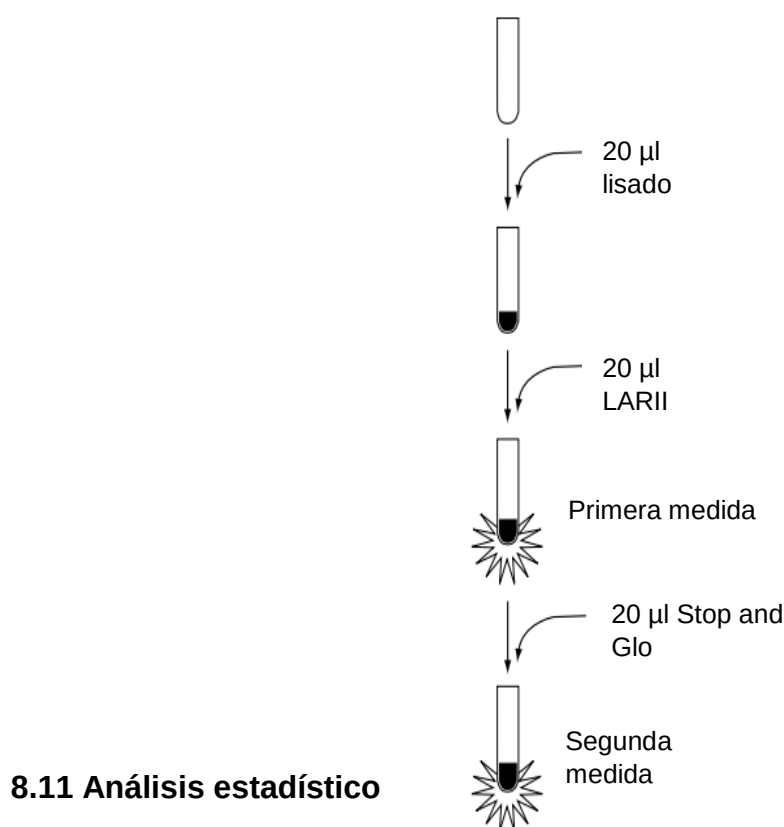
Pasadas las 24 horas en condiciones de esterilidad se retiró el medio DMEM y se dieron tres lavados suaves con la solución PBS 1x para proceder a agregar 400 µl de medio DMEM sin SFB e incubar para posteriormente agregar por goteo suave y bien distribuido 100µl de la mezcla plásmido-lipofectamina (formada a partir de un complejo plásmido-DMEM sin SFB en un volumen de 50µl y de otro DMEM sin SFB con 2µl de *Lipofectamina 2000* de *Invitrogen* en un volumen final de 50µl).

Pasadas 6 horas se retiró la lipofectamina y se dieron tres lavados suaves con solución PBS 1x para posteriormente agregar 500 µl de medio DMEM con SFB 10% y antibiótico y se dejó incubar a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 8.10 Evaluación de la actividad de la luciferasa

Pasadas 12 h desde el cambio de medio después de la transfección se midió la actividad de la luciferasa por medio del kit Dual-Luciferase® de la marca Promega para ello se procedió a hacer el lisado de las células utilizando el buffer PLB (Passive Lysis Buffer) del mismo kit en un volumen de 100  $\mu$ l con agitación por 2 horas en la incubadora orbital a temperatura ambiente para posteriormente tomar 20  $\mu$ l del lisado.

Posteriormente se ocupó el luminómetro *Glomax 20/20* para medir de forma secuencial la actividad de la luciferasa primero se agregaron al lisado 20  $\mu$ l del buffer Lar II para medir la actividad de la luciferasa de luciérnaga (*P. pyralis*) y obtener una primera lectura, posteriormente se agregaron 20  $\mu$ l de Stop & Glo que inactiva la primera reacción y posee el sustrato para la luciferasa de *R. reniformis*, obteniendo una segunda lectura (**Figura 18**).



### 8.11 Análisis estadístico

**Figura 18:** La metodología simplificada del ensayo de luciferasa. Tomado de Promega 2018.



Se utilizó el programa Graphpad Prism 7.04™ para realizar pruebas de T de student entre los distintos grupos con un índice de confianza del 95% para evaluar la actividad de los valores obtenidos de luciferasa. Los valores de luciferasa se normalizaron mediante el cociente de la actividad de luciferasa de luciérnaga entre la actividad de luciferasa de *Renilla* contenida en el plásmido control pGL4.72.

## **9. Resultados: Análisis *in silico***

El análisis *in silico* con los programas EPD y TRED utilizando los programas EPD y TRED muestra una región promotora del gen *ST3GAL4*, la cual muestra al promotor V2 (en rosa) en el esquema se ubican los oligonucleótidos de la región a amplificar (señalados en verde). Se tomó como sitio +1 donde Colomb y colaboradores lo identificaron por bioinformática. El análisis de los sitios INR, cajas GC, sitios DPE, entre otros elementos de respuesta que se encuentran en promotores clásicos mostró la existencia de 3 cajas GC, un elemento INR y un sitio TBP señalados en la secuencia, cabe señalar que no se logró identificar caja TATA (**Figura 19**).

```

GGATGCCTGGGTCCAAAGAACCAGGGTCAGGGGCCCAGGGGTTTCTTCCTGGAGACAGGATGCCTGGCGCCTT
CAATAACGGAAAGGAAACTGAGAACTTTCTGAGGCCAAGATAAAGAGTATGCAAGTGAGGGGTGCAGAGAGA
GCAGTTTAGGGGCAGCAGGCCCAACCGAAGCAGAGGAAGGGCCACGTCTGGGCCAGGGGACTGACTGGCT
GCCTTGCGTGCATGGGGCACGGGAAGCATAGGCTCCCGGAACAGGACCCTGCCCCAGTTTCCCCAGTGAGGGA
AGGACACCGTTCCCCGTGGGATAGAGCACTGCACCCTTTCTTGATTCTCATTTGTTCCCGGGAGCGAGCGCCTT
GGCTGCGCTGGGCATACCCACCCTGGCGCCATTACAGGCAGTGCCTGCCCTGGCCCTGTGCTCACCCCATCA
GGCCTCCTCTTCCGCCTCTCTGGCACCCACGGCGCCCTGCTTGCTCTGTCCGGGTCTCGGAGGCGCGAACA
CCATCCCAAGCCTGCGACCGCGCGGCATCACCCCCGCCCTTCCCCCTCCTCCACCCCGCCCTTTCTACCCCTC
CCGGGAGCTCCTGGGAGTCGGGCGCGCGTGTGCGCAAGCGTGTCCAGCCCCTTCCCCGCCCCCAACCCGGGCC
CGGGTCCCCGCTCCCCTGCAGGCGGACTCGCCCCGCTCCCAGGCCGACCCGCGCCCGGGACAGGGACCCGGC
CGAGTCGAGCCGTCGCGCCAGCGCTGCGCCGCGGTCGGTGCGCCTAGCGGATCGGAGCTGCGCGCGGAACCG
TGCTGCCCCGCCCCGCTCCACCCGTGAGGGTGAGTACGCGGCGGCGGTGCGCGGGGGCCCGCGGGGCGGGGCG
GCCAGAAGGCTGGGAGTGTAGGCAGTGTTCGGGTGCCAGCTGTGCCCTGTCTGACCTCATGGCCACCCACAA
GCTGGCACCCCCACAGGCCTCTTGGGGAAGCCTGTACTTTCCACCGCCGAGGCGGGTACCGCGTGGAAGC

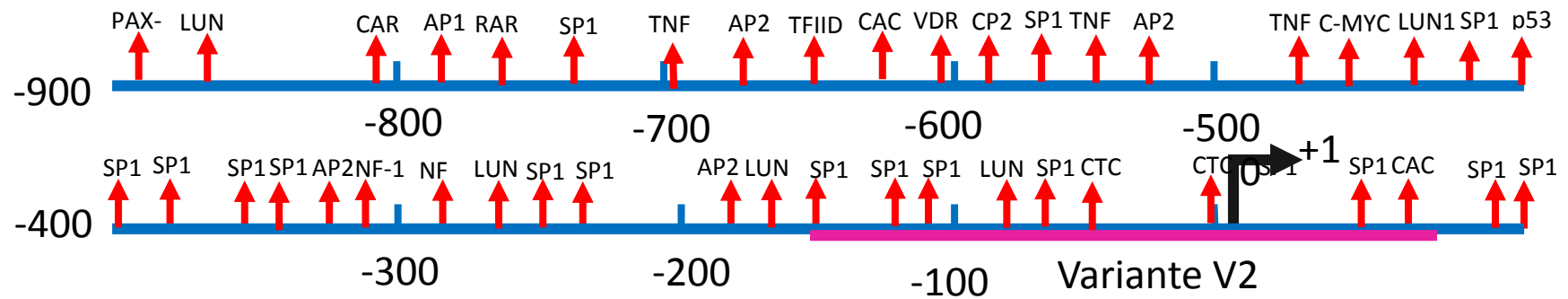
```

**Figura 19:** secuencia analizada del gen *ST3GAL4*, se muestran promotor V2 (rosa), sitios INR en rojo y 3 cajas GC (amarillo) el posible +1 se muestra en azul. La región clonada se encuentra remarcada entre los espacios en verde.

El análisis con el programa TRANSFAC mostró más de 150 sitios de unión para factores de transcripción de vertebrados de los cuales se descartaron de forma

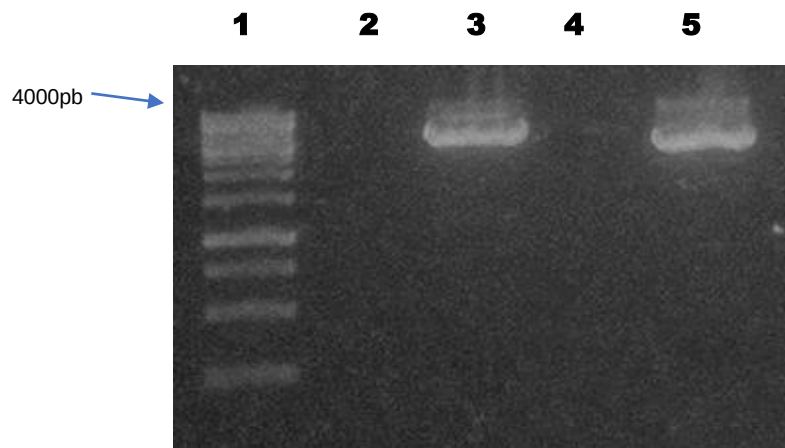
manual todos aquellos que no fueran de humanos y aquellos que no cumplieran con el 100% de coincidencia con la secuencia del promotor.

Posteriormente se revisaron los factores de transcripción para realizar un esquema en el que se incluyeron aquellos posibles factores de transcripción que presentan un número de incidencias alto en la secuencia, aquellos que se ha demostrado experimentalmente regulan a otros genes como SP1, ATF-2, RAR, LUN-1, VDR y también se incluyeron aquellos que Colomb *et, al* 2012 reporta en sus estudios que pueden regular el promotor de la variante Bx como TNF $\alpha$ .



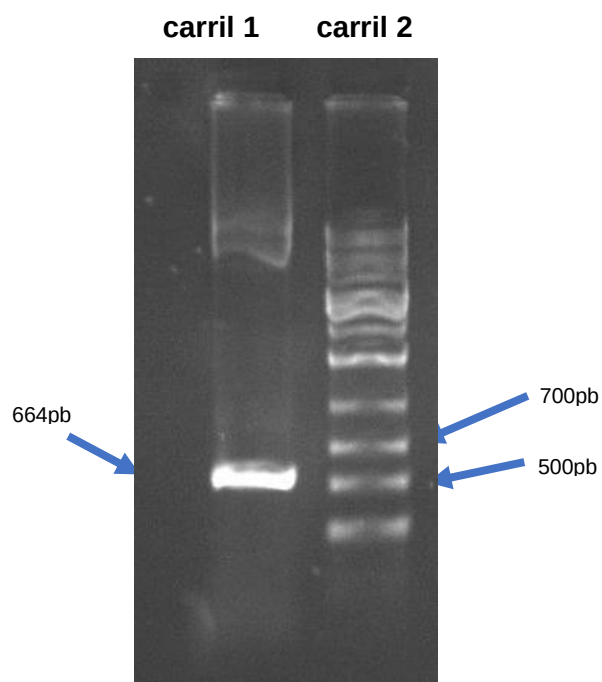
**Figura 20:** Se muestra el fragmento clonado y los distintos factores de transcripción que reconocen la secuencia de DNA correspondiente al promotor de la variante V2. Los oligonucleótidos señalados son el fragmento amplificado.

Se realizó una restricción de los plásmidos que fueron utilizados como vector de clonación pGL4.12 (4,421 pb) en el carril 3 y el plásmido pGL4.72 (3,704pb) como control interno, carril número 5, en ambos se utilizó la enzima *Hind* III para linealizarlos (**Figura 20**).

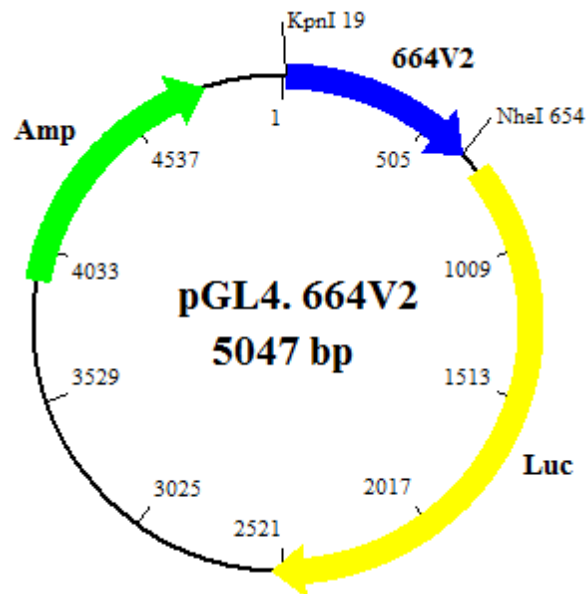


**Figura 20:** Plásmidos pGL4.12 y pGL4.72 linealizados con la enzima *Hind* III

La **Figura 21** presenta el carril 1 donde se observa un producto correspondiente al posible promotor de la variante V2 del gen *ST3GAL4* de 664pb y en el carril 6 se observa el marcador de peso molecular de 1 Kb *Axygen*.

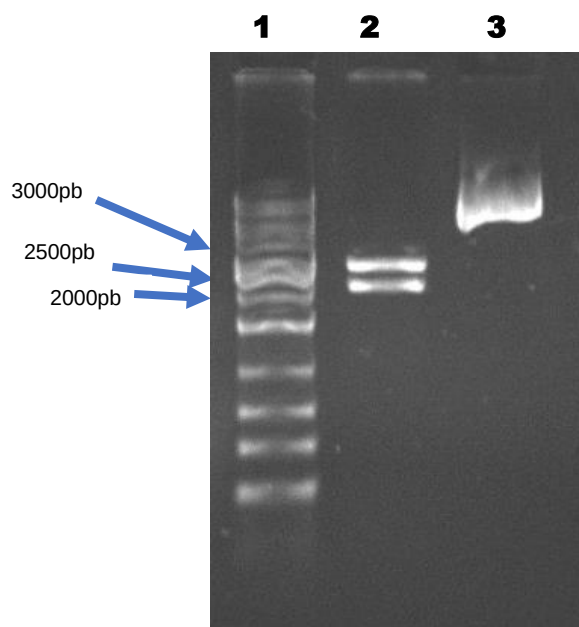


**Figura 21:** PCR del inserto de 664 bp correspondiente al promotor V2 del gen *ST3GAL4*.



**Figura 22:** Esquema del plásmido pGL4.12 con el inserto de 664 pb correspondiente al promotor de la variante V2.

Posteriormente se realizó la restricción de la posible clona con las enzimas *Bgl* II y *Bam*H I (**figura 23**). En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de 1kb de Axygen. En el carril 2 la clona cortada con las enzimas mencionadas de las cuales se obtuvieron dos fragmentos de 2,152pb y de 2,895pb que coinciden con lo esperado y finalmente en el carril 3 tenemos nuestra clona de 5,047 pb sin cortar utilizada como control.



**Figura 23:** Restricción del plásmido que contiene el fragmento de 664pb que corresponde al promotor V2. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular de 1 kb de Axygen, en el carril dos se observa la posible clona cortada y en el carril tres la clona sin cortar.

Después de la comprobación de la clona, se realizó un Maxiprep con el kit *Nucleobond Purification Xtra Maxi Plus* para obtener el plásmido con mayor pureza para los ensayos de transfección (**Tabla 5**).

**Tabla 5: Concentración del maxiprep obtenida de la construcción pGL4.664V2**

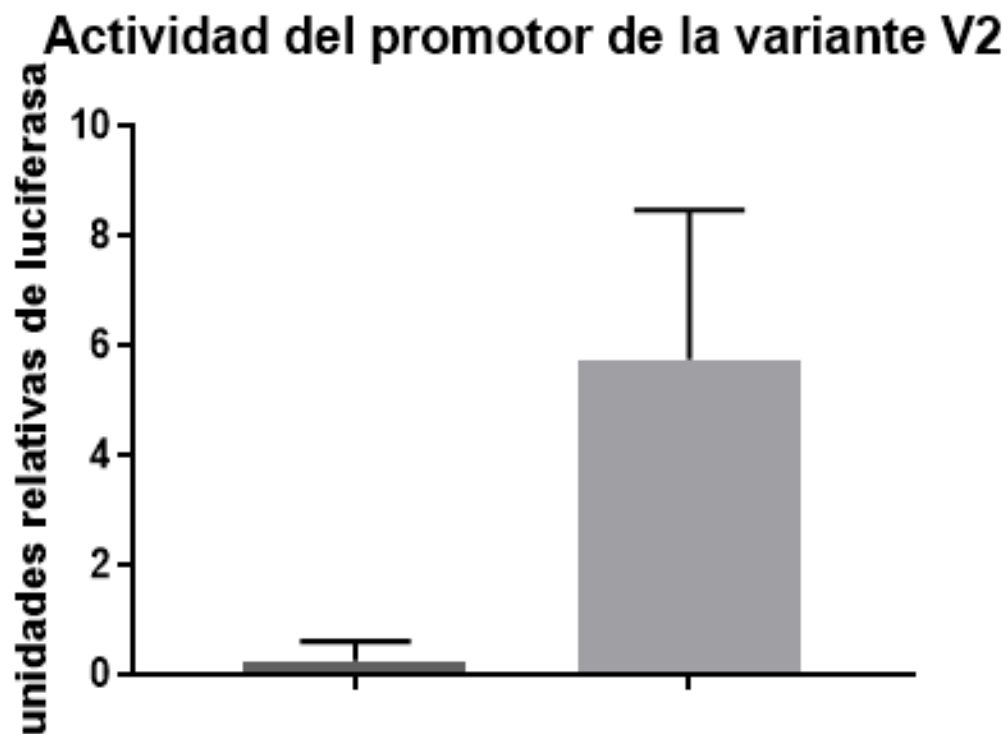
| Plásmido   | Concentración | A260/A280 | A230/A280 |
|------------|---------------|-----------|-----------|
| pGL4.664V2 | 4825          | 1.771     | 2.130     |
| pGL4.664V2 | 2028          | 1.810     | 2.140     |
| pGL4.664V2 | 1900          | 1.814     | 2.117     |



### 9.1 Actividad del promotor V2

En la **gráfica 1** se presenta el promedio de la actividad normalizada que tiene el promotor V2 en comparación con las actividades promedio del plásmido control pGL4.12 en la línea celular HaCat. En la tabla 6 se muestra la actividad de cada construcción.

| Tabla 6: Promedio de la actividad transcripcional del promotor V2 |                 |            |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------|------------|
| Numero de ensayo                                                  | Control pGL4.12 | pGL4.664V2 |
| 1                                                                 |                 | 4.1398     |
|                                                                   |                 | 9.6636     |
|                                                                   |                 | 8.8242     |
| 2                                                                 |                 | 4.1398     |
|                                                                   |                 | 3.7021     |
|                                                                   |                 | 4.0596     |



**Figura 25:** Promedio de la actividad reportada en dos ensayos del promotor V2

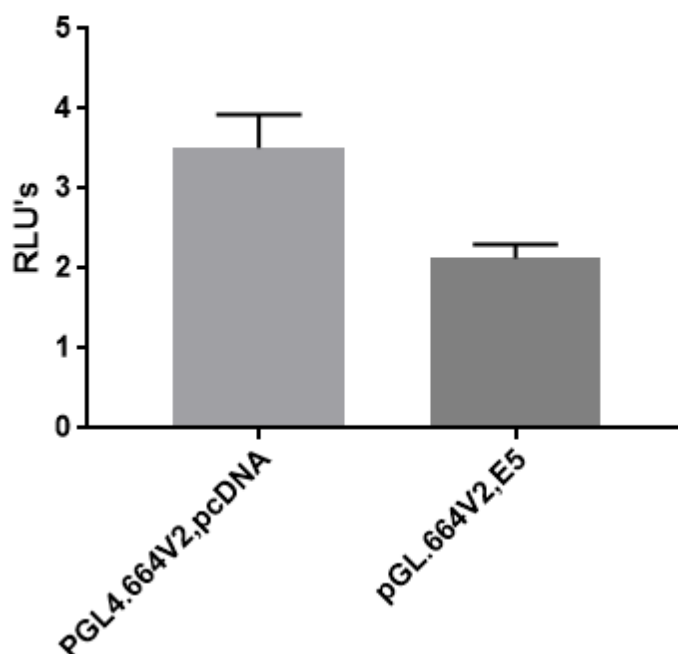
## 9.2 Actividad del promotor V2 en presencia de la Oncoproteína E5

En la **tabla 7** se muestra la actividad de la luciferasa normalizada de la clona pGL4.664V2 correspondiente al promotor de la variante V2 del gen *ST3GAL4* co-transfectado con la oncoproteína E5 del VPH16. La **gráfica 2** muestra la actividad normalizada de ambas construcciones en la línea celular HaCat. Para el análisis estadístico se utilizó una T de student con un valor de  $p < 0.05$ , y se obtuvo un valor de  $p = 0.0016$  al evaluar ambas construcciones, se observa una disminución de la actividad del promotor V2 en un 50% en presencia de la oncoproteína E5 del VPH16.

**Tabla 7: Actividad transcripcional del promotor V2 (pGL4.664V2) y co-transfectado con la oncoproteína E5**

| Numero de ensayo | pGL4.664V2 | pcDNA E5 |
|------------------|------------|----------|
| 1                | 4.1899     | 3.181    |
|                  | 3.4886     | 2.0458   |
|                  | 3.0919     | 2.7589   |
| 2                | 3.7550     | 2.3355   |

**Actividad del promotor V2 en presencia de la oncoproteína E5**



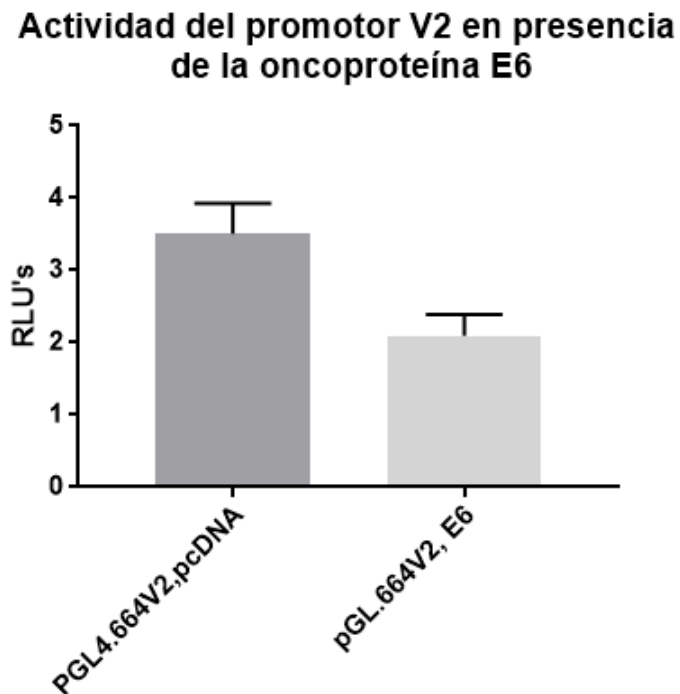
**Figura 25:** Promedio de la actividad normalizada del promotor V2 co-transfectado junto con pcDNA E5 del VPH 16. Se obtuvo una  $p=0.0016$

### 9.3 Actividad del promotor V2 en presencia de la oncoproteína E6

Se co-transfectó el promotor V2 con pcDNA E6 del VPH16, en la **tabla 8** se muestran las actividades normalizadas de la actividad de luciferasa de los ensayos realizados, se realizó una t de student de muestras independientes con una  $p<0.05$ , obteniendo un valor de  $p=0.0001$ . La **gráfica 3** muestra la actividad de ambas

construcciones, donde se observa una disminución del 50% de la actividad del promotor V2 en presencia de la oncoproteína E6 del VPH16.

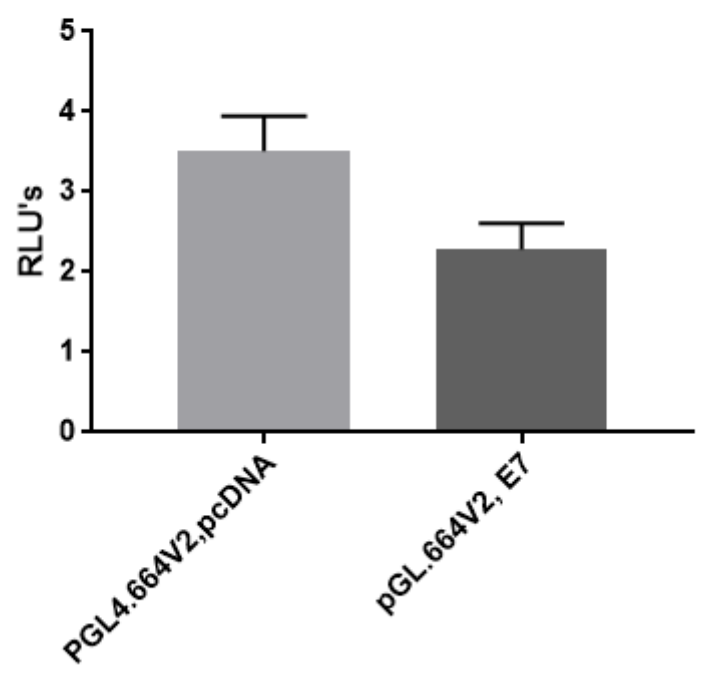
| Tabla 8: Actividad transcripcional del promotor V2 (pGL4.664V2) y co-transfectado con la oncoproteína E6 |            |          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------|
| Numero de ensayo                                                                                         | pGL4.664V2 | pcDNA E6 |
| 1                                                                                                        | 4.1899     | 2.1234   |
|                                                                                                          | 3.4886     | 1.9955   |
|                                                                                                          | 3.0919     | 1.8511   |
| 2                                                                                                        | 3.7553     | 2.6274   |
|                                                                                                          | 3.0997     | 2.1632   |
|                                                                                                          | 3.4272     | 1.8138   |



**Figura 26:** Promedio de la actividad normalizada del promotor V2 co-transfectado junto con pcDNA E6 del VPH 16. Se obtuvo una  $p=0.0001$ .

#### 9.4 Actividad del promotor V2 en presencia de la oncoproteína E7

Se evaluó la actividad del promotor V2 en presencia del plásmido pcDNA E7 que contiene el marco de lectura para la oncoproteína E7 del VPH16, la **tabla 8** muestra la actividad normalizada de la luciferasa de ambas construcciones en la línea celular HaCat. La **gráfica 3** muestra una disminución del 50% en la actividad del promotor V2 en presencia de la oncoproteína E7 del VPH16.

| Tabla 9: Actividad transcripcional del promotor V2 (pGL4.664V2) y co-transfectado con la oncoproteína E7 |                                                                                                                                                                |          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Numero de ensayo                                                                                         | pGL4.664V2                                                                                                                                                     | pcDNA E7 |
| 1                                                                                                        | 4.1899                                                                                                                                                         | 2.6243   |
|                                                                                                          | 3.4886                                                                                                                                                         | 2.3588   |
|                                                                                                          | 3.0919                                                                                                                                                         | 2.4916   |
| 2                                                                                                        | <p><b>Actividad del promotor V2 en presencia de la oncoproteína E7</b></p>  |          |

**Figura 27:** Promedio de la actividad normalizada del promotor V2 co-transfectado junto con pcDNA E7 del VPH 16. Se obtuvo una  $p=0.0002$ .

## 10. Discusión

Los análisis *in silico* se han convertido en una herramienta funcional para el manejo de datos en varias áreas del conocimiento, permitiendo la manipulación de grandes cantidades de datos, que permiten darnos un panorama general sobre las condiciones, información y conocimiento del objeto de estudio. Particularmente, sobre el gen *ST3GAL4*, al revisar la información reportada sobre RNAm por (Kitagawa y Paulson, 1996) y contrastada con NCBI durante el trabajo del grupo de investigación (Roa, *et al.* 2018, en prensa) se logró identificar al promotor no descrito, llamado V3, posteriormente reportado en la línea celular HaCat (Ortiz-Mateos, 2017).

Dentro del estudio de Roa, *et al.* 2018, utilizando la información de la base de datos BLAST se encontró un cambio en la nomenclatura de las variantes pasando de llamarse “B” a “V”, esto generó interés por parte de nuestro grupo de investigación, específicamente sobre los trabajos del promotor hasta entonces llamado Bx (Colomb *et al.*, 2012, Colomb *et al.*, 2016).

El análisis del promotor llamado Bx abarcaba una región de 2,024pb que presentaba actividad correspondiente a un promotor sin embargo, la revisión *in silico* llevada a cabo nuestro grupo, demostró que esta región abarcaba a dos promotores. Estos promotores reportados *in silico* fueron denominados V2 y V1 en la página NCBI.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad transcripcional del promotor denominado V2, debido a que se desconocía su actividad transcripcional en la línea celular HaCat, La regulación transcripcional de este gen, es compleja debido a la presencia de múltiples promotores, mecanismo de splicing alternativo y a que su expresión es de tipo tejido específico (Taniguchi, 2003).

Se realizó un análisis *in silico* de los elementos que constituyen los posibles sitios de unión para los factores de transcripción que pudieran regular la actividad del promotor V2, este análisis nos presenta un sitio INR, que constituye uno de los elementos necesarios para el inicio de la transcripción, cajas GC que son sitios de reconocimiento para el factor Sp1 que forma parte de una familia de factores de transcripción llamados Krüppel involucrados en diversos procesos de regulación de genes, esto debido a su alta afinidad a la unión con DNA debido a su motivo proteico

dedos de zinc lo cual le confiere actividad como activador y represor en múltiples vías de señalización, aunado a que se ha demostrado que puede interactuar con la proteína E6 (Brey *et al.*, 2009).

Sitios de unión para factores de transcripción como TNF $\alpha$  reportado por Colomb *et al.*, 2016, donde se menciona que el promotor V2 (Bx) responde en presencia de TNF $\alpha$ , durante la infección por *P. aeruginosa* en la línea celular A459 de cáncer de pulmón, lo cual nos sugiere que la actividad de este promotor puede aumentar de forma significativa en respuesta a procesos infecciosos en vías respiratorias. Sin embargo cabe destacar que el trabajo realizado por Colomb no concluye si este elemento TNF $\alpha$  es capaz de actuar como factor de transcripción para regular al promotor, solo se discute el aumento en la actividad del promotor a raíz de un tratamiento inducido con TNF $\alpha$  (Colomb *et al.*, 2016).

Otro de los factores de transcripción que pueden unirse al promotor V2, es c-myc, éste forma parte de una familia de proteínas que se encuentran alteradas en infecciones por virus y asociados generalmente a procesos tumorales (Soucek *et al.*, 2008), infiriendo que el promotor V2 puede ser regulado por algún miembro de esta familia podría encontrarse alterado por VPH, dando como resultado una baja actividad del promotor V2.

El factor de transcripción AP-1 compuesto por un heterodímero de miembros de la familia c-Fos (c-Fos, FosB y Fra-2) unidos a miembros de la familia c-Jun (c-Jun, JunB or JunD), aparece en los resultados *in silico*, se sabe que toma parte importante en la regulación transcripcional del VPH tipos 16 y 18 a través de su motivo proteico llamado cierre de leucina el cual le permite unión directa a DNA, permitiendo al VPH la activación o represión de genes durante el ciclo viral dependiendo de la composición del heterodímero (Prusty y Das, 1997).

Cambios en la composición del heterodímero AP-1 han sido asociados a el proceso de transformación maligna por VPH en líneas celulares de cervix (Wilde *et al.*, 2008), es decir durante los estadios tempranos de la infección por VPH se ha observado una alta expresión de Fra 1 (miembro de la familia c-Fos) unido a c-Jun, sin embargo en células tumorales su expresión se reduce, aumentando la expresión de



c-Fos, cambiando la función del factor de transcripción AP-1, esto nos permitió entender que si AP-1 estuviera involucrado en la actividad transcripcional del promotor V2 en la línea celular HaCat, podría presentar un comportamiento diferente en condiciones pre y post co-transfección con alguna de las oncoproteínas E5, E6 y E7 del VPH.

La primera pregunta de investigación sobre si existe una actividad del promotor V2 en la línea celular HaCat fue respondida, encontrando actividad en la región evaluada, sin embargo, al observar los resultados de Colomb (2012) en la línea celular de pulmón A459, se observa que su construcción con mayor actividad corresponde a la construcción que denomina -870/+173 (ver figura 15) la cual abarca nuestra región promotora de 664 pb, que presento actividad de promotor, coincidiendo parte del trabajo realizado por su grupo de investigación con nuestros resultados y además nosotros utilizamos queratinocitos humanos. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la línea celular A459 pertenece a un carcinoma de pulmón y que la expresión de su genotipo está alterada, pudiendo ser *ST3GAL 4* uno de estos genes alterados cuya expresión sea diferente en condiciones diferentes a un genotipo sano.

Al revisar la actividad reportada con los resultados obtenidos por Ortiz-Mateos en 2017, para el promotor V3 en la línea celular HaCat, se observó una menor actividad para el promotor V2, sin embargo, se puede inferir que los promotores tienen diferente actividad y posiblemente sean reguladas por factores de transcripción diferentes en un mismo tipo celular, pudiendo variar en función del tejido de acuerdo a lo expresado por Taniguchi (2003).

En cuanto a la segunda pregunta de investigación sobre si las oncoproteínas E5, E6 y E7 del VPH16 tendrían un efecto en la actividad transcripcional de la variante V2 se evaluó cada una por separado, en el caso de la oncoproteína E5 se encontró que la actividad del promotor disminuía en presencia de esta.

Los estudios sobre la oncoproteína E5 muestran que tiene la capacidad para incrementar o disminuir la expresión de genes a través de diversos procesos llevados a cabo por esta oncoproteína, algunos de estos genes cuya expresión es

modificada tienen un papel relevante en procesos de proliferación e immortalización de la célula (Moddy y Laimins, 2010, Venuti *et al.*, 2015). Genes como XBP-1, IRE1  $\alpha$  y COX2 que participan en el tráfico de proteínas en el retículo endoplásmico reducen la expresión de sus RNAm como respuesta a la acción de E5, sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual lo realiza, y se sugiere que podrían alterar otros procesos celulares como vías encargadas del proceso de glicosilación (Sudarshan *et al.*, 2010).

Del mismo modo se sabe que existe una reducción de la expresión de Conexina 43 (Tomakid *et al.*, 2000) en la línea celular HaCat por acción de la oncoproteína E5 del VPH 16. Estos estudios nos dan un antecedente de que una reducción en la actividad del promotor V2 en presencia de E5 puede ser respuesta a que algún posible factor de transcripción que regule la actividad de este promotor, sea blanco de esta oncoproteína.

La oncoproteína E6 del VPH16 es la proteína viral más estudiada, se conoce que participa en la sobreexpresión de múltiples genes (Moddy y Laimins, 2010). Sin embargo, nuestro estudio presenta resultados que difieren de lo reportado en el trabajo de Ortiz-Mateos, 2017 con el promotor V3 donde se encontró un aumento significativo en su actividad en presencia de E6 en la línea celular HaCat, en el caso del promotor V2 fue una disminución significativa en la actividad en presencia de E6, lo cual podemos suponer fue debido a la expresión del tipo tejido específico de los promotores del gen *ST3GAL4* (Taniguchi, 2003).

Pocos estudios muestran una reducción de la expresión de genes en presencia de E6 entre los cuales; se sabe que tiene la capacidad de disminuir la actividad del promotor de IL8 (interleucina 8) por medio de la interacción con proteínas como CREB /p300 y P/CAF (Huang y McCance, 2002) dados estos resultados podemos inferir que el factor de transcripción CREB, encontrado en el análisis *in silico* puede tener un efecto disminuyendo la actividad del promotor V2.

Dentro del grupo de investigación (Ordoñez, 2015) se analizó la actividad del promotor p1 del gen *ST6GAL 1* con la oncoproteína E6 del VPH16 donde se encontró una reducción del 40% de su actividad, cabe destacar que *ST6GAL 1* es

una enzima que funciona como sialiltransferasa al transferir un residuo de ácido sálico a una galactosa. Este efecto de disminución de la actividad del promotor p1 en presencia de una oncoproteína también se vió reflejado al ser evaluado con la oncoproteína E7 del VPH16, este efecto es interesante debido a que representa un antecedente directo en sialiltransferasas y el comportamiento de algunos promotores de estas en presencia de las oncoproteínas del VPH16.

La pregunta de investigación abarcó también el efecto de oncoproteína E7, que tiene la capacidad de reprimir la actividad de las llamadas proteínas de bolsillo p130, p107 y pRb interfiriendo en la progresión del ciclo celular. E7 también tiene la capacidad de disminuir la expresión de RNAm de p300 (histona desacetiltransferasa) a través de unión directa con esta proteína en el citoplasma que participa en procesos de arresto celular y como coactivador de CREB junto a CBP (proteína de unión a CREB). Se sabe también que E7 tiene la capacidad de disminuir la actividad de promotores de genes como es el caso de la glicoproteína llamada Fibronectina a través de la unión directa con las proteínas Sp1 o pRB (sugeridos como posibles factores de transcripción que regulan a fibonectina), lo cual está asociado a lesiones premalignas y transformación celular (Rey *et al.*, 2000).

Finalmente podemos observar la diferencia entre los niveles de expresión de ambos promotores (V2 y V3) en la misma línea celular en presencia de las oncoproteínas virales E5, E6 y E7, puede ser atribuida al uso de factores de transcripción diferentes que regulan la expresión de cada variante, de lo cual podemos inferir que el factor de transcripción que regula al promotor de la variante V3 se activa durante el proceso de transformación maligna por VHP, en el caso del promotor V2 podemos suponer que la proteína que funge como factor de transcripción de su actividad puede ser regulada negativamente y por lo tanto, como consecuencia bajar el nivel de expresión del promotor.

No podemos aseverar que factor de transcripción regula la actividad del promotor V2 debido a que no se ha concluido el trabajo, por lo tanto ponemos como perspectiva que se debe conocer la actividad del promotor en otras líneas celulares,

encontrar la región del promotor mínimo y finalmente dilucidar el factor de transcripción que regula la actividad del promotor de la variante V2 del gen *ST3GAL4*.

## **11. Conclusiones**

- 1) Se localizaron sitios de unión para proteínas que pueden participar como factores de transcripción en la regulación del promotor V2.

- 2) El promotor V2 presenta actividad en la línea celular HaCat.
- 3) Las oncoproteínas E5, E6 y E7 disminuyen la actividad del promotor de la variante V2 del gen *ST3GAL4* en la línea celular HaCat.

## **12. Bibliografía**

1. Aebi, M., Bernasconi, R., Clerk, S., & Molinari, M. (2010). N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends in Biochemical Sciences*, 35, 74-82.
2. Antony, P., Rose, R., Heidenreich, A., Knüchel, K., Gaisa, N. T., & Dahl, E. (2014). Epigenetic inactivation of ST6GAL1 in human bladder cancer. *BMC cancer*, 14, 1-11.
3. Breton, C., Šnajdrová, L., Jeanneau, C., Koca, J., & Imberty, A. (2006). Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology*, 16, 29-37.
4. Brey, C. W, Nelder, M. P, Hailemariam, T., Gaugler, C., & Hashmi, S. (2009). Krüppel-like family of transcription factors: an emerging new frontier in fat biology. *International Journal of Biological Sciences*, 5, 622-636.
5. Carvalho, S., Catarino, C. A, Dias, A. M, Kato, M., Almeida, A., & Hessling, B. (2016). Preventing E-cadherin aberrant N-glycosylation at Asn-554 improves its critical function in gastric cancer. *Oncogene*, 35, 1619-1631.
6. Chang, C. F. (2012). *Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology* (Ed. rev.). Rijeka, Croacia: InTech.
7. Colomb, F., Krzewinski-Recch, M. A, Bobowski, M., Mensier, E., Jaillard, S., Vidal, O. & Groux-Degroote, S. (2014). TNF induces the expression of the sialyltransferase ST3Gal IV in human bronchial mucosa via MSK1/2 protein kinases and increases FliD/sialyl-Lewisx-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Journal*, 457, 79-87.
8. Colomb, F., Krzewinski-Recch, M. A, Machhour, E. L. F, Mensier, E., Jaillard, S., Steenackers, A. & Groux-Degroote, S. (2012). TNF regulates sialyl-Lewisx and 6-sulfo-sialyl-Lewisx expression in human lung through up-regulation of ST3GAL4 transcript isoform BX. *Biochimie*, 96, 2045-2053.
9. Colomb, F., Krzewinski-Recchi,, M. A, Steenackers, A., Vicent, A., Delannoy, P., Groux-Degroote, S., & Harduin-Lepers, A. (2016). TNF up-regulates ST3GAL4 and sialyl-LewisX expression in lung epithelial cells through an intronic ATF2-responsive element. *Biochemical Journal*, 460, 74-87.
10. Cooper, H. (2017). *La célula* (7<sup>a</sup> ed.). Madrid, España: Marbán.

11. Coutinho, P. M, Deleury, E., Davies, G. J, & Henrissat, B. (2003). An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases. *Journal of Molecular Biological*, 328, 307-317.
12. Roa De la Cruz, L., Martínez Morales, P. L, Morán-Cruz, I., Milflores-Flores, L., Rosas-Murrieta, N., González- Ramírez, C., . . . Vallejo- Ruiz, V. (2018). Expression Analysis of ST3GAL4 transcripts in cervical cancer cells. En prensa.
13. Freeze, H. H, & Aebi, M. (2005). Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 15, 490-498.
14. Fusenig, N. E, Markham, A., Hornung, J., Breitkreutz, D., Petrussevska, T., & Boukamp, P. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *Journal of Cell Biology*, 106, 761-771.
15. Gassen, U., Kelm, S., & Schauer, R. (1998). Differential gene expression of a human  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase in leukemic cell lines and leucocytes. *FEBS Letters*, 427, 91-95.
16. Gill, D. J, Claussen, H., & Bard, F. (2011). Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation. *Trends in Cell Biology*, 21, 149-158.
17. Glavey, S. V, Huynh, D., Reagan, M. R, Manier, S., Moschetta, M., & Kawano, Y. (2015). The cancer glycome: carbohydrates as mediators of metastasis. *Blood Review*, 29, 269-279.
18. Gomes, C., Osório, H., Texeira- Pinto, M., Campos, D., Olíveira, M. J, & Reis, C. A. (2013). Expression of ST3GAL4 Leads to SLex Expression and Induces c-Met Activation and an Invasive Phenotype in Gastric Carcinoma Cells. *PLoS ONE*, 8, 1-8.
19. Grillo-Ardila, C. F, Martínez-Velásquez, M. Y, & Morales-López, B. (2008). Virus del Papiloma Humano: aspectos moleculares y cáncer de cérvix. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 59, 310-315.

20. Harduin-Lepers, A., Vallejo- Ruíz, V., Krzewinski-Recchi, R. A, Samyn-Petit, B., Julien, S., & Delannoy, P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie*, 83, 727-737.
21. Huang, S. M, & McCance, D. J. (2002). Down Regulation of the Interleukin-8 Promoter by Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 through Effects on CREB Binding Protein/p300 and P/CAF. *Journal of Virology*, 76, 8710-8721.
22. Jiménez- Martínez, M. C, Trejo- Márquez, H., Herrera Sánchez, A., Romero Ibarra, H. L, Chávez, R., Lascuarin, R., & Zenteno, E. (2002). Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 13, 39-47.
23. Jonhson, B. A, Aloor, H. L, & Moody, C. A. (2017). The Rb binding domain of HPV31 E7 is required to maintain high levels of DNA repair factors in infected cells. *Virology*, 500, 22-34.
24. Julenius, K., Mølgaard, A., Gupta, R., & Brunak, S. (2005). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*, 15, 153-164.
25. Kitagawa, H., & Paulson, J. C. (1993). Cloning and expression of human Gal $\beta$ 1,3(4) GlcNAc  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 194, 375-382.
26. Kitagawa, K., Mattei, M. G, & Paulson, J. (1996). Genomic Organization and Chromosomal Mapping of the Gal $\beta$ 1, 3GalNAc/Gal $\beta$ 1,4GlcNAc  $\alpha$ 2,3-Sialyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 931-938.
27. Kooyk, Y. v, Kalay, H., & García- Vallejo, J. J. (2013). Analytical tools for the study of cellular glycosylation in the immune system. *Frontiers in Immunogy*, 11, 1-6.
28. Krawczyk, E., Suprynowicz, F. A, Herbert, J. D, Kamonjoh, C. M, & Schlegel, R. (2011). The Human Papillomavirus Type 16 E5 oncoprotein translocates calpactin I to the perinuclear region. *Journal of Virology*, 85, 10968-10975.
29. Lairson, L. L, Henrissat, B., Henrries, G. J, & Whitters, S. G. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 521-555.



30. Lee, Y. C., Kaufmann, M., Kawaguchi, S. K., Kono, M., Takashima, S., Kurosawa, N., . . . Tsuji, S. (1999). Molecular Cloning and Functional Expression of Two Members of Mouse NeuAca2,3Galb1,3GalNAc GalNAca2,6-Sialyltransferase Family, ST6GalNAc III and IV. *The Journal of Biological Chemistry*, 17, 11958-11967.
31. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2002). *Molecular Cell Biology* (4<sup>a</sup> ed.). New York, United States of America: Hardcover Publisher.
32. López- Morales, D., Velázquez-Márquez, N., Valenzuela, O., Santos-López, G., Reyes- Leyva, J., & Vallejo-Ruíz, V. (2009). enhanced sialyltransferases transcription in cervical intraepithelial neoplasia. *Investigación clínica*, 50, 45-53.
33. López Saavedra, A., & Lizano Soberón, M. (2006). Cáncer cérvicouterino y el Virus del Papiloma Humano: La historia que no termina. *Cancerología*, 1, 31-55.
34. Martinez-Duncker, I., Martinez-Duncker, C., & Salinas-Marin, R. (2011). Towards In Vivo Imaging of Cancer Sialylation. *International Journal of Molecular Imaging*, 1, 1-10.
35. Moody, C. A, & Laiminis, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, 10, 550-560.
36. Moremen, K. W, Tiemeyer, M., & Nairn, A. V. (2012). Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 448-462.
37. Morshed, K., Polz-Gruszka, D., Szymański, M., & Polz-Dacewicz, M. (2014). Human Papillomavirus (HPV) - structure, epidemiology and pathogenesis. *Otolaryngologia Polska*, 68, 213-219.
38. Müller, M., Wasson, C. W, Bhatia, R., Boxall, S., Millan, D., Goh, G. Y. S, MacDonald, A. (2015). YIP1 family member 4 (YIPF4) is a novel cellular binding partner of the papillomavirus E5 proteins. *Scientific Reports*, 5, 1-14.

39. Nussbaum, R. L, McInnes, R. R, & Willard, H. F. (2007). *Thompson & Thompson genetics in medicine* (7<sup>a</sup> ed.). Philadelphia, United States of America: Elsevier Inc.
40. Ohtsubo, K., & Marth, J. D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 126, 855-867.
41. Ortiz-Mateos, C. A. (2017). *Identificación y caracterización del promotor de la variante V3 del gen ST3GAL4 y la evaluación del efecto de las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH 16*.
42. Petretti, T., Kremmer, W., Schulze, B., & Schlag, P. (2000). Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human colorectal carcinomas and liver metastases. *Gut*, 46, 359-366.
43. Prusty, B. K, & Das, B. C. (2008). Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *International Journal of Cancer*, 113, 951-960.
44. Rao, F. V, Rich, J. R, Rakić, B., Buddai, S., Schwartz, M. F, Johnson, K., . . . Strynadka, N. C, J. (2009). Structural insight into mammalian sialyltransferases. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16, 1186-1188.
45. Ress, D. K, & Linhardt, R. J. (2004). Sialic Acid Donors: Chemical Synthesis and Glycosylation. *Current Organic Synthesis*, 1, 31-46.
46. Rey, O., Lee, S., & Park, N. H. (2000). Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Represses Transcription of Human Fibronectin. *Journal of Virology*, 74, 4912-4921.
47. Reymond, N., D'Acqua, B. B., & Ridley, A. J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 13, 858-870.
48. Rini, J., Varki, A., & Esko, J. (2009). Glycosyltransferases and Glycan-processing Enzymes. In A. Varki (Ed.), *Essentials of Glycobiology* (2<sup>a</sup> ed., pp. 234-275). New York, United States of America: Cold Spring Harbor.
49. Rivera-Juarez, M. D. E. A, Rosas-Murrieta, N. H, Mendieta-Carmona, V., Hernandez-Pacheco, R. E, Zamora-Ginez, I., Rodea-Avila, C., Apresa-Garcia T , Garay-Villar O , Aguilar-Lemarroy A , Jave-Suarez LF , Diaz-Orea M.A

- , Milflores-Flores L , Reyes-Salinas J.S , Ceja-Utrera F.J , Vazquez-Zamora V.J , Vargas-Maldonado T , Reyes-Carmona S , Sosa-Jurado F , Santos-Lopez G , Reyes-Leyva J. Vallejo-Ruiz, V. (2014). Promoter polymorphisms of ST3GAL4 and ST6GAL1 genes and associations with risk of premalignant and malignant lesions of the cervix. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15, 1181-1186.
50. Santos- López, G., Márquez-Dominguez, L., Reyes- Leyva, J., & Vallejo- Ruíz, V. (2015). Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Revista Médica Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53, 166-171.
  51. Sasaki, K., Kurata, K., Kojima, N., Kurosawa, N., Onta, S., Hanai, N. Nishi, T. (1994). Expression cloning of a GM3-specific alpha-2,8-sialyltransferase (GD3 synthase). *Journal of Biological Chemistry*, 22, 19550-19556.
  52. Sasaki, K., Watanabe, E., Kawashima, K., Sekine, S., Doji, T., Oshima, M. Hasegawa, M. (1993). Expression cloning of a novel Gal $\beta$  (1-3/1-4)GlcNAc  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase using lectin resistance selection. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 22782-22787.
  53. Schauer, R. (1982). chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 40, 131-234.
  54. Schnaar, R. L, Gerardy-Schahn, R., & Hildebrandt, H. (2014). Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiological Reviews*, 94, 461-518.
  55. Schnaar, R. L. (2014). ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 4 (ST3GAL4). In N. Taniguchi, K. Honke, M. Fukuda, H. Narimatsu, N. Yamaguchi, & T. Angata (Eds.), *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes* (2<sup>a</sup> ed., pp. 667-674). Tokio, Japón: Springer Japan.
  56. Schulz, B. L, & Aebi, M. (2009). Analysis of glycosylation site occupancy reveals a role for Ost3p and Ost6p in site-specific N-glycosylation efficiency. *Molecular & Cell Proteomics*, 1, 357-364.

57. Secretaría de Salud. (2015, 8 septiembre). Estadísticas de Cáncer de Mama y Cáncer Cérvico Uterino. Recuperado 5 febrero, 2018, de <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>
58. Senba, M., & Mori, N. (2012). Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. *Oncology Reviews*, 6, 135-144.
59. Songock, W. K, Kim, S. M, & Bodily, J. M. (2017). The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription. *Virus Research*, 231, 56-75.
60. Soucek, L., Whitfield, J., Martins, C. P, Finch, A. J, Murphy, D. J, Sodir, M. N, . . . Evan, G. I. (2008). Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature*, 455, 679-683.
61. Stanley, P. (2011). Golgi Glycosylation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, 1-13.
62. Sudarshan, R. S, Schlegel, R., & Liu, X. (2010). HPV-16 E5 protein represses expression of stress pathway genes XBP-1 and COX-2 in genital keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339, 617-622.
63. Taniguch, A., & Matsumoto, K. (1998). Down-regulation of human sialyltransferase gene expression during in vitro human keratinocyte cell line differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243, 177-183.
64. Taniguch, A., Matsumoto, K., Kaneta, R., & Morishita, K. (2001). Gene structure and transcriptional regulation of human Gal  $\beta$ 1,4(3) GlcNac  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase VI (hST3Gal VI) gene in prostate cancer cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287, 1148-1156.
65. Taniguchi, A., Hioki, M., Matsumoto, K., & Taniguchi, A. (2003). Transcriptional regulation of human Galbeta1,3GalNAc/Galbeta1, 4GlcNAc alpha2,3-sialyltransferase (hST3Gal IV) gene in testis and ovary cell lines. *Biochemical Biophycals Research Communication*, 301, 764-768.
66. Teinturier-Lelièvre, M., Julien, S., Juliant, S., Guerardel, Y., Duonor-Cérutti, M., Delannoy, P., & Harduin-Lepers, A. (2005). Molecular cloning and

- expression of a human hST8Sia VI ( $\alpha$ 2,8-sialyltransferase) responsible for the synthesis of the diSia motif on O-glycosylproteins. *Biochemical Journal*, 392, 665-674.
67. Tomakidi, P., Cheng, H., Kohl, A., Komposch, G., & Alonso, A. (2000). Connexin 43 expression is downregulated in raft cultures of human keratinocytes expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Cell Tissue Research*, 301, 323-327.
  68. Tomassino, M. (2014). The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 26, 13-21.
  69. Trinchera, M., Aronica, A., & Dall' Olio, F. (2017). Selectin Ligands Sialyl-Lewis a and Sialyl-Lewis x in Gastrointestinal Cancers. *Biology*, 1, 1-18.
  70. Varki, M. A. (2007). Glycan-based Interactions Involving Vertebrate Sialic Acid-Recognizing Proteins. *Nature*, 446, 1023-1029.
  71. Varki, M. N, & Varki, A. (2007). Diversity in Cell Surface Sialic Acid Presentations: Implications for Biology and Disease. *Laboratory Investigation*, 87, 851-857.
  72. Velázquez-Marquez, N., Santos-López, G., Jiménez-Aranda, L., Reye-Leyva, J., & Vallejo- Ruíz, V. (2012). Sialyl Lewis x expression in cervical scrapes of premalignant lesions. *Journal of Biosciences*, 37, 1182-1186.
  73. Veldman, T., Liu, X., Yuan, H., & Schlegel, R. (2003). Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proceedings of National Academy of Sciences of the Unites States of America*, 100, 8211-8216.
  74. Venegas, V. A, Rubio, A. I, Bedoya, A. M, & Sánchez, G. I. (2008). Estructura molecular y antigénica de la vacuna contra el Virus del Papiloma Humano (VPH16). *Acta Biológica Colombiana*, 13, 37-48.
  75. Venuti, A., Paolini, F., Nasir, L., Corteggio, A., Roperto, S., Del campo, M. S, & Borzacchiello, G. (2011). Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Molecular Cancer*, 10, 1-18.
  76. Wang, B., & Brand Miller, J. (2003). The role and potential of sialic acid in human nutrition. *European journal of Clinical Nutrition*, 57, 1351-1359.

77. Wang, P. H, Leng, W. L, Juang, C. M, Yang, Y. H, Lo, W. H, Lai, C. R, Yuan, C. C. (2005). Altered mRNA expressions of sialyltransferases in ovarian cancers. *Gynecologic Oncology*, 99, 631-639.
78. Weinstein, J., Lee, E. U, McEntee, K., Lai, P. H, & Paulson, J. C. (1987). Primary structure of  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH<sub>2</sub>-terminal signal anchor. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 17735-17743.
79. Werner, R. G, Kloop, K., & Schlueter, M. (2007). Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems. *Acta Pediátrica*, 96, 17-22.
80. Wilde, J. De, De-Castro Arce, J., Snijders, P. J, F, Meijer, J. L. M, C, Rösl, F., & Steenbergen, R. M. (2008). Alterations in AP-1 and AP-1 regulatory genes during HPV-induced carcinogenesis. *Cellular Oncology*, 30, 77-87.
81. Zeng, S., Gallego, R. G, Dinter, A., Malissard, M., Kamerling, J. P, Vliegthart, J. F, & Berger, E. G. (1999). Complete enzymic synthesis of the mucin-type Sialyl Lewis x epitope, involved in the interaction between PSGL-1 and P-selectin. *Glycoconjugate Journal*, 16, 487-497.

