

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Farmacia.

Delección en la región cromosómica humana 12q14-15
por integración del ADN del virus del papiloma.

Tesis doctoral
Marta Inés Gallego Sanz.

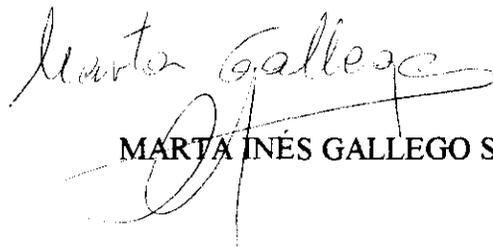
Mayo 1996

Memoria presentada por la licenciada MARTA INÉS GALLEGO SANZ para optar al grado de Doctor en Farmacia.

Esta tesis Doctoral ha estado realizada bajo la dirección del Dr. Pedro A. Lazo-Zbikowski Taracena en la Unidad de Genética Molecular (C.S.I.C.), Centro Nacional de Biología Celular y Retrovirus, Instituto de Salud Carlos III.



PEDRO. A. LAZO-ZBIKOWSKI TARACENA



MARTA INÉS GALLEGO SANZ

Mayo 1996
MADRID

A mi familia
A Rodolfo
A mis compañeros

AGRADECIMIENTOS

Considero que realizar una empresa en soledad es un ejercicio agotador que no compensa nunca el esfuerzo invertido, por esta razón me alegro de no haber andado este camino sola, en ese caso, estoy segura, de que no habría llegado nunca a este punto. En la realización de esta tesis han colaborado muchas personas y es para mí un placer, largo esperado, el poder mencionar a las personas que me han ayudado y me han acompañado durante estos años de trabajo. En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Pedro Lazo, director de esta tesis doctoral, por haberme elegido para formar parte de su grupo de investigación, por haberse preocupado de mi financiación durante todos estos años, y sobre todo por haber sabido dar proyección internacional a nuestro trabajo.

Me gustaría agradecer, también, a la Dra. Sara Ballester el haberme enseñado las técnicas básicas de biología molecular durante los primeros meses de trabajo en el laboratorio.

A la Dra. Isabel Olivares por la ayuda que me prestó para salir de un bache en la producción de la genoteca de la línea celular SW756, de no ser por ella puede que aún estuviera atascada en ese punto.

A Rodolfo Murillas por su apoyo informático, por haberme motivado científicamente y por haberme ayudado a desarrollar una lectura crítica de las publicaciones científicas.

A Conchita Llaguno, a quien he tenido el placer de conocer durante estos últimos años, pues es para mí un ejemplo a seguir por su nobleza de espíritu, su entrega en el trabajo y su pensamiento libre.

Al Dr Eugenio Santos y al Prof. Van de Ven, el haberme permitido realizar sendas estancias breves en sus respectivos laboratorios.

Al personal administrativo y de mantenimiento del CNBCR por su amabilidad y eficiencia.

También quiero mencionar las personas con las que he convivido a lo largo de estos años de trabajo en el Instituto de Salud Carlos III, pues me han ayudado en innumerables ocasiones y a su lado me he sentido como en casa, estas personas son mis compañeros: Elena Feduchi, María Eugenia González, Florencio Varas, Susana García, Fernando Velez, Javier Hernandez, Beatriz Gil, Edurne Orúe, Susana López, Laura Gil, Luis García, Gloria de Ojeda, Pilar Portolés, Beatriz Dorado y Elena Fernandez.

Quiero destacar en estas líneas el excelente trabajo de Ángel del Pozo, que ha realizado todas las copias y composiciones fotográficas que se presentan en esta tesis doctoral.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Ácido-desoxirribonucleasa
ADNc	ADN complementario (o copia)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ácido ribonucleasa
ARNm	ARN mensajero
BSA	Seroalbúmina bobina
cmp	Cuentas por minuto
dATP	Desoxiadenosín trifosfato
dCTP	Deaoxicitidin trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido Etinendiamitetraacético
Fig.	Figura
g	Gravedad
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobases
LCR	(Long control region). Gran región de control.
M	Molar
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pmol	Picomol

r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Lauril sulfato sódico o dodecilsulfato sódico
SV40	Virus de simio 40
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidades internacionales de actividad enzimática
U.I	Unidades internacionales
ufp	Unidades formadoras de placa
URR	(Up-stream regulatory region). Región reguladora anterior
VHB	Virus de la hepatitis B
VPH	Virus del papiloma humano
X-Gal	5-Bromo-4-Cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1- CONCEPTO DE CÁNCER	2
1.1a- Oncogenes y genes supresores de tumores	4
1.2- EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	5
1.2a- Biología de los virus del papiloma	7
1.2b- Los genes virales	11
1.2c- Integración del ADN del VPH en el genoma humano	14
1.3- REGIÓN CROMOSÓMICA 12q13-15	16
1.4- LA LÍNEA CELULAR SW756	19
1.5- OBJETIVOS	20
2.- MÉTODOS	21
2.1- CULTIVOS CELULARES	22
2.2- EXTRACCIÓN DE ADN DE ALTO PESO MOLECULAR DE CÉLULAS EN CULTIVO	22
2.3- OBTENCIÓN DE ARN DE CÉLULAS EN CULTIVO	23
2.3a- Extracción de ARN por el reactivo de TRIzol®	23
2.3b- Extracción de ARN con tiocianato de guanidinio y purificación por centrifugación en solución de CsCl	23
2.4- ANÁLISIS DE ADN GENÓMICO POR LA TÉCNICA DE SOUTHERN	24
2.4a- Electroforesis de ADN genómico eucariótico digerido	24
2.4b- Transferencia y fijación del ADN del gel a la membrana de nylon N⁺	24
2.4c- Prehibridación e hibridación del “Southern”	24
2.4d- Marcaje de la sonda radiactiva por el método del ADN cebador aleatorio	25
2.4e- Lavados en el análisis de “Southern”	25
2.5- ANÁLISIS DEL ARNm POR LA TÉCNICA DE “NORTHERN”	25
2.5a- Electroforesis de ARN en geles de agarosa conteniendo formaldehído	25
2.5b- Transferencia y fijación del ARN a la membrana.	26
2.5c- Prehibridación e hibridación en el análisis de “Northern”	26

2.5d- Lavados en el análisis de “Northern”	26
2.6- PREPARACIÓN, A GRAN ESCALA, DE ADN DE BACTERIÓFAGO LAMBDA	
LAMBDA	26
2.6a- Infección a baja multiplicidad.	26
2.6b- Purificación del bacteriófago lambda.	27
2.6c- Extracción de ADN del bacteriófago lambda.	27
2.7- PREPARACIÓN DE UNA GENOTECA EN BACTERIÓFAGO LAMBDA DASH II	28
2.7a- Digestión del bacteriófago con la endonucleasa de restricción <i>EcoRI</i>	28
2.7b- Purificación de los brazos de lambda por centrifugación en gradiente de sacarosa.	28
2.7c- Purificación de una fracción del ADN de SW756 digerido con <i>EcoR I</i> que comprende los fragmentos de tamaños de 10 a 15 kb.	29
2.7d- Ligación del ADN genómico a los “brazos” de λ Dash II	29
2.7e- Empaquetamiento <i>in vitro</i> del ADN en partículas de fago	29
2.7f- Preparación de las bacterias hospedadoras de los bacteriófagos recombinantes	30
2.7g- Titulación de la genoteca	30
2.8- SCREENING DE LA GENOTECA	30
2.8a- Extensión de la genoteca en placas de LB/agar	30
2.8b- Transferencia del ADN del fago a las membranas de nitrocelulosa	31
2.8c- Prehibridación e hibridación de las membranas	31
2.8d- Lavados de las membranas	31
2.9- MINIPREPARACIONES DE ADN DE BACTERIOFAGO LAMBDA	32
2.10- MAPA DE RESTRICCIÓN DE LOS CLONES DE LAMBDA	33
2.10a- Digestiones parciales de los clones de lambda	33
2.10b- Electroforesis de las digestiones parciales y transferencia a la membrana	33
2.10c- Marcaje radiactivo del oligonucleótido	34
2.10d- Hibridación con oligonucleótidos y lavados	34
2.11- SUBCLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN	34

2.11a- Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	35
2.11b- Aislamiento de los fragmentos de restricción	35
2.11c- Ligación del inserto al vector plasmídico	35
2.11d- Puesta en competencia de las bacterias	35
2.11e- Transformación	35
2.11f- Minipreparaciones de plásmidos	36
2.12- SECUENCIACIÓN	36
2.13- BÚSQUEDA EN GENOTECAS DE CÓSMIDOS Y YACS POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	36
2.14- MAPAS DE CÓSMIDOS	38
2.15- AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS EXTREMOS 3' DE ADNc	38
2.15a- Síntesis de ADNc a partir de ARN total	38
2.15b- Amplificación del ADNc	38
2.15c- Clonación de fragmentos amplificados por PCR usando el sistema CloneAmp®	40
2.16- LÍNEAS CELULARES	41
2.17- CEPAS BACTERIANAS	41
2.18- VECTORES	41
2.19- SOLUCIONES DE USO GENERAL EN BIOLOGÍA MOLECULAR	41
2.20- MATERIAL INFORMÁTICO	42
3.- RESULTADOS	43
3.1- CLONACIÓN DEL <i>LOCUS</i> DE INTEGRACIÓN EN EL GENOMA DE LAS CÉLULAS SW756.	44
3.1a- Caracterización de las secuencias virales integradas en SW756	44
3.1b- Expresión de los genes virales	46
3.1c- Elección de la endonucleasa de restricción empleada en la construcción de la genoteca	48
3.1d- Preparación de una genoteca genómica de la línea celular SW756	49
3.1e- Screening en la genoteca genómica de la línea celular SW756	51
3.2- CARACTERIZACIÓN DEL CLON λ 12QHP	52

3.2b- Secuenciación de las zonas de recombinación entre el ADN viral y el celular	57
3.2c- Las sondas celulares flanqueantes al sitio de integración reconocen regiones cromosómicas distintas	59
3.3- CLONACIÓN DEL ALELO NO OCUPADO CORRESPONDIENTE AL LOCUS DE INTEGRACIÓN VIRAL	61
3.3a- Clonación del alelo no ocupado correspondiente al punto de recombinación 5'	61
<u>Análisis de la genoteca genómica con la sonda S3</u>	61
<u>Análisis de una genoteca genómica con la sonda HH</u>	64
3.3b- Clonación del alelo no ocupado correspondiente al punto de recombinación 3'	66
<u>Análisis de una genoteca genómica con la sonda 500:</u>	66
3.4- CARACTERIZACIÓN DE LOS CLONES: λh12/82_{HH}, λh12/1₅₀₀ y λh12/32₅₀₀.	66
3.4a- Secuenciación de los alelos no-ocupados correspondientes al punto de recombinación 3', PAL2A y 5', PALL2B	73
3.4b- El alelo no-ocupado correspondiente al <i>locus</i> de integración viral se encuentra fuera de las regiones amplificadas en las líneas celulares OSA y RMS-13	76
3.5- EL ADN VIRAL DESPLAZA, AL INTEGRARSE, SECUENCIAS CELULARES	79
3.6- LOCALIZACIÓN EXACTA DEL LOCUS DE INTEGRACIÓN VIRAL EN EL MAPA FÍSICO DEL CROMOSOMA 12	82
3.6a- Caracterización del cósmido 107E2	85
3.6b- Localización del oligonucleótido de 17 pb en el cósmido 184A9	88
3.7- ¿ESTA AFECTADO EL GEN <i>HMGI-C</i> EN LA LÍNEA CELULAR SW756?	90
3.7a- Expresión del gen <i>HMGI-C</i> en la línea celular SW756	91
3.7b- Amplificación por PCR del extremo 3' del ADNc del gen <i>HMGI-C</i>	91
4-DISCUSIÓN	94
4.1- MODELO DE CARCINOGENÉISIS GENITAL ASOCIADA A LA INFECCIÓN POR LOS GENOTIPOS DE VPH DE ALTO RIESGO	103

5-CONCLUSIONES

105

6-BIBLIOGRAFÍA

109

1.- INTRODUCCIÓN

1.1- CONCEPTO DE CÁNCER.

Uno de los avances más importantes de la pasada década en el estudio de la genética humana ha sido la adquisición de pruebas moleculares confirmando que el cáncer es, en esencia, una enfermedad genética. Existen, sin embargo, dos diferencias claras entre el cáncer y el resto de las enfermedades genéticas: la primera es que el cáncer está causado fundamentalmente, por mutaciones somáticas, mientras que las enfermedades genéticas, clásicas, están causadas solamente, por mutaciones en la línea germinal. La segunda es que una sola mutación puede ser causante de una enfermedad genética propiamente dicha, pero el cáncer requiere la acumulación y selección biológica de múltiples mutaciones en una célula y en su linaje. El concepto escalonado de la progresión maligna es fundamental para la comprensión de esta enfermedad, y solo en estos últimos años se han tenido evidencias moleculares de este proceso (Vogelstein y Kinzler, 1993).

La primera sugerencia de este proceso fue la observación de una relación directa entre incidencia de cáncer y aumento de la edad del individuo (Fig. 1)

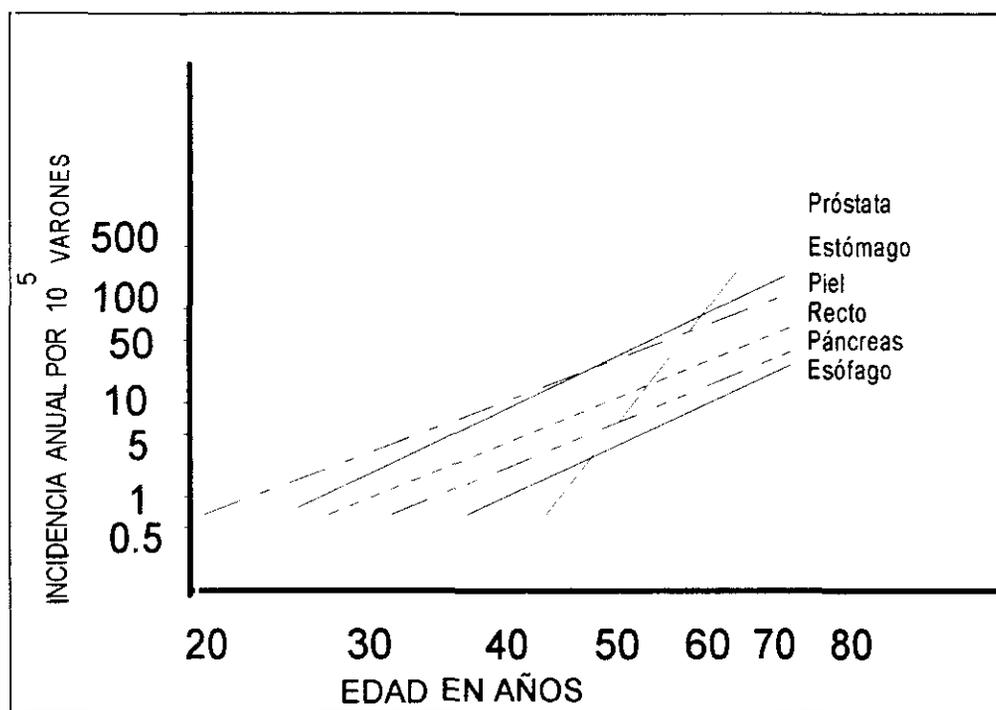


Fig. 1.: Tomada de Vogelstein y Kinzler, 1993

Se pensó que la explicación más atrayente para esta observación, podría ser el hecho de que el cáncer se produjese por la acumulación secuencial, de ciertos tipos de cambios genéticos en una célula y en su progenie (Vogelstein y Kinzler, 1993). Si bien, no era probable que en un mismo

linaje celular concurren varias mutaciones encaminadas a la proliferación descontrolada, por ello, alguna mutación debía aparecer en un gen encargado del mantenimiento de la integridad del ADN. Al mutarse uno de estos genes en una célula, aflorarían mutaciones en su progenie con mayor frecuencia que en una célula normal, alguna de las cuales podría afectar a un gen encargado de la regulación de la proliferación celular (Cavane y White, 1995) o de algún otro aspecto del control del funcionamiento celular. Esta mutación sería seleccionada sobre las otras por proporcionar a la célula portadora un cierto crecimiento incontrolado y podría ser la responsable de la formación de un tumor benigno. La aparición de otra mutación en alguna célula de la progenie le conferiría, a ésta, la capacidad de invadir los tejidos adyacentes y otra mutación o mutaciones serían responsables de la posibilidad de metastasizar en otros órganos. Estas dos últimas características son propias de las células malignas y distinguen los cánceres de los tumores benignos.

La hipótesis descrita, fue confirmada por Fearon y Vogelstein en 1990 por el análisis sistemático de los cambios genéticos durante la progresión del cáncer de colon, pues éste evoluciona a través de estadios bien diferenciados morfológicamente, lo que hizo posible establecer el orden en el que aparecían las alteraciones genéticas en función de su estadio, en este tipo de tumor. La primera mutación seleccionada aparece en el gen supresor de tumores *APC* (gen de la poliposis adenomatosa familiar de colon) la mutación de este gen da lugar a adenomas benignos y puede producirse en una célula somática; hecho que está relacionado con la aparición de un tumor solitario, o bien, en la línea germinal produciendo el desarrollo de cientos de tumores a lo largo del colon de los individuos portadores de esta mutación. La segunda mutación seleccionada podría ocurrir en el otro alelo de este gen, o bien, en otro gen aun desconocido, dando lugar a una nueva oleada proliferativa. En una de las células de este tumor benigno, aparecerá la mutación que convierta al gen *RAS* en un oncogén y esta mutación será seleccionada pues dará lugar a una nueva expansión clonal. En estadios sucesivos, las mutaciones consecutivas de los genes supresores de tumores *DCC* ("gen deleciónado en carcinoma de colon") y *TP53* (gen de la proteína p53) terminarán el proceso del tumor primario maligno. Si bien ninguna de las fases de la carcinogénesis es estable, incluso en la etapa carcinomatosa siguen ocurriendo mutaciones que darán lugar a subpoblaciones que tienen gran importancia en la oncología clínica, pues constituyen reservorios de células genéticamente heterogéneas con distintas susceptibilidades a las defensas del sistema inmune, a la radiación o a los quimioterápicos (Vogelstein y Kinzler, 1993).

La aparición de mutaciones genéticas en células somáticas puede deberse a la acción de cualquier agente agresivo para el ADN celular: radiaciones, productos químicos o virus tumorales.

La célula tiene mecanismos para defenderse de estas agresiones, sin embargo, en ocasiones estos mecanismos son insuficientes o no funcionan. En algunos casos la primera mutación es innata y existe en todas las células del individuo, "propensión familiar hacia el cáncer", aunque esta última circunstancia es la menos frecuente y suele dar lugar a cánceres en edades más tempranas.

La aberración cromosómica recurrente, es un marcador de determinados tipos de tumores y su identificación y posterior clonación, han sido muy utilizadas, en el estudio de los tumores linfoides, para la detección de genes relacionados con el fenotipo tumoral (Rabbits, 1994). En los tumores sólidos la caracterización de estas aberraciones cromosómicas se encuentra aun muy retrasada, por la dificultad de trabajar con este tipo de tumores. Se ha observado, sin embargo, una correlación entre la existencia de ciertas aberraciones específicas y la progresión de algún tipo de tumor. Esta relación sugiere que dichas mutaciones estén, probablemente, relacionadas con aspectos del fenotipo de esos tumores (Mitelman, 1994).

Las alteraciones cromosómicas relacionadas con la progresión tumoral, más frecuentemente observadas son: las translocaciones, que suponen el intercambio de fragmentos de un cromosoma con otro; deleciones, que son pérdidas de material genético; las amplificaciones, que son repeticiones sucesivas de una secuencia; las mutaciones puntuales en determinados genes como son *RAS* y *TP53* (P53). En el caso de cánceres asociados a virus, la integración del ADN viral en el genoma celular es una alteración genética adicional.

Los genes que, al estar afectados por alguna de estas alteraciones, conducen a la célula a la proliferación celular, se dividen en dos grandes grupos: oncogenes y genes supresores de tumores. Existen además otros genes que, sin tener una función en la proliferación celular, contribuyen también al desarrollo del cáncer cuando su función o su regulación está alterada. Son los genes responsables del fenotipo metastásico y de malignidad tumoral que aportan a las células cancerígenas la capacidad de abandonar sus tejidos originario, migrar por el torrente sanguíneo, implantarse y proliferar en otros tejidos. La mayoría de los genes de este último grupo son aún desconocidos pues no pueden estudiarse en los sistemas experimentales de transformación en cultivos celulares.

1.1b- Oncogenes y genes supresores de tumores.

Los oncogenes: son genes que tienen un fenotipo dominante y cuya expresión puede producir transformación neoplásica. Existen normalmente en las células como protooncogenes,

pero una mutación que cambie la estructura de la proteína o que aumente su nivel de expresión puede convertirlos en oncogenes transformantes. Las alteraciones genéticas que suelen activarlos son: amplificaciones, que producen aumento de su expresión, y translocaciones. Se distinguen dos tipos de translocaciones: a) Translocaciones en las que la rotura se produce en la secuencia de un gen de cada uno de los cromosomas implicados, dando lugar a un ARNm de fusión que produce una proteína quimérica. Los genes implicados en este tipo de translocación codifican, generalmente, factores de transcripción, y b) Translocaciones en las que se pone en contacto secuencias reguladoras de un gen, con otro gen. Los casos mejor conocidos son las translocaciones que ponen en contacto el promotor del gen de una inmunoglobulina o de un receptor de células T (TCR) con un protooncogén produciéndose la activación de éste (Rabbits, 1994). Los oncogenes fueron los primeros en descubrirse como genes implicados en la progresión tumoral debido a su efecto dominante, es decir, su acción proliferativa se manifiesta aunque solo este mutado un alelo, sin embargo su importancia real en la génesis del tumor humano es menor de lo que se pensó en un principio (Kinzler y Vogelstein, 1995). Ya que muchos de los oncogenes cuya acción se había demostrado en cultivos celulares, no han podido detectarse en ningún caso de cáncer humano.

Los genes supresores de tumores son reguladores negativos del crecimiento celular. Pueden definirse como genes en los que la disminución o pérdida de su función produce progresión neoplásica. El primer gen supresor de tumores descubierto y el prototipo de todos ellos es el gen del retinoblastoma. Se cree que su acción se manifiesta de forma recesiva (solo cuando ambos alelos están mutados). Esto tiene importancia en la predisposición genética hacia el cáncer ya que la persona que nazca con una mutación en un alelo solo necesitará la pérdida del otro alelo en una célula para que esta célula y su progenie inicien la transformación neoplásica. La alteración genética más frecuentemente asociada con la inactivación de los genes supresores de tumores es la deleción, que se manifiesta molecularmente, por la pérdida de heterocigosidad. Así pues, la asociación entre un determinado tipo de tumor y la pérdida específica de material genético se está empleando con éxito para la localización de genes supresores de tumores, la mayoría de los cuales están aun sin identificar (Knudson, 1993).

1.2- EL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

Del 10 al 20% de los cánceres humanos están asociados a la presencia de un virus en el organismo afectado (zur Hausen, 1986); como el virus de la hepatitis B que está asociado a la

aparición de cáncer de hígado, el virus de Epstein-Barr que está asociado a la aparición del linfoma de Burkitt, algunos tipos del virus del papiloma humano (VPH) que están asociados a carcinomas genitales, recientemente se ha detectado una asociación entre infecciones por adenovirus y leucemia juvenil (Dorak, 1996) (Fig. 2)

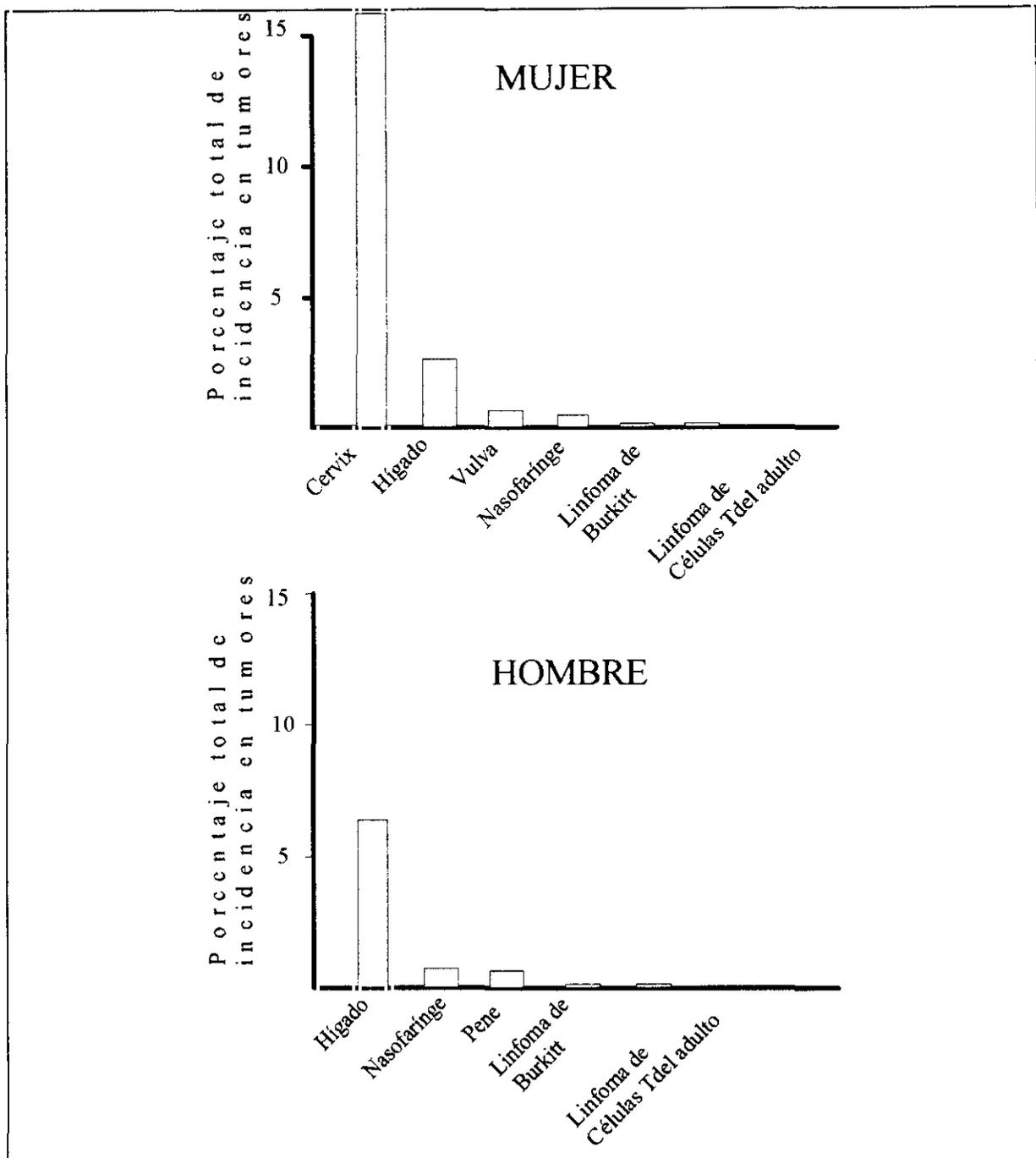


Fig. 2: Incidencia mundial de cánceres humanos asociados a infecciones virales. Los cánceres de cervix, vulvar, nasofaríngeo y de pene, están asociados a la infección por los VPH de alto riesgo, el hepatocarcinoma está asociado a la infección por el virus de la hepatitis B (VHB), el linfoma de Burkitt está asociado a la infección por el virus de Epstein-Barr, la leucemia T del adulto está asociada la infección por el virus de la leucemia T humana tipo I. Gráficas tomadas de zur Hausen, 1986.

1.2a- Biología de los virus del papiloma .

Los virus del papiloma son virus ADN pequeños que infectan las células epiteliales de un gran número de especies vertebradas causando afecciones tumorales, benignas, de la piel, llamadas papilomas. Constituyen una clase independiente de virus, especie-específicos, que poseen un tropismo muy selectivo hacia el tipo de epitelio infectan. Entre ellos; el virus del papiloma humano (VPH), del que se han identificado más de 77 genotipos diferentes casi la mitad de los cuales infectan específicamente los epitelios del tracto anogenital (Myers et al., 1995).

La heterogeneidad de este grupo no se debe a la rápida adquisición de modificaciones genéticas si no a su larga historia como patógenos. Muchos de los distintos genotipos de los virus del papiloma humano surgieron en la etapa prehomínida, esto explica el hecho de que incluso los genotipos menos frecuentes de VPH estén igualmente distribuidos en la población humana del planeta (Zur Hausen y de Villiers, 1994; Matsukura et al., 1995).

En la tabla 1, se muestran muchos de los distintos genotipos del virus del papiloma humano y las lesiones clínicas asociadas a ellos.

Tipo de VPH	Lesión asociada
1	Verruca plantaris
2,4,26,27,29,57	Verruca vulgaris
3,10,28,49	Verruca plana
5,8,9,12,14,15,17,19,20,21,22,23,24,25,36,4	
6,47,50	<i>Epidermodisplasia verruciformis</i>
7	Verruga del carnicero
6,11,54	Condiloma acuminatum
13,32	Hiperplasia focal epitelial
39,55	Papulosis de Bowen
16,18,30,31,33,34,35,39,40,42,43,44	Neoplasia intraepitelial cervical
16,18,31,33,35,39,45,51,52,56	Carcinoma cervical
41,48	Carcinoma cutáneo de célula escamosa
6,11	Papiloma laríngeo
37	Queratoacantoma
38	Melanoma maligno
53	Mucosa cervical normal

Tabla 1: Tabla tomada de Bernard, 1993.

El ciclo de vida del virus del papiloma está ligado a la diferenciación de la célula epitelial, de forma que el virus infecta la célula de las capa inferiores del epitelio que se encuentra en fase proliferativa, la célula al dividirse, provoca la expansión del ADN viral a sus células hijas. El virus

del papiloma retarda la diferenciación de la célula infectada, favoreciendo así su expansión horizontal, en las capas proliferativas del epitelio. En estas capas, tanto la replicación del ADN como la expresión de los genes estructurales de la cápside viral están reprimidos. Al madurar la célula infectada, va ascendiendo a capas más diferenciadas del epitelio, produciéndose entonces un gran aumento en la replicación del ADN viral y el comienzo de la síntesis de las proteínas estructurales, estas proteínas se ensamblan al ADN viral y se forman las partículas infectivas que se liberan al exterior en la capa superior del epitelio (Zur Hausen y de Villiers 1994) (Fig. 3). Por esta razón, para que se produzca la infección, es necesario que exista una rotura del epitelio por la cual puedan ponerse en contacto los virus liberados de las células de la capa cornea con las células de la capa basal. Este tipo de contactos son frecuentes durante la relación sexual, por eso a los virus del papiloma de los genotipos que tienen tropismo por los epitelios del tracto genital, se les considera causantes de infecciones de transmisión sexual (Schiffman, 1994).

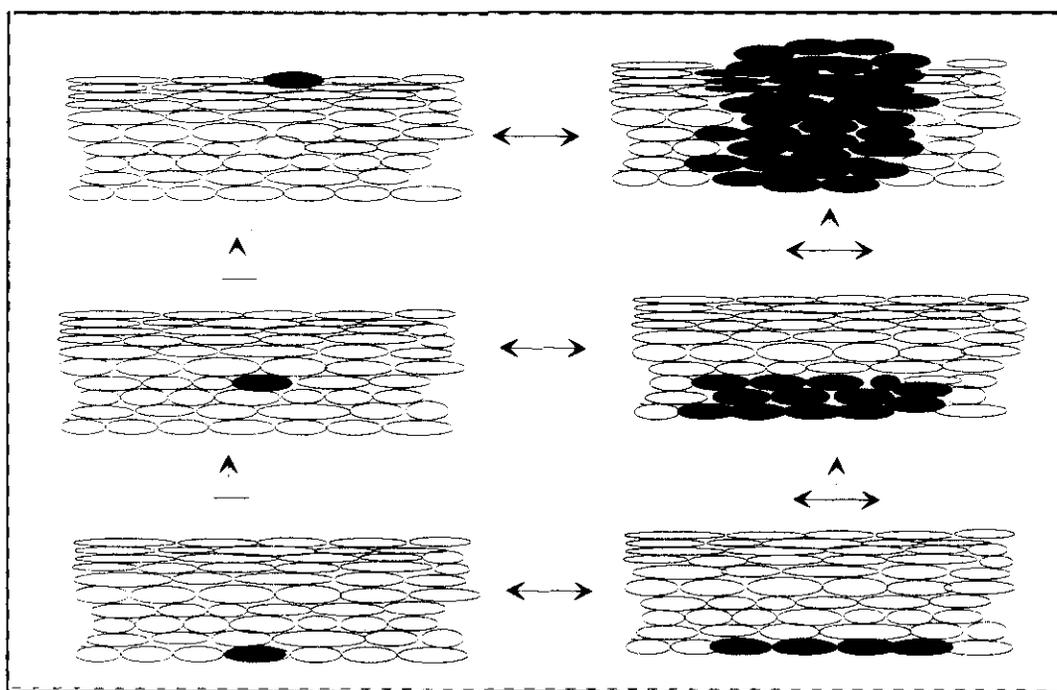


Fig. 3: Representa los fenómenos consecutivos a una infección por VPH. En el lado izquierdo se representa el caso hipotético de que la célula infectada no se dividiera, al terminar su diferenciación los virus se liberarían en la capa superior del epitelio y la infección se perdería. En el lado derecho se representa el caso real, en el que la infección se expande lateralmente, se retrasa la maduración de las células infectadas y existe un gran número de células productoras de virus en la superficie del epitelio (zur Hausen y de Villiers, 1994)

El virus del papiloma fue aislado como partícula viral en 1949 (Strauss et al., 1949) pero su estudio estuvo postergado durante muchos años por no existir un sistema de replicación *in vitro* de estos virus, y por no ser considerados causantes de ninguna patología importante para el hombre. A

Los virus del papiloma de alto riesgo comparten características comunes con otros virus tumorales: largos períodos de latencia (del orden de décadas) desde que se produce la infección hasta que se desarrolla el cáncer, la mayoría de los individuos infectados no llegarán a desarrollar el cáncer en su vida, es necesaria la actuación de cofactores para la inducción carcinogénica, y el tumor que se desarrolla es monoclonal. Estas observaciones subrayan la naturaleza escalonada de la progresión tumoral que hace difícil identificar a determinados agentes virales como factores causantes de un determinado tipo de tumor humano. Los VPH de alto riesgo sin embargo cumplen los postulados requeridos para ser considerados virus tumorales (Zur Hausen, 1991):

1- presencia y persistencia de ADN del virus en las células del tumor maligno y en sus metástasis.

2- Inducción de cambios proliferativos después de la transfección de determinadas secuencias virales en cultivos de las células susceptibles.

3- Demostración de que la inducción de estos cambios en las células transfectadas y del fenotipo maligno de las células tumorales depende de los efectos producidos por el ADN viral persistente.

4- Evidencia epidemiológica de que las infecciones de este virus suponen un factor de riesgo para el desarrollo del tumor.

El virus del papiloma madura de forma paralela a su célula hospedadora del epitelio espinoso. Dadas las dificultades de reproducir *in vitro* las etapas de maduración del epitelio, ha sido muy difícil estudiar la biología de este virus, y hasta 1992 no han podido producirse partículas infectivas *in vitro* (Meyers, et al., 1992), por lo que los investigadores han tenido que valerse de técnicas como la transfección de genes virales en células en cultivo para dilucidar la posible función de las distintas proteínas virales. Ha sido también de gran utilidad el empleo de células tumorales provenientes de cánceres genitales pues en ellas existen secuencias del ADN de los papilomas de alto riesgo integradas en el genoma celular. De estas células se han obtenido a menudo, líneas celulares, entre las que destaca HeLa cuyas células contienen secuencias de VPH18 integradas en tres cromosomas distintos de su genoma (Lazo, 1987a y 1988b) y se emplea en laboratorios de todo el mundo, SiHa que posee secuencias de VPH16 integradas en el cromosoma 13 humano (el Awady et al., 1987), C4I que posee secuencias de VPH18 en la región cromosómica humana 8q22.1 (Gallego et al., 1994) o SW756 que posee secuencias de VPH18 en la región cromosómica 12q13 (Popescu et al. 1990) y es objeto de estudio en este trabajo.

1.2b- Los genes virales.

El genoma de los virus del papiloma consiste en una doble hélice de ADN, circular, de aproximadamente 8000 pares de bases, encapsidado en un icosaedro proteico compuesto por 72 capsómeros. La organización genómica está muy conservada en todos los virus del papiloma y consta de dos dominios funcionales llamados: E (del inglés “early”, tempranos) y L (del inglés “late”, tardíos) conteniendo, cada uno, una serie de marcos de lectura abierta. Solo se transcribe una de las cadenas de la doble hélice por lo que todos los marcos de lectura abierta tienen el mismo sentido de transcripción y a menudo solapan (tabla 2). En el dominio E se encuentran los marcos de lectura abierta de los genes tempranos, que codifican proteínas con funciones reguladoras de la replicación y de la transcripción del ADN viral, o con actividades inmortalizantes de la célula hospedadora. Cada día se conoce más de las proteínas codificadas por estos genes. Los marcos de lectura abierta E1 y E2 codifican proteínas encargadas de la regulación de la transcripción y la replicación. La proteína E2 inhibe la transcripción de los genes E6 y E7 en los VPH16 y VPH18 (Vande Pol et al., 1992). El marco de lectura abierta E5 codifica la proteína con la actividad más transformante en el virus del papiloma bovino tipo 1, sin embargo la proteína E5 de los virus del papiloma humano tiene mucho menor carácter oncogénico y su acción no es necesaria para el mantenimiento del fenotipo transformado, en las células de cáncer genital. Su función está relacionada con la consecución de un ambiente celular adecuado para la multiplicación viral y recientemente se ha detectado un papel de esta proteína en la modulación del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (CMH-I) interrumpiendo el transporte de péptidos TAP1/TAP2, asociado al procesamiento antigénico (Cromme et al., 1994). Los marcos de lectura abierta de los genes E6 y E7 codifican las principales proteínas transformantes en los virus del papiloma humano de alto riesgo (Schneider-Gädicke y Schwarz, 1986; Czegledy et al., 1995). En el dominio L se encuentran los dos marcos de lectura abierta de los genes tardíos, que codifican las dos proteínas estructurales que constituyen la cápside viral: L1 y L2. Entre el extremo 5' del dominio E y el extremo 3' del dominio L existe una región no codificante de unos 900 pb llamada LCR (del inglés “long control region”) o URR (“up stream regulatory region”), en ella se encuentran la mayor parte de los elementos que regulan *in cis* la transcripción y la replicación del ADN viral (Chong, et al., 1991) (Fig. 5 y tabla 2).

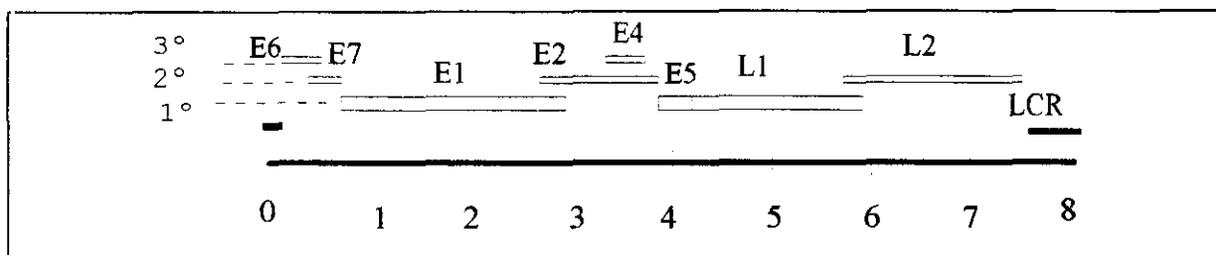


Fig. 5.

Marco de lectura abierto	Función
E1	Replicación del ADN. Tiene secuencias específicas de unión al ADN
E2	Regulación de la transcripción y replicación del ADN. Tiene secuencias específicas de unión al ADN.
E4	Proteína citoplasmática con un posible papel en la desintegración del citoesqueleto
E5	Transformación. Se une a los componentes de las ATPasas H ⁺ vacuolares y a receptores de factores de crecimiento. Afecta a la comunicación intercelular
E6	Transformación por unión a la proteína supresora de tumores p53
E7	Transformación por unión a la proteína supresora de tumores pRB y a otras importantes proteínas
L1	Componente estructural de la cápside viral
L2	Componente estructural de la cápside viral

Fig. 5: Esquema del genoma de VPH18 linealizado, mostrando los marcos de lectura abierta, la disposición de los genes y la región reguladora. Tabla 2 presentando las proteínas del virus del papiloma humano y sus funciones (Ullman y Emery, 1996) Nota: puede haber hasta nueve marcos de lectura abierta en otros virus del papiloma de vertebrados.

En el virus del papiloma humano de alto riesgo las proteínas procedentes de los genes virales E6 y E7 tienen propiedades inmortalizantes y transformantes (Bedell et al., 1987). La transfección del gen E7 de un VPH de alto riesgo en una línea celular establecida de fibroblastos de ratón produce transformación celular es decir: pérdida de la inhibición por contacto, capacidad de crecer en agar blando y capacidad de producir tumores en ratón desnudo. La transfección de los genes E6 y E7 de un VPH de alto riesgo en queratinocitos, humanos, primarios, hospedadores naturales del VPH, es suficiente y necesaria para la inmortalización de estas células, sin embargo este queratinocito inmortalizado no es tumorigénico cuando se le implanta a un ratón desnudo, hecho que está en concordancia con los estudios que indican que la infección por un virus del papiloma de alto riesgo no es suficiente para que se produzca la progresión tumoral y es necesaria

la activación o inactivación de otros procesos celulares, por ello la existencia de cofactores es importante en la carcinogénesis de cuello uterino (Pirisi et al., 1988; Chen et al., 1993).

La característica bioquímica que mejor se correlaciona con las propiedades inmortalizantes y transformantes de los VPH de alto riesgo es la capacidad de las proteínas E6 y E7 de inactivar funcionalmente a las proteínas supresoras de tumores p53 y pRB respectivamente (Werness et al. 1990; Dyson et al., 1992). La proteína E7 de los VPH de alto riesgo se une a la proteína pRB con una afinidad 10 veces mayor que la proteína E7 de un VPH de bajo riesgo (Huibregtse y Scheffner, 1994).

La proteína E7 del VPH de alto riesgo tiene características comunes con las proteínas oncogénicas de otros virus tumorales animales como son: la proteína E1A de Adenovirus y la proteína TAg de Sv40. Todas estas proteínas se unen preferentemente a la forma defosforilada de la proteína pRB que está presente entre las fases G0 y G1 del ciclo celular (Phelps et al., 1992). La proteína pRB es capaz de inhibir la proliferación celular por unión al factor de transcripción E2F, implicado en la transcripción de muchos genes que intervienen en la replicación del ADN. Cuando la forma defosforilada de pRB se une a la proteína E2F, este factor de transcripción no puede realizar su función, así se bloquea el ciclo celular en este punto de una manera fisiológica, sin embargo, cuando la proteína E7 del virus del papiloma secuestra a la proteína pRB, E2F activa la transcripción de ciertos genes, a consecuencia de esto se produce la progresión del ciclo celular (revisado por Huibregtse y Scheffner, 1994).

La proteína viral E6 puede formar complejos con p53, mediados por la proteína E6-AP, y promover la degradación de p53 vía proteólisis de la ubiquitina aunque también se ha encontrado una inhibición directa de la actividad de la proteína p53 por la proteína viral E6 en sistemas *in vitro* carentes de proteína E6-AP (Thomas et al., 1995). La proteína p53 actúa sobre la célula que tiene el ADN dañado de dos posibles maneras: (1) Deteniendo el ciclo celular en la fase G0-G1, hasta que el daño genético sea reparado, activando una ruta en la que también está implicada la proteína pRB. (2) Provocando la muerte celular programada bien en la fase G1 o en la fase G2 del ciclo celular.

Recientemente se ha detectado una actividad activadora de la telomerasa en la proteína E6, que podría tener un efecto positivo sobre la inmortalización celular independiente del secuestro de la p53 (Klingelhutz, et al., 1996).

Las células que portan estas dos oncoproteínas E6 y E7 tienen dañado el sistema de comprobación y reparación del ADN por lo que son susceptibles de acumular mutaciones alguna

de las cuales puede ser seleccionada por producir ventajas proliferativas (zur Hausen, 1994; zur Hausen y de Villiers, 1994)

1.2c- Integración del ADN del VPH en el genoma humano.

El virus del papiloma replica su ADN en el núcleo celular permaneciendo siempre en forma extracromosomal. En su ciclo vital no existe ninguna etapa en la que el ADN viral tenga que integrarse en el genoma celular. Sin embargo, en el 90%-99% de los casos de carcinomas genitales analizados, se han encontrado secuencias de VPH de alto riesgo integradas en el genoma celular. La integración es un fenómeno aberrante producido por recombinación ilegítima entre el ADN viral y el genoma celular. Este fenómeno se ha relacionado con la progresión maligna del tumor ya que el ADN viral integrado es un marcador clonal de las células de cada tumor (Lazo, 1988a). La observación de una población clonal es el resultado de una fuerte selección por las consecuencias biológicas de esa integración. Esas consecuencias pueden estudiarse desde dos aspectos diferentes: desde el punto de vista de los genes virales y desde el punto de vista del genoma hospedador.

Desde el punto de vista de los genes virales: se ha observado la selección de ciertos genes como E6 y E7 cuyos marcos de lectura abierta están conservados en todos los casos de carcinoma, con integración de secuencias de VPH, estudiados y una selección negativa como la del gen E2 que se encuentra deletado total o parcialmente y no se transcribe en ningún caso (zur Hausen, 1991). Esta observación estaría de acuerdo con la naturaleza selectiva de la progresión tumoral ya que las proteínas E6 y E7 tienen una actividad estimuladora de la proliferación celular mientras que la proteína E2 tiene una actividad represora de la transcripción de los genes E6 y E7 (Romanczuk et al., 1992; Hwang et al., 1995). El efecto que la expresión de los oncogenes virales E6 y E7, integrados en el genoma de la célula hospedadora, tienen sobre la estimulación de la proliferación celular ha sido el aspecto más estudiado en el fenómeno de la transformación maligna por el virus del papiloma humano.

El estudio de los efectos biológicos del fenómeno de la integración viral desde el punto de vista del *locus* de integración en el genoma hospedador y el efecto que producen los promotores virales sobre los genes celulares cercanos, ha sido mucho menos estudiado dada su complejidad, pues hasta el momento actual no han empezado a existir mapas de los cromosomas con suficiente número de marcadores genéticos. La primera aproximación a este estudio la realizaron los citogenetistas, que por medio de la hibridación *in situ* de cromosomas con sondas virales

localizaron las regiones de integración viral en algunos casos de carcinomas genitales y de líneas celulares derivadas de estos. Observando que la integración se producía en regiones cromosómicas repetidas en distintos tumores (Couturier et al., 1991, Lazo et al 1992).

casos	Region	Tipo de virus	loci cromosómico	Otros Tumores
1	2p14	VPH18	<i>NMYC, FRA2C</i>	neuroblastoma, carcinoma de pulmón
1	3p14.2	VPH18	<i>ERBA2, FRA3B, FHIT</i>	Linfoma no hodgkin, adenocarcinoma, adenoma pleomórfico carcinoma de pulmón
1	3q25	VPH16	<i>RAF1</i>	Posiblemente en carcinoma de célula escamosa.
1	5p11-15	VPH18	<i>FRA5A y B, MLV12, GHR</i>	Adenocarcinoma
1	8q22,1	VPH18	<i>MYBB, FRA18A y B</i>	Leucemia mielóide aguda
5	8q24	VPH16 VPH18	<i>CMYC, PAL1, MLV11/4 FRA8C/D/E</i>	Linfoma de Burkitt, leucemia linfoblástica aguda, linfoma maligno, carcinoma renal familiar
1	9q31-34	VPH18	<i>CABL, FRA9B/E</i>	leucemias
2	12q14-15	VPH16 VPH18	<i>GADD153 (CHOP), MDM2, RAP1B, HMGI-C</i>	Melanoma, lipoma, liposarcoma, glioma, leiomiomasarcoma, adenoma pleomórfico, linfoma de células T
1	13q21-31	VPH16	<i>ERC CS, FRA13B/C</i>	
1	22q12-13	VPH18	<i>BCL-2, FRA22A, PDGF, LIF, MGCR. homólogo V-yes</i>	Neuroepitelioma, meningioma, sarcoma de Ewing, leucemia

Tabla 3: Tabla que resume los datos de localización del locus de integración viral de distintos casos de carcinomas genitales y de líneas celulares derivadas de estos, en la misma tabla se citan algunos de los oncogenes y sitios frágiles que han sido mapeados en el mismo locus cromosómico y otros tipos de tumores que están relacionados con anomalías en esa misma región cromosómica. (modificado a partir de la tabla de Lazo et al., 1992).

Los sitios de integración de virus tumorales suelen coincidir con sitios frágiles cromosómicos¹ (Popescu et al., 1990; Wilke et al., 1996) y con zonas del cromosoma con

¹ Los sitios frágiles cromosómicos comunes, son lugares sensibles a la formación de rupturas en el ADN cuando la replicación del genoma se perturba con afidicolina o deficiencia de folato. El mecanismo por el que se producen las rupturas es desconocido. No se ha podido demostrar una función biológica de estos sitios frágiles aunque pueden estar involucrados mecanísticamente en las deleciones observadas en muchos tumores Wilke et al., 1996.

hipersensibilidad a la ADNasa I, seguramente por ser regiones más accesibles o más permisivas para la recombinación con un ADN extraño (Lazo, 1987b; Gallego et al., 1994). Sin embargo se ha observado también, la existencia de uno o varios oncogenes y otros genes relacionados con la progresión tumoral en prácticamente todas las regiones cromosómicas en las que se han localizado secuencias virales integradas, lo que podría sugerir una activación en *cis* de dicho protooncogen por los promotores virales, como pudo deducirse de la sobreexpresión del gen *c-MYC* en uno de los cinco casos de carcinoma de cervix en los que las secuencias virales estaban integradas en la región cromosómica 8q24 (Couturier et al., 1991; Dürst et al., 1987, Wilke et al, 1996). En estos casos la integración viral podría considerarse una alteración distinta a la translocación pero con consecuencias biológicas similares, por ello el ADN viral integrado puede ser un llamativo marcador para la localización y clonación de *loci* oncogénicos (Lazo et al, 1992).

Esta hipótesis se ha visto recientemente reforzada, por el clonaje posicional del gen *FHIT* en el sitio frágil *FRA3B*. *FHIT* es un gen candidato a ser responsable de la progresión tumoral temprana en una gran variedad de carcinomas (Ohta et al, 1996; Sozzi, G et al., 1996). La localización de secuencias de VPH18 integradas también, en el *locus* *FRA3B* en un carcinoma de cervix (tabla 3) (Wilke et al, 1996), hace probable que las secuencias virales, o las aberraciones genómicas provocadas por la integración viral estén ejerciendo un efecto sobre el gen *FHIT*, y esta alteración constituya uno de los “eslabones” en la progresión de dicho tumor, si bien la clonación del gen *FHIT* es tan reciente que aun no ha habido tiempo de estudiar dicho efecto.

1.3- REGIÓN CROMOSÓMICA 12Q13-15.

Multitud de estudios citogenéticos han implicado firmemente alteraciones en la región 12q13-q15 del cromosoma 12 humano con el desarrollo de una gran variedad de tumores sólidos malignos y benignos, sugiriendo la existencia, en esta región, de genes responsables del desarrollo tumoral. Tumores malignos con aberraciones recurrentes en 12q13-15 incluyen: liposarcoma mixoide, sarcoma de las células claras del tejido blando y un subgrupo del rhabdomioma. El gen del cromosoma 12q responsable de la progresión del liposarcoma mixoide, ha sido identificado como el gen *GADD153*, que codifica la proteína CHOP, un miembro de la familia C/EBP de factores de transcripción inducibles por ADN dañado (Croizat et al., 1994). El gen de la región 12q13-15 alterado en sarcomas del tejido blando es el gen del factor de transcripción ATF-1 (Zucman et al., 1993). Entre los tumores benignos la alteración de la región 12q13-q15 se observa

frecuentemente: en tumores de tejido adiposo, en leiomiomas uterinos y en adenomas pleomórficos de las glándulas salivares (Schoenmakers et al., 1994). Alteraciones en esta región se han descrito también en pólipos del endometrio, en un subgrupo de hemangiopericitomas, en tumores condriomatosos, en hamartomas condroides pulmonares y casos aislados de tumores benignos de mama, astrocitoma difuso y osteoclastomas (Schoenmakers et al., 1995 a y b). Aunque las aberraciones cromosómicas en todos estos tumores benignos han sido definidas citogenéticamente, los genes no han sido aun identificados. Recientemente se ha identificado en 12q13-15 una región de unas 1,7 Mb, de altísima incidencia en aberraciones genéticas relacionadas con la patología de tumores benignos de tipo mesenquimal, entre los sitios de secuencia localizada STSs (“sequence-tagged sites”) STS 12-RM36 y STS 12-RM103. A esta región se le ha llamado región MAR (“multiple aberration region”) y en ella se ha identificado una zona de 445 kb a la que se le ha llamado ULCR12 (“uterin leiomioma common region-12”) que comprende el punto de recombinación de las translocaciones de una amplia variedad de tumores sólidos benignos como los leiomiomas uterinos o los lipomas (Schoenmakers et al., 1995a, Van de Ven et al., 1995). La región ULCR12 ha sido finamente mapeada y en ella se ha identificado un gen candidato a ser responsable de la proliferación de estas lesiones benignas, el gen *HMGI-C*, pues se ha descubierto que este gen está localizado en el punto de recombinación de las translocaciones que se encuentran en estos tumores, quedando el gen interrumpido después del tercer exon (Ashar et al. 1995; Schoenmakers et al., 1995). La proteína HMGI-C pertenece al grupo de las proteínas de alta movilidad (HMG), caracterizadas por tener función estructural en la conformación de la cromatina. El origen de los lipomas y otros tumores benignos parece ser la generación de proteínas de fusión en las que el dominio de unión al ADN de la proteína HMGI-C está unido a un dominio regulador de otro gen situado en el cromosoma con el que ha ocurrido la translocación.

En la región cromosómica 12q13-15 se ha descrito también, la presencia de secuencias del virus de la hepatitis B integradas, en un caso de carcinoma hepático (Matsubara y Tokino, 1990), secuencias de VPH16 en un caso de una lesión premaligna de vulva de la que se obtuvo la línea celular SK-v (Schneider-Manoury et al., 1987; Sastre-Garau et al., 1990; 1995) y secuencias de VPH18 en la línea celular SW756 derivada de un carcinoma de cervix (Popescu et al., 1987).

La detección de tal variedad de aberraciones cromosómicas en la región 12q13-15 en distintos tipos de tumores indica que esta región es rica en genes relacionados con el fenotipo tumoral, entre ellos están los genes de receptores de membrana como WTN1, dos genes de miembros de la superfamilia cuatro de proteínas de transmembrana (proteínas implicadas en el

control de la proliferación celular): *SAS* y *ME491*, los genes de dos quinasas dependientes de ciclina *CDK4* y *CDK2* (reguladoras del ciclo celular), el oncogén *MDM2* (cuya proteína interacciona con p53), genes de factores de transcripción como *GLI1*, *CHOP* y *ATF-1*, genes de proteínas de la cadena de transducción de señales como *RAP1B*, estas proteínas y sus funciones se resumen en la tabla 4. En la región 12q13-15 se ha descrito, además, pérdida de heterocigosidad en seminomas, gliomas y cáncer de próstata, indicando la posible presencia de un gen supresor de tumores (Bérubé et al., 1994; Murty et al., 1994).

Gen	Descripción	Referencia
<i>AQP2</i>	Acuoporina 2	Deen et al., 1994
<i>ATF-1</i>	Factor de transcripción	Zucman et al., 1993
<i>CDK2</i>	Quinasa -2 de ciclina	Demetrick et al., 1994
<i>CDK4</i>	Quinasa -4 de ciclina	Demetrick et al., 1994
<i>CNIN-1</i>	Contactina	Berglund et al., 1994
<i>GADD153</i>	Factor de transcripción	Crozat et al., 1993
<i>DAGK</i>	Diacilglicol quinasa	Hart et al., 1994
<i>ERBB3</i>	Receptor del factor de crecimiento epidermal	Kraus et al., 1989
<i>GLI</i>	protooncogen	Kinzler et al., 1988
<i>GT</i>	Glutacion transferasa	Board et al., 1992
<i>HMGI-C</i>	proteína estructural del ADN	Ashar et al., 1995
<i>ITGA7</i>	Integrina 7	Wang et al., 1995
<i>KT-II</i>	grupo de genes de Queratinas tipo II	Rosenberg et al., 1991
<i>MDM2</i>	proteína asociada a p53	Oliner et al., 1992
<i>ME491</i>	Antígeno de membrana	Hotta et al., 1989
<i>RAP1B</i>	miembro de la familia de oncogenes <i>RAS</i>	Rousseau-Merrck et al., 1990
<i>RARG</i>	Receptor gamma del ácido retinoico	Lehmann et al., 1991
<i>SAS</i>	Secuencia amplificada en sarcomas	Jankowski et al., 1994
<i>SPI</i>	Factor de transcripción	Gaynor et al., 1993
<i>WNT-1</i>	Factor de crecimiento	van't Veer et al., 1984

Tabla 4 conteniendo muchos de los genes que han sido localizados en la región cromosómica humana 12q13-15. A algunos de ellos tales como: *Gli*, *ATF-1*, *GADD153*, *MDM2*, *SAS*, *CDK2*, *CDK4* y *HMGI-C* se les ha podido relacionar con el fenotipo de uno o más tipos de tumor.

En los últimos años un grupo de laboratorios está implicado en la realización de una empresa común; la construcción de un mapa genómico del cromosoma 12 humano. Esta iniciativa integrada en el proyecto "Genoma Humano" ha producido ya importantes resultados de gran utilidad para todos los estudiosos de la genética humana. Se han producido genotecas específicas

del cromosoma 12, en cromosomas artificiales de levadura (YAC), como la genoteca de YACs CEPH A (Albertsen et al., 1990) o la genoteca de mega-YACs CEPH II, o en vectores cosmidicos LL12NC01 (Montgomery et al., 1993) y se han localizado y secuenciado millares de fragmentos pequeños de ADN codificantes (ESTs) y no codificantes (STSs) que sirven de puntos de referencia a lo largo de todo el cromosoma (Dib et al., 1996). En la actualidad se conoce el orden en el que grandes fragmentos de ADN del cromosoma 12, clonados en cromosomas artificiales de levadura, se suceden y se solapan recorriendo prácticamente todo el cromosoma 12, constituyendo el mapa físico del cromosoma 12 (Krauter et al., 1995; AECOM/YALE GESTEC, 1995). Gracias a la información existente a cerca del mapa físico y genético del cromosoma 12, en concreto al mapa detallado de la región ULCR12, constituido por 60 cósmidos solapantes ordenados, por 38 STSs y por el mapa de restricción de largo alcance de este área (Schoenmakers et al., 1995), ha podido localizarse con precisión el *locus* de integración del ADN viral en la línea celular SW756 (PAL2) y hallar la distancia a los genes conocidos más cercanos, como se detallará en el capítulo de “Resultados”, información necesaria para poder estudiar la posible acción de los genes virales sobre los genes celulares adyacentes.

1.4- LA LÍNEA CELULAR SW756

La línea celular SW756 establecida por Freedman y colaboradores en 1982 a partir de un carcinoma de cervix posee secuencias de VPH18 integradas en el genoma celular (Schwarz et al., 1985). Popescu y colaboradores determinaron en 1987, por medio de la hibridación *in situ* de cromosomas, la localización de estas secuencias virales en un único *locus* cromosómico en la región 12q13. (estos mismos autores cedieron, amablemente, dicha línea celular a nuestro laboratorio para la clonación molecular y caracterización del *locus* de integración viral). Previamente otro laboratorio había estudiado la transcripción de los genes virales en esta línea SW756 y en otras líneas que poseían secuencias de VPH18 integradas en el genoma celular (Schneider-Gädicke et al, 1986) detectando que solo los genes virales tempranos E6, E7 y E1 se transcriben en la línea celular SW756. En 1987 Seedorf y colaboradores detectaron por medio del análisis de Western la presencia de la proteína viral E7 en las células de esta línea celular. Poco antes de la conclusión de este trabajo Sastre-Garau y colaboradores (1995) repitieron la hibridación *in situ* de cromosomas realizada por Popescu y colaboradores (1987) usando tecnología más avanzada y determinaron que el *locus* de integración de las secuencias de VPH18 en la línea celular

procedente de carcinoma de cervix SW756 estaba situado en la región cromosómica 12q14-15, al igual que el locus de integración del ADN de VPH16 en la línea celular SK-v.

1.5- OBJETIVOS:

En este trabajo se pretende clonar y caracterizar el *locus* de integración de VPH18 en la región cromosómica 12q13-15, presente en la línea celular derivada de un carcinoma de cervix SW756, así como la región diana correspondiente, en un cromosoma normal o no-ocupado, para poder estudiar el tipo de recombinación que tuvo lugar en este *locus* y el efecto que el ADN viral haya podido ejercer sobre la expresión de los genes cercanos, en un intento de determinar el papel del *locus* cromosómico de integración del ADN viral, en la progresión tumoral, sabido que la expresión de los genes virales E6 y E7 no es suficiente para explicar la transformación maligna de la célula infectada.

Es importante averiguar la distancia real entre el *locus* de integración de las secuencias de VPH18 en el genoma de la línea celular SW756 (al que se le ha llamado *PAL2*) y el *locus* de integración del genoma de VPH16 en la línea celular SK-v, y esto se realizará en un próximo estudio, ya que la repetición de alteraciones genéticas en una región cromosómica, en distintos casos de un mismo tipo de tumor es una clave para la identificación de genes relacionados con la progresión de dichos tumores, pues teniendo en cuenta el tamaño del genoma humano es poco probable que la coincidencia de estos dos *loci* de integración viral se deba solo al azar.

2.- MATERIAL Y MÉTODOS

2.1- CULTIVOS CELULARES.

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron líneas celulares humanas de distinto origen: líneas celulares de carcinoma de cervix: SW756 (Freemann et al., 1982) y C4I (Auersperg et al., 1962), SiHa (Friendl et al. 1970) y HeLa (Gey et al, 1952), de sarcomas: OSA y RMS-13 (Roberts et al., 1989), de carcinoma de colon: Colo 320 (Quinn et al., 1979) y de linfoma de Burkitt: Ramos (Klein et al., 1975) y Molt 4 (Minowada et al., 1972).

Las líneas celulares se cultivaron en el medio apropiado que para SiHa, SW756, C4I y era Dulbecco's Modification of Eagle's Medium y para Colo 320, OSA, RMS-13, Ramos y Molt 4 era el medio RPMI 1640. Al medio de cultivo se le suplementó en todos los casos con: suero bovino fetal, al 10%, L-glutamina a concentración 2,5 mM, y tres antibióticos (penicilina a concentración 50 UI/ml, estreptomicina a concentración 50 mg/ml, kanamicina 50 mg/ml). Todos los reactivos mencionados fueron provistos por la casa Flow.

Las líneas celulares se cultivaron a 37° C, en atmósfera de CO₂ al 5% y 98% de humedad, según se describe en Hershey (1987). Las líneas celulares procedentes de carcinoma y sarcoma, crecen en monocapa empleándose tripsina al 0,05% y EDTA al 0,02% para despegarlas del recipiente.

Para su almacenamiento permanente, 3.10⁶ células se congelaron en su propio medio suplementado con suero bovino fetal y con 9 % de DMSO y se guardaron en N₂ en criotubos de la casa Nunc.

2.2- EXTRACCIÓN DE ADN DE ALTO PESO MOLECULAR DE CÉLULAS EN CULTIVO.

El ADN celular, genómico, fue extraído de 2,6×10⁷ células crecidas en monocapa o crecidas en suspensión y posteriormente precipitadas. Las células se lavaron con PBS y se lisaron con 5 ml de **tampón de extracción de ADN*** al que se le añadió SDS al 1%, proteinasa K a 25 µg/ml, y ARNasa A a 30 µg/ml, incubándose la mezcla a 37° C durante 60 minutos.

El lisado se extrajo con suavidad: 4 veces con fenol y 2 veces con cloroformo y se precipitó con NaCl a concentración 0,1M y dos volúmenes de etanol. El ADN que formó un ovillo blanco se rescató con la punta de una pipeta pasteur se lavó con etanol al 70%, se secó y fue resuspendido en 1 ml de tampón TE, calculándose su concentración a partir de la medida de su absorbancia, en espectrofotómetro, a longitud de onda 260 nm y 280 nm

Tampón de extracción de ADN: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) y 10 mM EDTA.

2.3- OBTENCIÓN DE ARN DE CÉLULAS EN CULTIVO.

2.3a- Extracción del ARN celular con el reactivo TRIzol® de Gibco BRL.

Partiéndose de células confluentes, en monocapa, libres de sobrenadante, se añadió 1 ml, por cada 3,5 cm de diámetro de placa, del reactivo TRIzol® (de la firma comercial Gibco BRL) que las lisó, pasándose la mezcla a un tubo de 1,5 ml. Se centrifugó decantándose el TRIzol® del sobrenadante acuoso, que contenía el ARN, a éste se le volvió a extraer con un volumen igual de TRIzol® repitiendo la operación, finalmente se obtuvo el ARN del sobrenadante acuoso por precipitación con isopropanol. El precipitado se lavó con etanol al 75% y fue resuspendido en 50 µl de agua destilada y tratada con DEPC. La concentración del ARN se obtuvo a partir de su absorbancia medida a 260 nm y a 280 nm de longitud de onda.

2.3b- Extracción de ARN de gran pureza por Tratamiento con tiocianato de guanidinio y centrifugación en solución de CsCl.

Este método tomado de Sambrook et al., (1989) fue empleado por ofrecer la posibilidad de obtener un ARN de mayor pureza que el reactivo de TRIzol®, si bien, es un método muy laborioso.

El ARN total fue extraído de células confluentes en monocapa, o de células en suspensión, después de ser sedimentadas por centrifugación. Las células se lavaron con PBS y se lisaron con **solución de tiocianato de guanidinio*** usando un volumen de 1 ml por cada placa de 25 cm².

Se pasó la mezcla a un tubo de 50 ml y se homogeneizó haciéndola pasar repetidas veces por una aguja de 23 G con jeringa. Al homogenado se le añadió el detergente lauril sarcosinato sódico a una concentración final de 0,5%, pasándose la mezcla a un tubo de ultracentrífuga, de rotor tipo SW40, en el que se había previamente colocado 3,5 ml de una solución de 5.7 M CsCl en 0,01 M EDTA (pH 7,5) que actuaría como "colchón" que detendría los contaminantes del ARN. Se centrifugó durante 24 horas a 32.000 r.p.m., en ultracentrífuga Beckman, obteniendo un precipitado de ARN en el fondo del tubo, que fue lavado con etanol al 70% y resuspendido en 200 µl de TE con SDS al 0,1%, pasándose a un tubo de 1,5 ml donde volvió a precipitarse con etanol. El ARN seco, se resuspendió en 50 µl de TE, determinándose su concentración a partir de la absorbancia medida a 260 nm y 280 nm.

***Solución de tiocianato de guanidinio:** 40 M de tiocianato de guanidinio, 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5), 1% β -mercaptoetanol.

2.4- ANÁLISIS DE ADN GENÓMICO POR LA TÉCNICA DE “SOUTHERN”.

2.4a- Electroforesis de ADN genómico eucariótico digerido.

Se realizó un gel de agarosa al 0,8% en tampón 1 X TAE de 20 cm de longitud, cargándose en cada pocillo 10 μ g de ADN genómico digerido con una endonucleasa de restricción y usando un pocillo para cargar 1 μ g de marcador que en la mayoría de los casos era ADN de fago lambda digerido con la endonucleasa *Hind* III. La electroforesis se realizó a 30 V, durante unas 20 horas, después de las cuales se fotografió el gel teñido con bromuro de etidio junto a una regla, para poder medir la distancia de migración de las bandas de ADN.

2.4b- Transferencia y fijación del ADN del gel a la membrana de nylon N⁺.

Para el análisis del ADN genómico basado en la técnica descrita por Southern et al., (1975), se usaron membranas de nylon Hybond® N⁺ cargadas positivamente pues fijan con mayor eficiencia el ácido nucleico.

El ADN se transfirió a la membrana por medio de una solución salina neutra por lo que era necesario la previa desnaturalización del ADN, en sus dos cadenas, con una solución alcalina: 0,5M de NaOH, 1,5M NaCl, seguido de una neutralización en una solución: 1M Tris (pH 7,5), 1,5M NaCl. Después de lo cual se transfirió el ADN a la membrana por capilaridad durante 14 horas usando 20 X SSC como tampón de transferencia.

Para fijar el ADN a las membranas de nylon, Hybond N⁺, de la casa Amersham, se las humedeció durante 20 minutos en NaOH 0,4M, neutralizando después con tampón 5 X SSC.

2.4c- Prehibridación e hibridación en el análisis de “Southern”.

La prehibridación se llevó a cabo en la solución de prehibridación a 65°C durante 4 horas. La hibridación se llevó a cabo en la **solución de prehibridación con dextrán sulfato*** a 65°C durante 16 horas. La solución de hibridación es igual a la solución de prehibridación más la sonda radiactiva a concentración 5×10^6 cpm/ml.

***Solución de prehibridación con dextrán sulfato:** 3 X SSC, SDS al 1%, dextrán sulfato al 5%, Denhardt's al 1%, ADN desnaturalizado de esperma de salmón 250 µg/ml.

2.4d- Marcaje de la sonda radiactiva por el método de cebador aleatorio.

El fragmento de ADN desnaturalizado en sus dos cadenas, se marcó con P³²-αdCTP, por el método de "random primer" o ADN-cebador aleatorio (Feinberg y Vogelstein 1983), siendo los reactivos empleados: dNTPs, ADN cebadores y subunidad Klenow de la ADN polimerasa, provistos por la casa Boehringer Mannheim o Amersham. Las sondas se purificaron a través de una columna de Shephadex G-50® de Pharmacia.

2.4e- Lavados en el análisis de "Southern".

Los filtros se lavaron 2 veces, durante 15 minutos, a 60°C, en la **solución I de lavado*** y dos veces, durante 30 minutos a 60°C en la **solución II de lavado***.

***Solución I de lavado:** 2 X SSC, 0,1% SDS.

***Solución II de lavado:** 0,02 X SSC, 0,1% SDS.

2.5- ANÁLISIS DEL ARNm POR LA TÉCNICA DE "NORTHERN".

2.5a- Electroforesis de ARN en geles de agarosa conteniendo formaldehido.

Este método ha sido adaptado a partir del descrito por Lehrach et al., (1977),

Se preparó un gel de agarosa al 1,3% en 1 X **tampón de MOPS*** y conteniendo formaldehido a concentración de 2,2M.

Las muestras de ARN se prepararon en tubos de 1,5 ml calentando 5 minutos a 65° C la siguiente mezcla: 4 µl de ARN celular total (10 µg), 1 µl de 10 X tampón de MOPS, 3,5 µl de formaldehido, 10,0 µl de formamida. Las muestra se enfriaron después en hielo, se las añadió colorante de bromofenol y xilencianol y se las cargó en el gel.

La electroforesis se realizó en 1 X tampón de MOPS a 3-4 V/cm durante unas 3 horas. Una de las muestras de ARN que no iba a transferirse a membrana, se usó como marcador tiñéndose con bromuro de etidio y fotografiándose junto a una regla.

***10 X tampón de MOPS:** 0,4 M MOPS (pH 7,0), 80 mM acetato sódico, 10 mM EDTA (pH 8,0), en agua tratada con DEPC.

2.5b- Transferencia y fijación del ARN a la membrana.

El resto de las muestras se transfirieron a membrana Hybond®, de nylon, por capilaridad, usando tampón 20 X SSC como agente eluyente.

El ARN se fijó a la membrana de nylon por calor, sometiéndola a 80° C durante 1,5 horas.

2.5c- Prehibridación e hibridación en el análisis de "Northern".

La prehibridación se llevó a cabo a 65°C durante 4 horas en la **solución de prehibridación con fosfato sódico***. La hibridación se llevó a cabo durante 18 horas a 65°C en la solución de hibridación que es igual que la solución de prehibridación pero a demás contiene la sonda radiactiva, marcada por la técnica de "random primer", a una concentración de $1 \cdot 10^6$ cpm/ml.

***Solución de prehibridación con fosfato sódico:** BSA al 1%, SDS al 7%, 0,5M Na₂HPO₄ (pH 7,2), 100 µg/ml de ADN desnaturalizado de esperma de salmón.

2.5d- Lavados en el análisis de "Northern".

Se realizaron 3 lavados de 1/2 hora cada uno a 65°C en soluciones con distinta concentración de tampón fosfato.

Solución del primer lavado: 0,5M Na₂HPO₄ (pH 7,2), 1% SDS, 1 mM EDTA.

Solución del segundo lavado: 0,2M Na₂HPO₄ (pH 7,2), 1% SDS, 1 mM EDTA.

Solución del tercer lavado: 0,1M Na₂HPO₄ (pH 7,2), 1%M SDS, 1 mM EDTA.

2.6- PREPARACIÓN, A GRAN ESCALA, DE ADN DE BACTERIÓFAGO LAMBDA.

2.6a- Infección a baja multiplicidad.

El lisado a gran escala se hizo por infección de las bacterias a baja multiplicidad, partiendo de 10^{10} bacterias *E.coli* de la estirpe XL1-Blue MRA, resuspendidas en 3 ml de tampón TM y se las infectó con $5 \cdot 10^7$ ufp. de fago lambda incubándolos juntos a 37° C durante 20 minutos con agitación

intermitente. se diluyó esta mezcla en 500 ml de medio LB- 10 mM MgSO₄ y se incubó, con gran agitación, a 37° C unas 9 horas hasta que los filamentos de ADN de las bacterias lisadas fueron visibles. El cultivo se trató con cloroformo para terminar de lisar las bacterias y se procedió a la purificación del fago en suspensión.

2.6b- Purificación del bacteriófago lambda.

El lisado se incubó con ADNasa I y con ARNasa A, a concentración final de 1 µg/ml y se le añadió NaCl a concentración 1M. Se centrifugó para desechar los filamentos bacterianos y se añadió polietilenglicol (PEG) 8000 a una concentración final del 10% para que precipitaran las partículas de fago. Después de centrifugar en frascos de 250 ml, en rotor GSA de centrífuga Sorvall, a 11000g, durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado de bacteriófagos y PEG en tampón TM. El polietilenglicol se extrajo entonces de la suspensión de fagos añadiendo un volumen de cloroformo agitando insistentemente y centrifugando. Al sobrenadante acuoso, conteniendo las partículas de fago, se le añadió CsCl a 0,5 gr/ml, y se depositó, cuidadosamente, en un gradiente de CsCl que se había preparado, previamente, en un tubo de ultracentrífuga.

El gradiente es discontinuo y consta de soluciones de CsCl en tampón TM, a tres densidades que de abajo a arriba son: 1,70 g/l; 1,50 g/l; 1,45 g/l.

El gradiente fue centrifugado a 22,000 r.p.m., 2 horas, en un rotor SW40 para ultracentrífuga Beckman. Las partículas de fago formaron una banda ligeramente azulada en la interfase de las soluciones de densidades 1,50 g/l y 1,45 g/l y se extrajeron del gradiente pinchando con aguja de 21 G a la altura de la banda.

2.6c- Extracción de ADN del bacteriófago lambda.

La suspensión de fagos en CsCl se dializó frente a 1000 veces su volumen del siguiente tampón: 10 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂.

La suspensión de fagos se trató ésta con proteinasa K en 20 mM EDTA y 0,5% SDS. Extrayéndose después la solución con: fenol, fenol:cloroformo y cloroformo:isoamílico.

La solución de ADN de fago se dializó con tres cambios de tampón TE, en 1000 veces su volumen, a lo largo de 18 horas. Finalmente se obtuvo una solución de ADN de bacteriófago en

tampón TE cuya concentración pudo medirse por comparación a un ADN-patrón en electroforesis en gel de agarosa.

2.7- PREPARACIÓN DE UNA GENOTECA EN BACTERIÓFAGO LAMBDA DASH II.

Este método fue tomado del publicado por Maniatis et al., (1978).

2.7a- Digestión del bacteriófago con la endonucleasa de restricción *EcoR I*.

100 µg de ADN del fago lambda Dash II fueron digeridos con 300 unidades de *EcoR I* en un volumen total de 400 µl, durante 2 horas a 37° C, comprobándose, por electroforesis en gel de agarosa al 0,5 %, que la digestión había sido total. El producto de la digestión, se fenolizó y precipitó con etanol, resuspendiéndose el ADN en 200 µl de tampón TE (pH 8,0).

2.7b- Purificación de los brazos de lambda por centrifugación en gradiente de sacarosa.

El ADN de λ Dash II digerido con *EcoR I*, se incubó a 37° C durante dos horas en presencia 0,01 M MgCl₂, para favorecer la unión de los extremos cohesivos, comprobándose la unión por electroforesis en gel de agarosa al 0,5 %.

Simultáneamente se preparó un gradiente continuo de sacarosa del 10 al 40% en un tubo de ultracentrifuga para un rotor Beckman SW28.

150 µl del ADN se depositaron sobre el gradiente, que se centrifugó a 26.000 r.p.m. durante 24 horas, después de lo cual se recolectaron fracciones de 0,5 ml a través de una aguja de 21 G que se pinchó en el extremo inferior del tubo.

Alicuota de una de cada 3 fracciones, se calentaron a 68° C y se cargaron en gel de agarosa al 0,5%, detectándose, así, en qué fracciones se habían eluido los brazos de lambda unidos por los extremos *cos* (de unas 29 kb) y no la parte central (“stuffer”) del fago (de unas 15 kb).

Las fracciones escogidas se mezclaron y se dializaron en tampón TE fueron sometidas a 18 horas de diálisis frente a 3 cambios de 1000 veces su volumen en tampón TE. Para reducir el volumen de la solución a 3 ml, ésta se extrajo con 2-butanol, repetidas veces. El ADN se precipitó, finalmente, con etanol y se resuspendió en tampón TE a una concentración de 0,5 µg/ml.

Tampón del gradiente de sacarosa para λ : 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA (pH 8,0)

2.7c- Purificación de una fracción del ADN de SW756 digerido con *EcoR* I que comprende los fragmentos de tamaños de 10 a 15 kb.

100 μ g de ADN genómico de SW756 de alto peso molecular con 100 U. de la endonucleasa *EcoR* I. El producto de la digestión se extrajo con fenol, se precipitó con etanol y se resuspendió en 200 μ l de tampón TE. Simultáneamente se preparó, en un tubo de ultracentrífuga, un gradiente de densidad de sacarosa de concentraciones comprendidas entre 10% y 40%. Se cargó la muestra de ADN sobre el gradiente y se centrifugó a 22.000 r.p.m. durante 22 horas en un rotor SW40 de Beckman. Tras sacar el tubo de la centrifuga se clavó en la parte inferior del tubo una aguja de calibre 21 G, y se tomaron fracciones de 0,5 ml. Aliquotas de 10 ml de una de cada dos fracciones, se examinaron por electroforesis en agarosa. Las fracciones que contenían ADN con tamaños comprendidos entre 10 y 20 kb eran las únicas que se usarían para formar la genoteca, y fueron dializadas en tampón TE. Después de lo cual se redujo el volumen de las muestras tras varias extracciones con 2-butanol. El ADN se precipitó con etanol y se resuspendió en tampón TE, midiéndose la concentración por electroforesis en gel de agarosa junto a un marcador de ADN.

Tampón del gradiente de sacarosa para ADN genómico: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0).

2.7d- Ligación del ADN genómico a los “brazos” de λ Dash II.

En un volumen total de 10 μ l se ligó el vector λ Dash II (1,4 μ g) al ADN genómico (0,5 μ g) por acción del enzima *T4* ADN-ligasa (4 U.) de la casa Boehringer Mannheim, en presencia de ATP (0,5 mM).

2.7e- Empaquetamiento *in vitro* del ADN en partículas de fago.

El empaquetamiento *in vitro*, de 3 μ l del producto de la ligación, en partículas de fago infectivas, se llevó a cabo usando los reactivos de la casa Boehringer Mannheim, que consisten en dos extractos provenientes de dos fagos λ lisógenos de *E. coli*, distintos, que contienen mutaciones

complementarias en genes requeridos para la maduración del fago (Hohn, 1979). El ADN se empaquetó siguiendo las instrucciones del fabricante, constituyéndose así la genoteca.

La genoteca fue titulada infectando bacterias hospedadoras *E. coli* de la estirpe XL1-Blue MRA (P2) resuspendidas en MgSO₄ 10 mM, con diluciones 1·10 del producto de la reacción de empaquetamiento

2.7f- Preparación de las bacterias hospedadoras de los bacteriófagos recombinantes.

La cepa bacteriana usada para la titulación y en la búsqueda o *screening* de la genoteca fue la cepa de *E.coli* XL1-Blue MRA (P2) pues además de ser bacterias susceptibles de ser lisadas por fagos lambda recombinantes han sido modificadas genéticamente para impedir que el fago no recombinante se replique en su interior.

Las bacterias *E.coli* XL1-Blue MRA (P2) crecieron en medio LB - MgSO₄ 10 mM y maltosa al 0,2%, hasta una densidad óptica de 1 a 600 nm de longitud de onda. Las células se sedimentaron por centrifugación a 4000g, 10 minutos y se resuspendieron en 10 mM MgSO₄ a una densidad óptica de 0,5 a 600 nm.

2.7g- Titulación de la genoteca.

Las bacterias de absorbancia 0,5 en 10 mM MgSO₄ se alicuotearon en tubos de 10 ml conteniendo 0,2 ml de suspensión bacteriana cada tubo y se incubaron 20 minutos a 37° C con: 1x10⁻³ ml, 1x10⁻⁴ ml, 1x10⁻⁵ ml, de la genoteca. A cada tubo se le añadió 3 ml de agar blando fundido, a 48° C y se volcó el contenido sobre una placa de 100 mm. de diámetro, incubándose a 37° C hasta que las placas de lisis fueron visibles.

2.8- SCREENING DE LA GENOTECA.

El *screenig* se realizó esencialmente por el método de Benton y Davis, de la siguiente manera:

2.8a- Extensión de la genoteca en placas de LB/agar.

La suspensión de bacterias *E.coli* XL1-Blue MRA (P2) en 10 mM MgSO₄, se alicuoteó en volúmenes de 2 ml, en 8 tubos Falcon® de 50 ml, que fueron incubados con 125 µl del fago

recombinante cada uno, 20 minutos, a 37° C, después de lo cual a cada tubo se le añadió 25 ml de agar blando fundido, a 48° C, vertiéndose la mezcla sobre placas de 22 cm x 22 cm, que fueron incubadas a 37° C hasta que las placas de lisis fueron visibles.

2.8b- Transferencia del ADN del fago a las membranas de nitrocelulosa.

Las membranas de nitrocelulosa se extendieron sobre cada una de las 8 placas de la genoteca, que habían sido enfriadas a 4° C, atravesándose con una aguja y tinta china en distintos puntos, para su orientación después de la hibridación. El ADN de los fagos pegado a la membrana se desnaturalizó por tratamiento con solución alcalina: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH, durante 2 minutos. Se neutralizaron los filtros sumergiéndolos, 5 minutos, en una solución: 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 8,0. Después de lo cual se lavaron en una solución: 2 X SSC y 0,2 M Tris-HCl. Los filtros se depositaron sobre papel secante. El ADN se fijó al filtro de nitrocelulosa tras someterlo a una temperatura de 80° C durante 2 horas.

2.8c- Prehibridación e hibridación de las membranas.

Los filtros se prehibridaron a 42° C durante 4 horas en 10 ml por cada 400 cm² de superficie de membrana en una solución: 50% formamida, 5 X SSC, 5 X Denhardt's, 50 mM fosfato sódico (pH 6,5), 1% SDS, 0,5 mg/ml ADN desnaturalizado de esperma de salmón.

La hibridación se realizó durante 18 horas en una solución idéntica a la de la prehibridación, si bien, se disminuyó el volumen a 5 ml por cada membrana de 400 cm² y se añadió la sonda radiactiva marcada por la técnica de "random primer" a concentración mayor o igual a 1x10⁶ cpm/ml.

2,8d- Lavados de las membranas.

Se lavaron los filtros 2 veces, durante 15 minutos, temperatura ambiente, en la solución I de lavado y dos veces, durante 30 minutos a 60°C en la solución II de lavado.

Solución I: 2 X SSC, 0,1% SDS.

Solución II: 0,02 X SSC, 0,1% SDS.

2.9- MINIPREPARACIONES DE ADN DE FAGO LAMBDA.

Las minipreparaciones de ADN de fago lambda se realizaron según el protocolo de Fritsch, (no publicado) recogido por Sambrook et al., (1989).

De una placa petri se separó una placa de lisis positiva bien aislada del resto de las placas de lisis y se suspendió en 1 ml de tampón TM con una gota de cloroformo, agitándose insistentemente para liberar los partículas de fago de los restos bacterianos, aproximadamente 100 µl de esta suspensión se incubaron 15 minutos a 37° C con 100 µl de la suspensión de bacterias *E.coli* XL1-Blue MRA en 10 mM MgSO₄ (esta vez a una densidad óptica de 2, a 600 nm de longitud de onda), en un tubo de 10 ml. 2,5 ml de LB-agarosa blanda fundida, a 48° C, se añadieron al tubo, vertiéndose la mezcla sobre una placa de LB-agarosa de 100 mm. de diámetro, (se usó LB-agarosa en vez de LB agar, pues el agar contiene sustancias solubles que interferirían posteriormente en la digestión del ADN del fago). La placa petri fue incubada a 37° C hasta que las placas de lisis confluyeron unas con otras, formándose un lisado total de las bacterias de la placa petri, añadiéndose entonces 3 ml de tampón TM para eluir los fagos. Después de 2 horas se aspiró el sobrenadante y se depositó en un tubo de centrifuga, los restos de bacteria lisada se sedimentaron por centrifugándose a 4000g y se desecharon. La suspensión de fagos fue tratada con ARNasa A 1 µg y con ADNasa I 1 µg para digerir los restos de ácido nucleico bacteria que podrían interferir con la posterior precipitación del fago, para propiciar esta, se añadió 1 volumen de la solución de precipitación del fago, conteniendo: 20% PEG 8000, 2M NaCl y 10 mM MgSO₄ y se incubó la mezcla a 0° C durante al menos 1 hora. El precipitado de PEG y partículas de fago se recogió por centrifugación a 10,000g, 10 minutos a 4° C. El sobrenadante fue desechado y el precipitado se resuspendió en 0,5 ml de tampón TE y se trasvasó a un tubo de 1,5 ml. Para romper las partículas de fago se incubó a 68°C durante 5 minutos en presencia de 0,1% SDS. Se añadió NaCl a concentración de 0,1 M y se extrajo con fenol-cloroformo y con cloroformo solo. El ADN se precipitó añadiendo un volumen de isopropanol y se recogió por centrifugación en microfuga, lavándose el precipitado con etanol al 70%. El ADN se resuspendió en 50 µl de tampón TE (pH 8,0). Una alícuota de 10 µl se digirió con la endonucleasa apropiada para aislar el inserto, analizándose después por electroforesis en gel de agarosa.

2.10- MAPA DE RESTRICCIÓN DE LOS CLONES DE LAMBDA.

Los vectores lambda Dash II y Fix II contienen 2 sitios *Not* I únicos flanqueantes a las secuencias promotores de ARN T3 y T7. Esto permite la excisión del inserto y de las secuencias T3 y T7 como un solo fragmento separando de los brazos de lambda, por digestión con *Not* I. El fragmento aislado puede someterse a digestiones parciales con distintas endonucleasas de restricción, fraccionar el producto de las digestiones por electroforesis en gel de agarosa, transferirse a membrana de nylon usando el método de “Southern” y analizar los fragmentos por hibridación con los oligonucleótidos sintéticos de los promotores T3 o T7, para determinar la posición de los sitios de restricción en relación a cada uno de los extremos del inserto.

2.10a- Digestiones parciales de los clones de lambda.

Las digestiones parciales se consiguieron buscando la relación adecuada entre concentración de ADN, endonucleasa y tiempo de digestión. Las condiciones utilizadas para la obtención de digestiones parciales en las que todos los fragmentos de restricción estuvieran representados fueron: 5 µg de ADN del fago recombinante digerido completamente con *Not* I, 10 µl del tampón salino recomendado por el fabricante de la endonucleasa y 2,5 u. de la endonucleasa elegida, en un volumen total de 100 µl, permitiendo actuar al enzima durante 2 minutos después de los cuales, las digestiones se detuvieron bruscamente, por congelación en nieve carbónica durante una noche o añadiendo un volumen de fenol y agitando.

2.10b- Electroforesis de las digestiones parciales y transferencia a la membrana.

Las electroforesis se realizaron durante 16 horas a 60 mA en gel de agarosa al 0,8% de 20 cm de longitud usando uno o varios marcadores de peso molecular que se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron junto a una regla. Conocidos los tamaños de cada fragmento de restricción del ADN-patrón, se dibujó la curva que relaciona el logaritmo del tamaño de cada fragmento con la distancia recorrida por este.

La transferencia y fijación del ADN a la membrana se desarrolló de la misma manera que se ha descrito ya para el “Southern” de ADN genómico.

2.10c- Marcaje radiactivo del oligonucleótido.

Los oligonucleótidos sintéticos T3 y T7, de la casa Stratagene, se marcaron en el extremo 5' con γ - ^{32}P dATP por acción del enzima T4 polinucleótido-quinasa de la casa Boehringer Mannheim, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.10d- Hibridación con oligonucleótidos y lavados de las membranas.

La temperatura de hibridación de los oligonucleótidos es distinta en cada caso dependiendo de la longitud y composición del oligonucleótido. La temperatura ideal se calcula empíricamente a partir de la temperatura de fusión en un rango de 5 a 10 grados por debajo de ésta. En el caso de los oligonucleótidos comerciales T3 y T7 de la casa Stratagene, las prehibridaciones e hibridaciones se llevaron a cabo a 37° C, mientras que los lavados se realizaron a 42° C.

Las prehibridaciones se prolongaron durante 4 horas en una solución consistente 6 X SSC, 5 X Denhardt's, SDS al 0,5%, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN desnaturalizado de salmón.

Las hibridaciones se prolongaron durante 18 horas, en una solución igual a la de la prehibridación pero conteniendo además la sonda de oligonucleótido marcada con ^{32}P en el fosfato del extremo 5'.

Los lavados se realizaron en 3 cambios de tampón 6 X SSC a 42° C, durante una hora.

Las bandas obtenidas en la autorradiografía fueron analizadas midiéndose la distancia de cada una de ellas hasta el origen, calculando así el tamaño del fragmento de restricción en la curva log del tamaño / distancia.

2.11- SUBCLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN.

Para la subclonación de fragmentos de los clones de lambda o subgenómicos del ADN de VPH18 fue necesaria la digestión del ADN del clon, el fraccionamiento en geles de agarosa, la elución del ADN de la agarosa, la ligación a un vector plasmídico y la transformación de bacterias competentes. El vector plasmídico que se empleó en la subclonación de fragmentos de restricción fue el pBluescript SKII-.

2.11a- Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.

Las digestiones con endonucleasas de restricción se realizaron en el tampón salino recomendado por el fabricante de la endonucleasa en un volumen total variable de 10 a 500 μ l.

2.11b- Aislamiento de los fragmentos de restricción.

Para el aislamiento de fragmentos de restricción, se fraccionó el producto de las digestiones junto a un ADN-patrón de tamaños en geles de agarosa del 0,8 % al 2 % en tampón 1 X TAE. La banda de interés se separó con bisturí y el ADN fue eluido de la agarosa por distintos métodos empleándose fundamentalmente el método comercial del GeneClean® (Bio101) que destruye la agarosa por tratamiento con 6 M NaI y purifica el ADN a través de una resina (glassmilk®) a la que se pega el ADN alta concentración salina y se despega a baja concentración salina.

2.11c- Ligación del inserto al vector plasmídico.

Las ligaciones se llevaron a cabo entre extremos cohesivos, en un volumen final no mayor de 20 μ l, usando cantidades equimoleculares de inserto y vector y empleando la enzima ADN ligasa de T4 de Boehringer Mannheim en presencia de 0,5 mM ATP y en el tampón salino que suministra el fabricante.

2.11d- Puesta en competencia de las bacterias.

Las bacterias *E.coli* de la estirpe DH5 α F' fueron cultivadas en medio LB y sedimentadas cuando se encontraban en fase de crecimiento exponencial, resuspendiéndose después, a 4° C, en 1/10 del volumen de cultivo inicial, en una solución de LB-PEG 4000 al 10%, conteniendo 30 mM de Mg²⁺ y 5% de DMSO. La suspensión fue alicuotada, rápidamente congelada en nieve carbónica-etanol y almacenada a -70° C hasta su utilización.

2.11e- Transformación.

El producto de la ligación se añadió a 100 μ l de bacterias DH5 α F' competentes, depositándolas a 4° C durante 30 minutos, después de los cuales se las sometió a 42° C durante 90 segundos, se la volvió a enfriar y se añadieron a 900 ml de medio LB y se incubaron 60 minutos a 37°C (tiempo de

expresión génica). Después de lo cual se extendieron en alícuotas de 20, 50 o 100 μl sobre placas petri de LB-agar conteniendo 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina, en las que se ha extendido 40 μl de X-Gal (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), y 4 μl de IPTG 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Las placas se incubaron a 37°C toda la noche. Los clones recombinantes se seleccionaron por resistencia a ampicilina y α -complementación.

2.11f- Minipreparaciones de plásmidos.

Las colonias recombinantes se inocularon en alícuotas de 5 ml de LB-50 $\mu\text{g/ml}$ ampicilina y se incubaron a 37° C con agitación toda la noche.

1 ml de cada uno de los cultivos de 5 ml de las bacterias recombinantes, se lisó por el método de lisado alcalino de Birnboim y Doly (1979) según las modificaciones de Sambrook et al. (1989).

2.12- SECUENCIACIÓN.

La secuenciación se realizó por el método de los terminadores específicos de cadena (Sanger et al., 1977) utilizando α -³⁵SdATP y los oligonucleótidos de los promotores virales T3 y de T7 de la casa Stratagene, cuyas secuencias se encuentran a ambos lados del sitio de multiclonado del vector pBluescript SKII- (Stratagene) y del vector pAMP1 (Gibco BRL), en los que se subclonaron fragmentos de restricción y los productos de la PCR, respectivamente. Los reactivos empleados fueron suministrados por Amersham incluida la enzima que fue la ADN polimerasa modificada del fago T7, USB®.

2.13- BÚSQUEDA EN GENOTECAS DE CÓSMIDOS Y YACS POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La búsqueda en las genotecas genómicas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa se realizó basada en el método desarrollado por Green y Olson (1990). Para ello fue necesario el diseño previo de un par de ADN-cebadores que acotaran un fragmento de ADN de un tamaño tal que fuera susceptible de ser amplificado por la polimerasa. Se diseñó una pareja de ADN-cebadores que amplificaban un fragmento de ADN celular del flanco 5' y otra pareja de cebadores que amplificaban un fragmento de ADN celular del flanco 3'.

El amplicón del extremo 3' era un fragmento de 250 pb comprendido por los ADN-cebadores: [5'-TCT TGT GGG GTA AAG GAG CAT C-3'] como ADN-cebador superior y [3'-TGA CAA TAA TGC CAT GGA GCA G-5'] como ADN-cebador inferior.

El amplicón del flanco 5' era un fragmento 151 pb comprendido por los siguientes oligonucleótidos: [5'-TCT GAA TTT GTC CGT TTC CTC A-3'] como ADN-cebador superior y [3'-GGT CTC AAG AGG TAA CCC TTC T-5'] como ADN-cebador inferior.

Las reacciones de PCR constaron de los siguientes ciclos:

- Un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95° C
- 30 ciclos de amplificación con los siguientes parámetros: 1 minuto a 95° C (desnaturalización), 1 minuto a 58° C (anillamiento), 1 minuto a 72° C (elongación).
- Un ciclo de elongación final de 10 minutos a 72°C.

Los reactivos empleados en cada PCR fueron: 20 pmoles de cada ADN-cebador, 0,8 mM de mezcla equimolecular de los 4 dNTPs, 1 X **tampón salino de PCR***, de 10 a 20 ng de ADN molde (distinto en cada tubo) y 1 U de la enzima *Taq* ADN-polimerasa.

***10 X tampón de salino de PCR:** 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 15 mM MgCl₂, 0,1% gelatina.

El ADN molde en el primer *screening* de la genoteca de YACs CEPH-A está constituido por el ADN de 28 grupos de clones distintos ("Super-pools"). Cuando un par de cebadores es positivo para un grupo se analizan por PCR los 5 subgrupos ("pool") de clones que lo componen. Cada subgrupo está constituido por el ADN de 384 YACs distintos.

La genoteca de mega-YACs CEPH-II, procedente del Centre d'Etudes de Polimorphism Humains, Paris, Francia, está constituida por 14 Super-pools en vez de 28.

El ADN molde en las genotecas de cósmidos específica de cromosoma 12, LL12NCO1 (Lawrence Livermore National Laboratory, USA), comenzaba con 17 mezclas distintas de ADN ("pools"), constituidas por el ADN de 1620 clones, que son los que caven en cada membrana de la genoteca de cósmidos (construida automáticamente) que puede analizarse por hibridación con sondas radiactivas.

El análisis de los fragmentos amplificados en la PCR se realizó por medio de electroforesis en minigeles de acrilamida-bisacrilamida (37:1) en tampón 1 X TBE.

2.14- MAPAS DE CÓSMIDOS.

El mapa del cósmido 227E2, se realizó por medio de digestiones parciales con distintas endonucleasas, de la manera que se ha descrito ya para los clones de lambda, si bien, en este caso la endonucleasa que escindió el inserto del vector fue *Sfi* I y no *Not* I.

2.15- AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS EXTREMOS 3' DEL ARN DEL GEN *HMGI-C*.

2.15a- Síntesis de ADNc a partir de ARN total.

La síntesis del ADN complementario se realizó paralelamente a partir del ARN total de SW756 y del de la línea celular SiHa, que constituía el ARN control, empleando los reactivos de la casa Gibco BRL y siguiendo las indicaciones del fabricante de la siguiente manera: 5µg de ARN celular total y 20 pmoles de cebador comercial “Adapter primer AP2®”, se incubaron 5 minutos a 70° C, se enfriaron en hielo y se comenzó la síntesis de la primera cadena del ADNc por medio de la enzima transcriptasa en reverso SuperScript® (200 U), en presencia de 2 mM dNTPs, 10 mM DTT, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 100 µg/ml BSA, en un volumen total de 20 µl y a 42° C durante 30 minutos.

La secuencia del oligonucleótido AP2 es la siguiente: [3'-AAG GAT CCG TCG ACA TC(T)¹⁷-5'].

El ARN molde fue destruido, seguidamente, por acción de la ARNasa H (2 U), que actuó durante 10 minutos a 42° C, en el mismo tampón salino.

2.15b- Amplificación del ADNc.

La amplificación del ADNc se llevó a cabo en dos etapas siguiendo el protocolo recomendado por la casa Gibco BRL (proveedor de los reactivos).

Primera fase. (Fase A):

Se realizaron tres reacciones de PCR con el ADNc de la línea SW756 y tres con el ADNc control (de la línea celular SiHa).

En todas ellas se usó un ADN-cebador inverso común, llamado UAP2® (“Universal amplification primer 2”), cuya secuencia era [5'-CUA CUA CUA CUA CUA AAG GAT CCG TCG ACA TC-3'], poseyendo una zona idéntica a la secuencia del cebador AP2 y otra zona diseñada especialmente para facilitar la clonación del fragmento amplificado en un vector especial llamado pAMP1® (Gibco BRL). El cebador directo era específico y distinto en cada una de las tres reacciones, con secuencias obtenidas de cada uno de los tres primeros exones del gen *HMGI-C*.

En la reacción A₁, La secuencia del ADN-cebador directo específico del gen *HMGI-C* fue: [5'-CTT CAG CCC AGG GAC AAC-3']. En la reacción A₂ fue: [5'-CAA GAG GCA GAC CTG GGA-3']. En la reacción A₃ fue: [5'-AAC AAT GCA ACT TTT AAT TAC TG-3']. Las tres se realizaron sobre dos “moldes” distintos: el ADNc problema, y el ADNc control

Cada PCR se realizó partiendo de 5 µl del ADNc (de los 20 µl obtenidos en la reacción de síntesis), 25 pmoles de cada ADN-cebador y 0,8 mM de dNTPs (mezcla equimolecular). La reacción se realizó en un volumen final de 50 µl, en un tampón de PCR constituido por: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,4), 1,25 mM MgCl₂ y 0,01% gelatina. Una unidad de la enzima *Taq* ADN polimerasa se añadió a cada tubo cuando estos estaban a una temperatura de 80° C.

La Fase A de la amplificación de ADNc constó de los siguientes ciclos:

- Un ciclo de iniciación en caliente, consistente en: 3 minutos a 94° C y de 1 a 5 minutos a 80°, tiempo que se emplea en añadir la enzima a los tubos.
- 1 ciclo de síntesis de la cadena complementaria del ADNc a partir de cada cebador específico del gen *HMGI-C*, consistente en 5 minutos a 94° C, 2 minutos a 55° C y 60 minutos a 72° C.
- 30 ciclos de amplificación consistentes en: 45 segundos a 94° C, 45 segundos a 55° C y 3 minutos a 72° C.
- 1 ciclo de elongación final de 10 minutos a 72° C.
- 1 ciclo de enfriamiento a 4° C.

Segunda fase. (Fase B):

Usando como ADN-molde una dilución 1/10 del producto de cada una de las reacciones de la fase A, se realizó una segunda fase de PCRs. En todas ellas se empleó de nuevo, como cebador inverso, el cebador UAP2® y tres cebadores directos específicos del gen *HMGI-C* en cada una de las tres reacciones de amplificación del ADNc control y del ADNc problema. Las secuencias de los

cebadores específicos se obtuvieron a partir de las secuencias de los tres primeros exones del gen *HMGI-C* de tal manera que cada una de estas secuencias estuviera incluida en los fragmentos amplificados en la primera fase de PCRs.

Estos cebadores fueron diseñados de una manera especial para facilitar la posterior clonación de los fragmentos amplificados usando el sistema CloneAmp® de Gibco BRL, en el vector pAMP1®, para ello se colocó en el extremo 5' una secuencia de 4 tripletes CUA. Las secuencias de los ADN-cebadores eran: B₁: [5'-CUA CUA CUA CUA CGC CTC AGA AGA GAG GAC-3'], ADN-cebador B₂: [5'-CUA CUA CUA CUA GTT CAG AAG AAG CCT GCT-3'], y ADN-cebador B₃: [5'-CUA CUA CUA CUA TTG ATC TGA TAA GCA AGA GTG GG-3'].

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 50 µl a la misma concentración de dNTPs y en el mismo tampón de PCR que la reacción anterior y con 20 pmoles de cada uno de los ADN-cebadores.

Los parámetros de la fase B de PCRs fueron:

- 1 ciclo de iniciación en caliente consistente en: 3 minutos a 94° C y de 1 a 5 minutos a 80° C. Tiempo de añadir la *Taq* ADN polimerasa.
- 30 ciclos de amplificación consistentes en: 45 segundos a 94° C, 45 segundos a 55° C y 3 minutos a 72° C.
- 1 ciclo de elongación final de 10 minutos a 72° C
- 1 ciclo de enfriamiento a 4°C

El producto de estas PCRs se cargó íntegramente en un gel de agarosa al 1,2%.

2.15c- Clonación de fragmentos amplificados por PCR usando el sistema CloneAmp®.

El ADN de las bandas provenientes de la segunda fase de PCRs fue electroluido de la agarosa y se ligó al vector pAMP1 por medio de la enzima uracil ADN glicosilasa (UDG) de la siguiente manera: Se añadieron 50 ng de vector a 200 ng de ADN de la banda eluida y 1 U de UDG, en un volumen total de 10 µl, incubándose la reacción a 37° C durante 30 minutos, después de los cuales se procedió a la transformación de bacterias competentes, *E. coli* DH5α. Los clones recombinantes se seleccionaron por resistencia a ampicilina.

2.16-LÍNEAS CELULARES:

SW756: Células epiteliales humanas derivadas de carcinoma cervical que fueron donadas a nuestro laboratorio por Dr. Popescu del N.C.I. Bethesda M.D., USA.

SiHa: Células epiteliales humanas derivadas de carcinoma cervical. (ATCC HTB 35).

C4I: Células epiteliales humanas derivadas de carcinoma cervical que fueron cedidas a nuestro laboratorio por Dr. Popescu del N.C.I. Bethesda M.D., USA (ATCC CRL 1594).

HeLa: Células epiteliales humanas derivadas de carcinoma cervical (ATCC CCL2).

OSA: Células tumorales humanas derivadas de un osteosarcoma fueron donada por Dr. Ola Myklebost del Institute for Cancer Research, Oslo, Noruega.

RMS-13: Células tumorales humanas derivadas de un rabdomiosarcoma fueron donadas por Dr. Ola Myklebost del Institute for Cancer Research, Oslo, Noruega.

Colo 320: Línea celular humana procedente de un carcinoma de colon (ATCC CCL220).

Molt-4: Línea celular derivada de un linfoma de Burkitt (ATCC CRL 1582)

Ramos: Línea celular derivada de un linfoma de Burkitt (ATCC CRL 1596)

2.17- CEPAS BACTERIANAS

DH5 α : (Hanahan, 1983). *supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*

DH5 α F': Genotipo: F', *supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*

XL1-Blue MRA: Δ (*mcrA*) 183, Δ (*mcrCB*-*hsdSMR*-*mrr*) 173, *end A1*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*,

XL1-Blue MRA (P2): XL1-Blue MRA (P2 lisógeno)

2.18- VECTORES

Vectores plasmídicos: -pBluescript SKII- \otimes (Stratagene), -pAMP1 \otimes (Gibco BRL).

Cósmidos: LAWRIST16 (Little, 1987)

Vectores derivados de bacteriófago lambda: λ Dash II (Stratagene), λ Fix II (Stratagene)

2.19- SOLUCIONES DE USO GENERAL EN BIOLOGÍA MOLECULAR

TE: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5 o 8), 1 mM EDTA (pH 8)

SSC: 15 mM Citrato sódico, 150 mM NaCl

100 X Denhardt's: 2% Ficoll, 2% polivinilpirrolidona, 2% BSA.

SM: 50 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 0,1% gelatina

TM: 50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM MgSO₄

TAE: 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA

TBE : 40 mM Tris-borato, 1 mM EDTA

PBS: 137 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2,5 mM Na₂HPO₄, 1 mM K₂HPO₄, a pH 7,2

Medio LB: Triptona 10g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l.

LB agar: Medio LB + 1,5 % de agar

Agar blando: Medio LB suplementado con 10 mM MgSO₄ + 0,7 % de agar

Fenol: En todos los métodos que se describen el fenol se usó siempre equilibrado a (pH 8) saturado con 10 mM Tris-HCl (pH 8)

Fenol-cloroformo: 50 % de fenol equilibrado + 50 % de cloroformo

Cloroformo-isoamílico: 99% de cloroformo + 1 % de alcohol isoamílico

10 X Colorante de bromofenol y xilencianol: 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilencianol FF, 50% de glicerol en agua

dNTPs: Mezcla equimolecular de dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Los análisis de secuencia de ADN, búsquedas y comparaciones se realizaron utilizando el paquete de programas de análisis de secuencia del "Genetics Computer Group (v 6.2)" de la universidad de Wisconsin (Devereux et al., 1984), utilizando computador DIGITAL VAX. Se utilizaron los bancos de datos EMBL y GeneBank, con la colaboración de Rodolfo Murillas, CIEMAT, Madrid. La comparación y alineamiento de secuencias se realizó con el programa PC-gene® de Intelligenetics. Este texto fue procesado utilizando el programa Microsoft Word para Windows®. Las figuras se realizaron utilizando el programa Charisma® de Micrographx, para Windows.

3.- RESULTADOS

3.1- CLONACIÓN DEL *LOCUS* DE INTEGRACIÓN EN EL GENOMA DE LAS CÉLULAS SW756.

La línea celular SW756, derivada de un carcinoma de cervix contiene el genoma de VPH18 integrado en la región cromosómica 12q13-15 (Popescu et al, 1987, Sastre-Garau et al., 1995). Para la clonación de las secuencias celulares flanqueantes al ADN viral integrado fue necesaria la preparación previa de una genoteca genómica específica de SW756 ya que la localización del *locus* de integración viral en SW756 es una característica peculiar de dicha línea celular y ninguna otra genoteca podría usarse con este fin.

En la preparación de la genoteca se usó un vector derivado de fago lambda pues estos vectores permiten la introducción de insertos de ADN genómico de hasta 22 kb, siendo las genotecas en fago lambda mucho más sencillas en su producción y manejo que las genotecas en vectores cosmídicos. Otra decisión a tomar, en la preparación de la genoteca, fue si debía clonarse el punto de recombinación viral-celular del lado 3' separadamente del punto de recombinación viral-celular del lado 5' o si por el contrario ambos extremos virales debían encontrarse en el mismo clon. Las dos posibilidades eran, en principio, factibles ya que el tamaño del genoma de VPH18 es de 8 kb y teniendo en cuenta que una porción mayor o menor de su genoma podía haberse perdido en el proceso de integración, solo era necesario que el fragmento de restricción que contuviera el genoma viral y las secuencias celulares adyacentes fuera menor de 22 kb.

3.1a- Caracterización de las secuencias virales integradas en SW756.

Con el fin de decidir la estrategia a seguir en la preparación de la genoteca se realizaron experimentos encaminados a la caracterización del ADN viral integrado en SW756, para poder determinar así, qué fracción de las 8 kb que constituyen el genoma viral estaba conservada en el ADN de VPH18 integrado en SW756. Experimentos preliminares semejantes se habían realizado ya por Schwarz y colaboradores en 1985.

El ADN de la línea celular SW756 fue hibridado frente a sondas subgenómicas obtenidas de las distintas zonas del plásmido pHPV18-7,9 (Boshart et al., 1984), que contiene el genoma de VPH18 clonadas en el sitio *EcoR* I del plásmido pBR322 y fue cedido a este

laboratorio por el Dr. zur Hausen (Heidelberg, Alemania). Si alguna de las sondas no produjese señal en la autorradiografía, significaría que dicho fragmento no existiría en las secuencias virales integradas en SW756.

Para la realización de este experimento, así como para la serie de experimentos que van a describirse a continuación, fue necesario el cultivo de la línea celular SW756 y la obtención del ADN de sus células. Este ADN fue digerido con las endonucleasas de restricción, *Sac* I y *Hind* III, que no cortan en el genoma de VPH18 (Cole y Danos, 1987), fraccionado por electroforesis en agarosa y transferido a una membrana de nylon. Simultáneamente se subclonaron en el vector pBluescript SKII-® (Stratagene), los siguientes fragmentos del genoma de VPH18 contenidos en el plásmido pHPV18-7,9: fragmento *Bam*H I (6928)-*Bam*H I (119) de 1047 pb, que comprende la región reguladora viral, LCR o URR, a este fragmento se le llamó BB; fragmento *Xba* I (321)-*Hinc* II (658) de 337 pb situado en el marco de lectura abierto de los genes E6/E7, al que se le llamó fragmento 337; fragmento *Xba* I (1732)-*Eco*R I (2440) de 708 pb situada en mitad del marco de lectura abierto del gen E1 al que se le llamó XR-0.6 y el fragmento *Hinc* II (3605)-*Nsi* I (3974) de 369 pares de bases que comprendía la primera parte del marco de lectura abierto del gen E4 y en la parte final del E2, al que se le llamó HN-370 (Fig. 3.1). De cada uno de estos subclones se purificó ADN plasmídico, se liberaron los insertos por digestión con las endonucleasa indicadas, se fraccionaron por electroforesis en agarosa al 1%, eluyéndose el ADN de cada inserto de su fracción de agarosa.

En la fig. 6 se representa gráficamente el genoma viral, linearizado, indicando la posición de las sondas subgenómicas utilizadas:

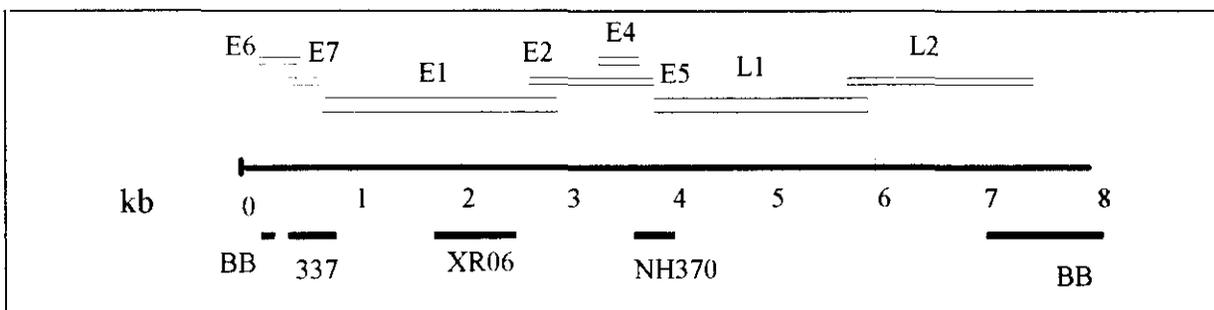


Fig. 6

La membrana de nylon que contenía el producto fraccionado de las digestiones de SW756 con las endonucleasas: *Sac* I, y *Hind* III, fue hibridada sucesivamente con las sondas: BB, 337, XR-0.6 y HN-370, marcadas con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP por la técnica del "random primer" (cebador aleatorio), detectándose señal con todas ellas. Este hecho indica que todos estos

fragmentos de ADN viral, están presentes, al menos en parte, en la secuencia de VPH18 integrada en SW756 (Fig. 7).

3.1b- Expresión de los genes virales.

Otro aspecto, en la caracterización de las secuencias virales integradas en SW756, fue estudiar la expresión de los genes virales y contrastar nuestros resultados con los obtenidos por Schwarz y colaboradores en 1985 y por Schneider-Gädicke y colaboradores en 1986. Pues las líneas celulares a menudo presentan variaciones en la expresión de sus genes debidas a su cultivo continuado.

Para estudiar la expresión de los genes E6/E7, E1 y E2 de VPH18 en esta línea celular, se usaron los fragmentos subgenómicos virales 337, XR-0.6 y HN-370 descritos anteriormente.

El ARN total de la línea celular SW756 se extrajo con tiocianato de guanidinio y purificación en colchón de CsCl. Varias alícuotas, de 5 µg, de ARN celular, total, se fraccionaron por electroforesis en un gel de agarosa conteniendo formaldehído, como agente desnaturalizante. Se transfirió el ARN procedente de cada pocillo, como franja longitudinal, a membranas de nylon usando la técnica de "Northern". Cada membrana se hibridó con una sonda radiactiva del genoma completo de VPH18 y de los fragmentos subgenómicos virales: 337, XR-0.6 y HN-370. Se detectó transcripción del gen viral E1, con un ARNm de unas 6 kb y otros con tamaños en un rango de 3,5 a 3 kb, también se detectó transcripción de los genes inmortalizantes E6 y E7: el ARN de 6 kb (también detectado con la sonda XR-0.6) y otras especies de tamaños que varían en un rango de 2,5 a 2 kb. No se detectó señal alguna con la sonda HN-370, proveniente del gen E2 (inhibidor de la transcripción de los genes E6 y E7), (Fig. 8).

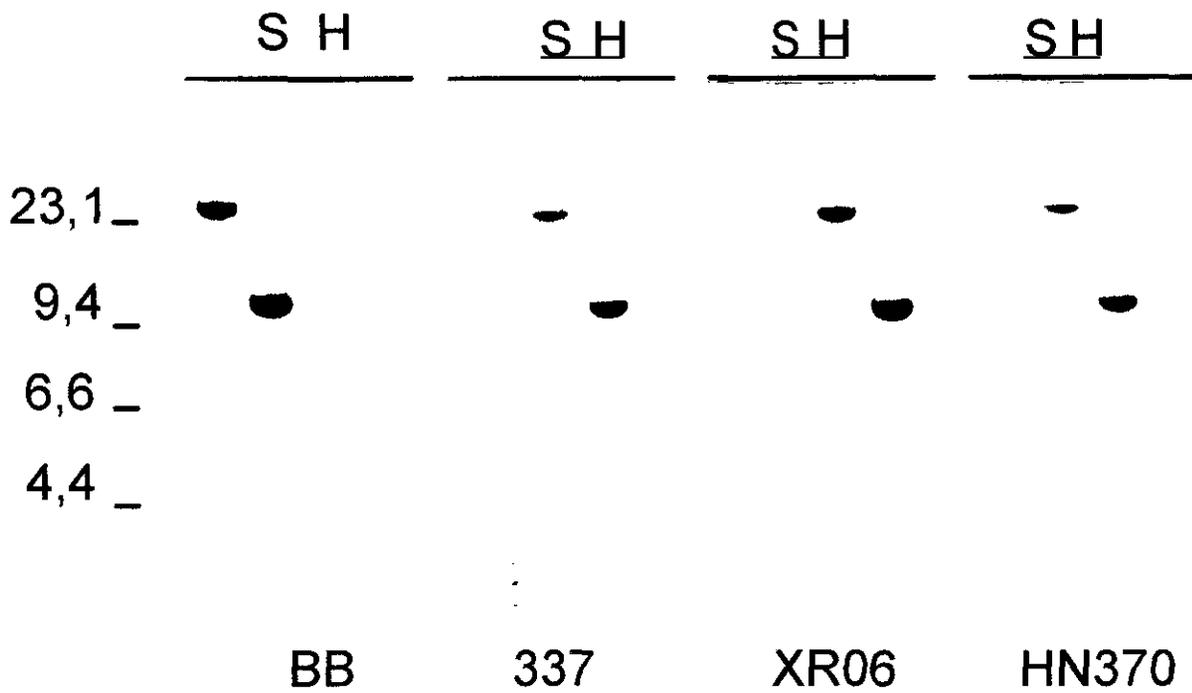


Fig. 7. Hibridación del ADN de SW756 digerido con las endonucleasas *Sac* I y *Hind* III con diversas sondas subgenómicas virales

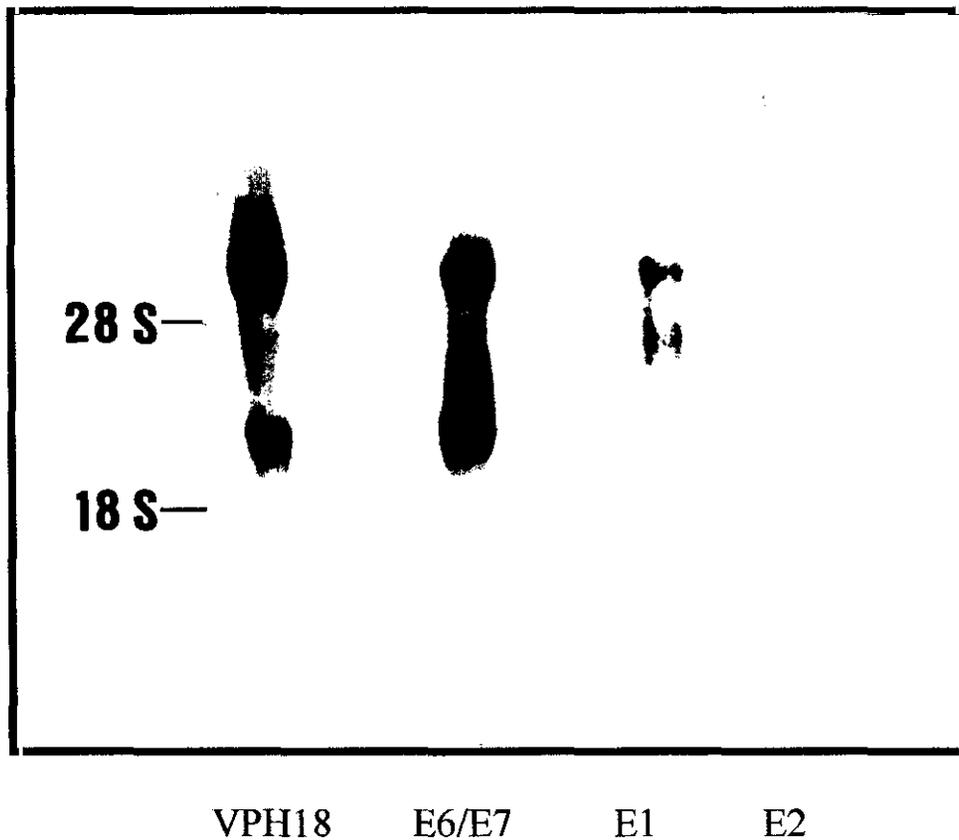


Fig. 8: Análisis de "Northern" del ARNm viral en la línea celular SW756.

Este resultado, en concordancia con los datos preliminares obtenidos por Schwarz y colaboradores (1985) y por Schneider-Gädicke y colaboradores (1986), está indicando de manera indirecta que el genoma viral debe haberse linearizado en la zona comprendida entre el nucleótido 1732 y el nucleótido 3974 ya que tanto la sonda XR-0.6 como la sonda HN-370 están presentes, al menos en parte, en el ADN viral integrado en SW756 como pudo detectarse en el “Southern” de la figura 6, y sin embargo la región comprendida por la sonda HN-370 no se transcribe por encontrarse desacoplada de las secuencias promotoras virales, URR o LTR, seguramente por haber quedado 5' de éstas en el proceso de la integración².

La gran heterogeneidad en el tamaño de los ARNm que se detectan con las sondas 337 y XR-0.6, es debida a que el extremo 3' de estos transcritos está constituido por regiones celulares adyacentes al genoma viral ya que al linearizarse algunos aceptores de *splicing* y señales de poliadenilación viral se han perdido o han quedado situadas 5' de los promotores virales por lo que se producen transcritos aberrantes con las secuencias celulares adyacentes localizadas 3' de los genes E6, E7, y E1.

3.1c- Elección de la endonucleasa de restricción empleada en la construcción de la genoteca.

Conocida la secuencia prototipo de VPH18 (GeneBank: X05015) se seleccionaron endonucleasas que no cortan el genoma de VPH18, buscando la o las enzimas de restricción que contuviera el ADN viral integrado en un fragmento de ADN genómico menor de 22 kb pues éste es el límite que admiten los vectores de fago lambda. El ADN viral fue identificado como una sola banda en el “Southern” del producto de las digestiones del ADN de SW756 con cada una de las siguientes endonucleasas de restricción: *Xho* I, *Sal* I, *Sac* I, *Hind* III y *EcoR* I; hibridado con la sonda genómica de VPH18 (Fig. 9). La secuencia consenso de VPH18 no posee ninguno de estos sitios de restricción mencionados con la excepción de *EcoR* I que corta en posición 2440 sin embargo este sitio de restricción no existe en la secuencia viral integrada en el genoma de las células SW756 debido a una mutación puntual (Schwarz et al., 1985).

Los tamaños de las bandas detectadas en la autorradiografía de la figura 9 son: mayor de 30 kb con *Xho* I y *Sal* I, 22 kb con *Sac* I, 12.5 kb con *EcoR* I y 9 kb con *Hind* III. *EcoR* I fue

² Tomando como referencia el origen de replicación viral y el sentido de transcripción de sus genes se llama punto de ruptura 5' al que se encuentra más alejado del origen de replicación, en sentido opuesto al de transcripción de sus genes y 3' al que se encuentra más alejado del origen de replicación, en el mismo sentido que el de transcripción de sus genes.

la endonucleasa elegida para la clonación del *locus* de integración del ADN viral, pues el tamaño del fragmento de restricción que contenía el genoma viral y las secuencias flanqueantes, era óptimo para la construcción de la genoteca en fago lambda, conteniendo al menos 4 kb de secuencias celulares adyacentes, espacio suficiente como para el estudio del *locus* de integración viral y obtención de sondas celulares que se utilizarían, posteriormente, en el análisis de una genoteca genómica con el fin de clonar el alelo no-ocupado correspondiente al *locus* de integración viral.

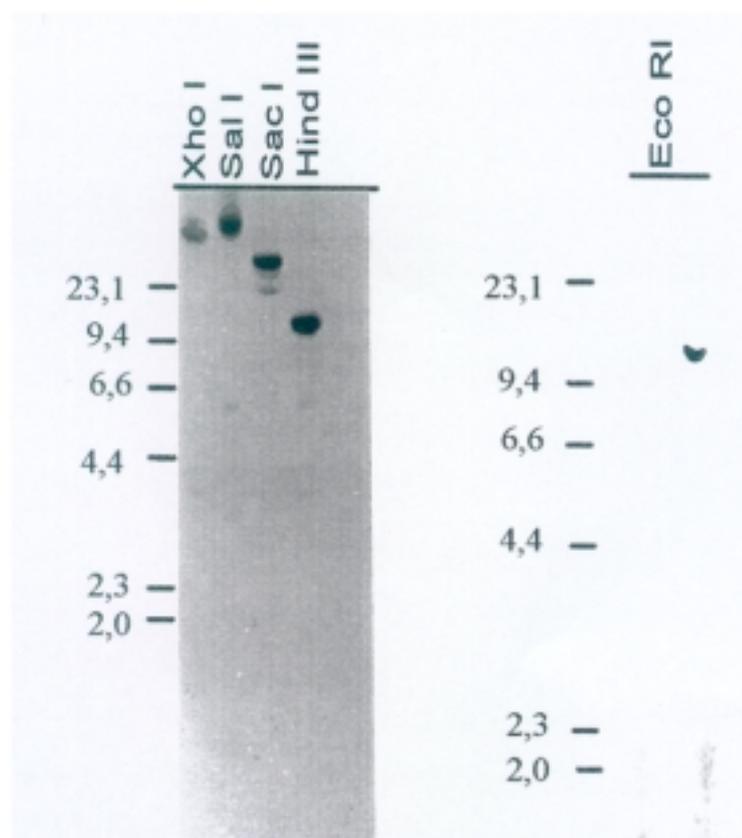


Fig. 9 Hibridación del ADN de SW756 digerido con las endonucleasas: *Eco RI*, *Xho I*, *Sal I*, *Sac I*, *Hind III*, con una sonda del genoma de VPH18 marcada con α dCTP.

3.1d- Preparación de una genoteca genómica de la línea celular SW756

La fracción de ADN de SW756 digerido con *EcoR I*, de tamaños comprendidos entre 10 y 20 kb, se purificó por centrifugación en gradiente de sacarosa (fig. 10 a y b).

El fago λ Dash® II, vector diseñado por la firma comercial Stratagene para la clonación de fragmentos genómicos de tamaños comprendido entre 9 y 22 kb, ofrece la posibilidad de clonar en el sitio de restricción *EcoR I* por lo que fue elegido como vector para la preparación

de la genoteca. El ADN del fago λ Dash II, se preparó a gran escala, se digirió con la endonucleasa *Eco* RI, purificando, a continuación, los "brazos" de lambda de la parte sustituible de su genoma ("stuffer") por centrifugación en gradiente de sacarosa (Fig. 10 c y d).

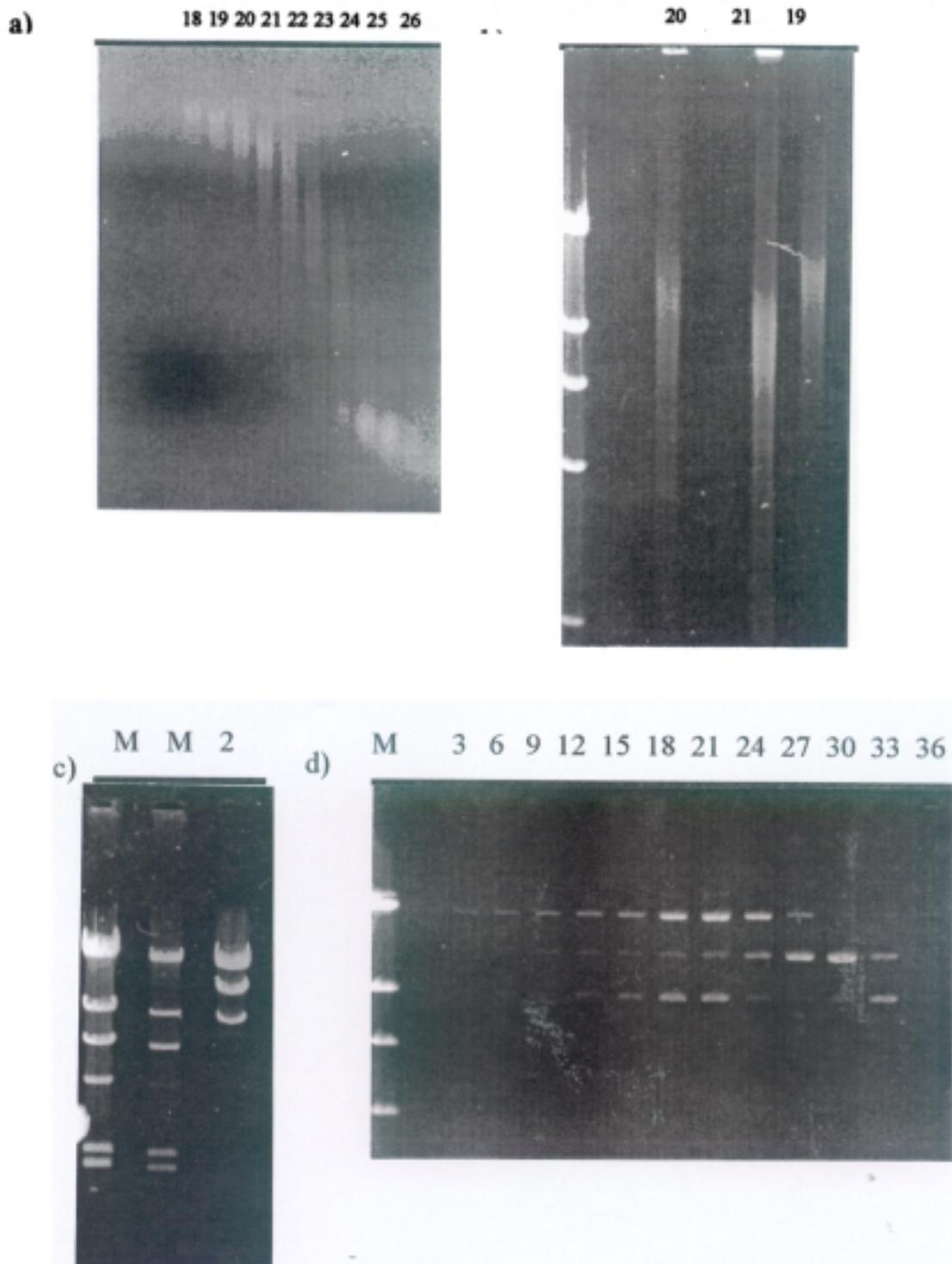


Fig. 10:

- a) Fracciones del gradiente en sacarosa del ADN de SW756 digerido con *Eco* RI.
 b) Fracciones escogidas para la producción de la genoteca. Finalmente solo se usó la fracción número 20.
 c) ADN de λ Dash II digerido con *Eco* RI; M: λ Hind III
 d) Fracciones del gradiente en sacarosa de λ Dash II digerido con *Eco* RI

La fracción seleccionada, del ADN genómico de SW756 digerido con *EcoR* I, fue ligada, por acción de la ligasa del bacteriófago T4, a los “brazos” de λ Dash II, digeridos con *EcoR* I. El producto de la ligación fue encapsidado en partículas de fago lambda. Cada partícula portaba un fragmento distinto de ADN genómico y juntas constituían la genoteca a analizar.

3.1e- Screening de la genoteca genómica de la línea celular SW756

Antes de comenzar el *screening* se tituló la genoteca, utilizando para ello bacterias *E. coli* XL1-Blue MRA(P2), modificadas genéticamente, para que solo los fagos recombinantes repliquen en ellas. El número de unidades formadoras de placa (ufp) calculado en la titulación de la genoteca fue de 900.000, cantidad que se consideró suficiente para clonar las secuencias virales, y celulares flanqueantes, en una genoteca genómica enriquecida. Se procedió a la infección de bacterias *E. coli* XL1-Blue MRA(P2), esta vez con toda la genoteca que se extendió en placas de 20x20 cm. El ADN de los fagos se transfirió y fijó a membranas de nitrocelulosa Hybond® C⁺, realizándose el *screening* de la genoteca con una sonda del genoma completo de VPH18, marcado con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP por la técnica del “random primer”. Once clones fueron detectados, como posibles positivos, por existir un punto impresionado en la autorradiografía que coincidía con la posición de una placa de lisis. Se recogió cada una de las once placas de lisis junto con las respectivas placas circundantes y se sumergieron en once alícuotas de tampón TM, para la elución de sus fagos. De cada una de estas suspensiones de fago en TM se hicieron dos diluciones $1 \cdot 10^{-5}$ y $5 \cdot 10^{-5}$ en tampón TM, y con ellas se infectaron, nuevamente, bacterias de la estirpe XL1-Blue MRA(P2), extendiéndolas mezcladas con el agar blando fundido, esta vez, en placas petri. A partir de las diluciones $1 \cdot 10^{-5}$ se obtuvieron placas petri con un número de placas de lisis de 4 a 80, de las diluciones $5 \cdot 10^{-5}$ se obtuvieron placas petri con un número 20 a 400 placas de lisis. Solo los fagos de las placas petri provenientes de las diluciones $5 \cdot 10^{-5}$ se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. De los once clones iniciales, hipotéticamente positivos, solo cuatro resultaron ser reales, pues tras la hibridación de las membranas con la sonda viral solo cuatro placas petri dieron lugar a un porcentaje de placas de lisis positivas del 5% al 10%. No se puso más esfuerzo en tres de los cuatro clones pues todos los fagos positivos debían tener el mismo inserto, al provenir de una digestión completa de

ADN genómico con *EcoR* I y existir una sola banda en el “Southern” de SW756/*EcoR* I hibridado con la sonda genómica de VPH18 (Fig. 9), por lo que se prosiguió la purificación con uno solo de los clones. Se recogió un placa de lisis positiva, eluyendo sus fagos en tampón TM y se hicieron diluciones con las que se infectaron bacterias de la estirpe XL1-Blue MRA(P2) que se incubaron en placa petri. El ADN de las placas de lisis fue transferido y fijado a membrana de nitrocelulosa. Tras la hibridación de la membrana con la sonda VPH18 se verificó que todas las placas de lisis se correspondían con un punto impresionado en la autorradiografía y por tanto se había conseguido purificar el clon de lambda positivo. A este clon se le llamó λ 12QHP.

Se recogió una placa de lisis, positiva, del agar. Los aproximadamente 10^6 fagos idénticos que constituyen una placa de lisis se eluyeron en tampón TM. Unos 10^5 de estos fagos se emplearon en infectar $1,6 \times 10^8$ bacterias *E. coli* de la estirpe XL1-Blue MRA para obtener un lisado total de las bacterias de la placa petri. Una vez obtenido el lisado en placa se eluyeron todos los fagos de la placa petri vertiendo 2 ml de tampón TM sobre la placa. El producto del lisado se tituló, calculándose un número de $1,12 \times 10^{10}$ ufp en la placa petri. La mayor parte de estos fagos se empleó en la extracción y purificación de su ADN y una pequeña parte se guardó a 4°C para infecciones posteriores de bacterias. La cantidad de ADN obtenida fue de 10 μ g. 1 μ g de ADN se digirió con *EcoR* I y se fraccionó por electroforesis en agarosa al 0,8% (Fig. 11 a), detectándose un inserto de 12.5 kb que correspondía con el tamaño de la banda obtenida en el “Southern” de la figura 9, (correspondiente al producto de la digestión de SW756 con *EcoR* I, analizado con la sonda VPH18) El resto del ADN se empleó en el mapa de restricción del clon.

3.2- CARACTERIZACIÓN DEL CLON λ 12QHP

La caracterización del clon λ 12QHP se realizó en varias etapas, comenzando con la digestión total del ADN del clon con distinta endonucleasa de restricción. Las enzimas empleadas fueron las siguientes: *Hind* III, *Kpn* I, *Pst* I y *Sac* I. Los productos de estas digestiones se fraccionaron por electroforesis en agarosa al 0.8%, se transfirieron a membrana de nylon, empleando la técnica de “Southern”, y se hibridaron con la sonda radiactiva de VPH18, comprobándose que solo los enzimas que cortan en el genoma viral daban lugar a varias bandas en la autorradiografía (Fig. 11 b y c).

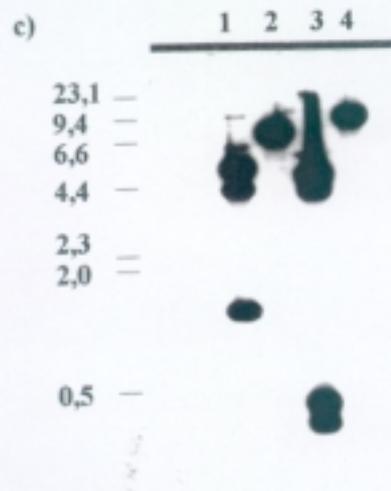
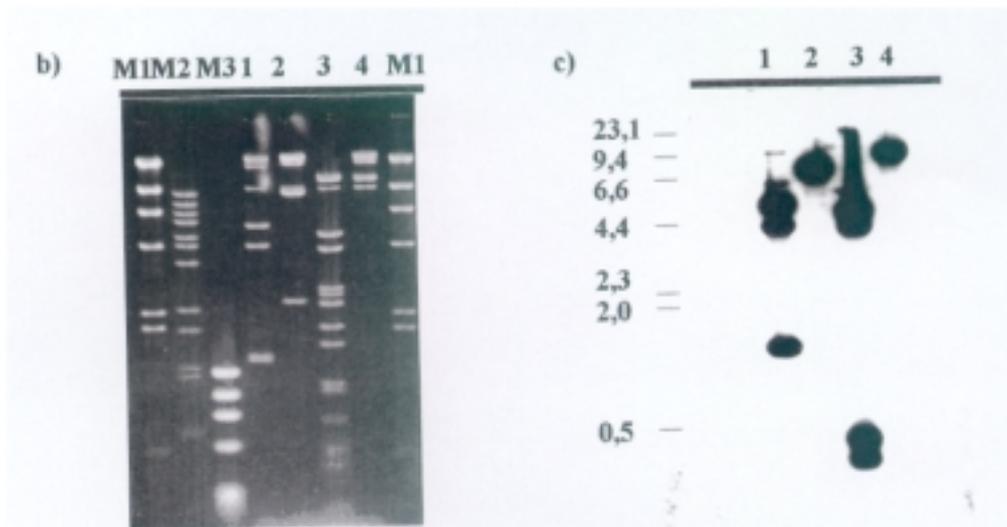


Fig. 11:

- a) ADN del clon λ 12QHP: digerido con *EcoR* I (1), sin digerir (2).
 b) Electroforesis del producto de las digestiones del clon λ 12QHP con las endonucleasas: *Hind* III (1); *Kpn* I (2), *Pst* I (3) y *Sac* I (4). M1: λ *Hind* III; M2: λ *Bst* EII; M3: ϕ X147/*Hae* III
 c) Hibridación de la membrana proveniente del gel de la figura 11-b con la sonda VPH18.

Era necesario conocer en qué fragmentos de restricción del inserto existían secuencias virales y en cuáles no, para obtener, una sonda celular adyacente al ADN viral con la que poder clonar posteriormente, de una genoteca genómica humana, el alelo normal o no-ocupado correspondiente al *locus* de integración viral. Con este fin se procedió a una segunda etapa en la caracterización del clon λ 12QHP analizando su ADN en digestión doble (o triple): *EcoR* I (endonucleasa que aísla el inserto del vector) y las siguientes endonucleasas de restricción (*Apa*

I, *Apa* I+*Sma* I, *Bam*H I, *Hinc* II, *Hind* III, *Hpa*I, *Mlu* I, *Nsi* I, *Nru* I, *Pvu* I, *Pvu* II, *Spe* I, *Sma* I, *Stu*I, *Xba* I y *Xho* I). Por medio de la electroforesis en agarosa al 0.8% se fraccionó el producto de estas digestiones (Fig. 12 a) que fue transferido a membrana de nylon empleando la técnica de “Southern” y se hibridó con la sonda VPH18 (Fig. 12 b). Seguidamente, se analizó la membrana con una sonda inespecífica de ADN genómico humano marcado por “random primer” que hibridaría con las secuencias de ADN repetitivo humano que existieran en el inserto del fago λ 12QHP. Los fragmentos de restricción que dieron lugar a una banda impresionada en la autorradiografía de este último “Southern” no podrían usarse como sonda en el análisis de ADN genómico ya que producirían hibridaciones inespecíficas con secuencias repetitivas humanas (Fig. 12 c)

Estos experimentos, a parte de servir para encontrar fragmentos de ADN celular adyacente al ADN viral, libre de secuencias repetitivas, que pudieran usarse como sondas celulares del *locus* de integración, sirvieron para la caracterización inicial, del clon λ 12QHP, pudiendo diferenciarse tres partes en su inserto: una zona central, de 7000 pb de tamaño constituida por ADN viral y dos zonas a ambos lados del ADN viral de unos 3500 pb y 1500 pb constituidas por ADN celular (Fig. 13).

Se subclonó el extremo 5' del clon, un fragmento de ADN celular de 2500 pb, con Extremos *Eco*R I-*Hind* III en el plásmido pBluescript SKII-, a este nuevo plásmido se le llamó pHE, y de él se subclonó otro fragmento de 1500 pb, con extremos *Eco*R I-*Spe* I, a este plásmido se le llamó pS3. Sin embargo, resultó, en un principio, imposible detectar fragmentos de ADN celular libre de secuencias repetitivas del extremo 3' del clon ya que en esta zona existían secuencias repetitivas de tipo *Alu*. (Fig. 13)

La característica del fago λ Dash II de poseer las secuencias de los oligonucleótidos T3 y T7 a ambos lados del sitio de multiclonado facilita la realización del mapa fino de restricción del inserto, de la manera en que se describe en Materiales y métodos. Así se detectaron en el inserto los sitios de restricción de las siguientes endonucleasas: *Apa* I, *Bam*H I, *Hind* III, *Kpn* I, *Spe* I y *Xba* I (Fig. 14).

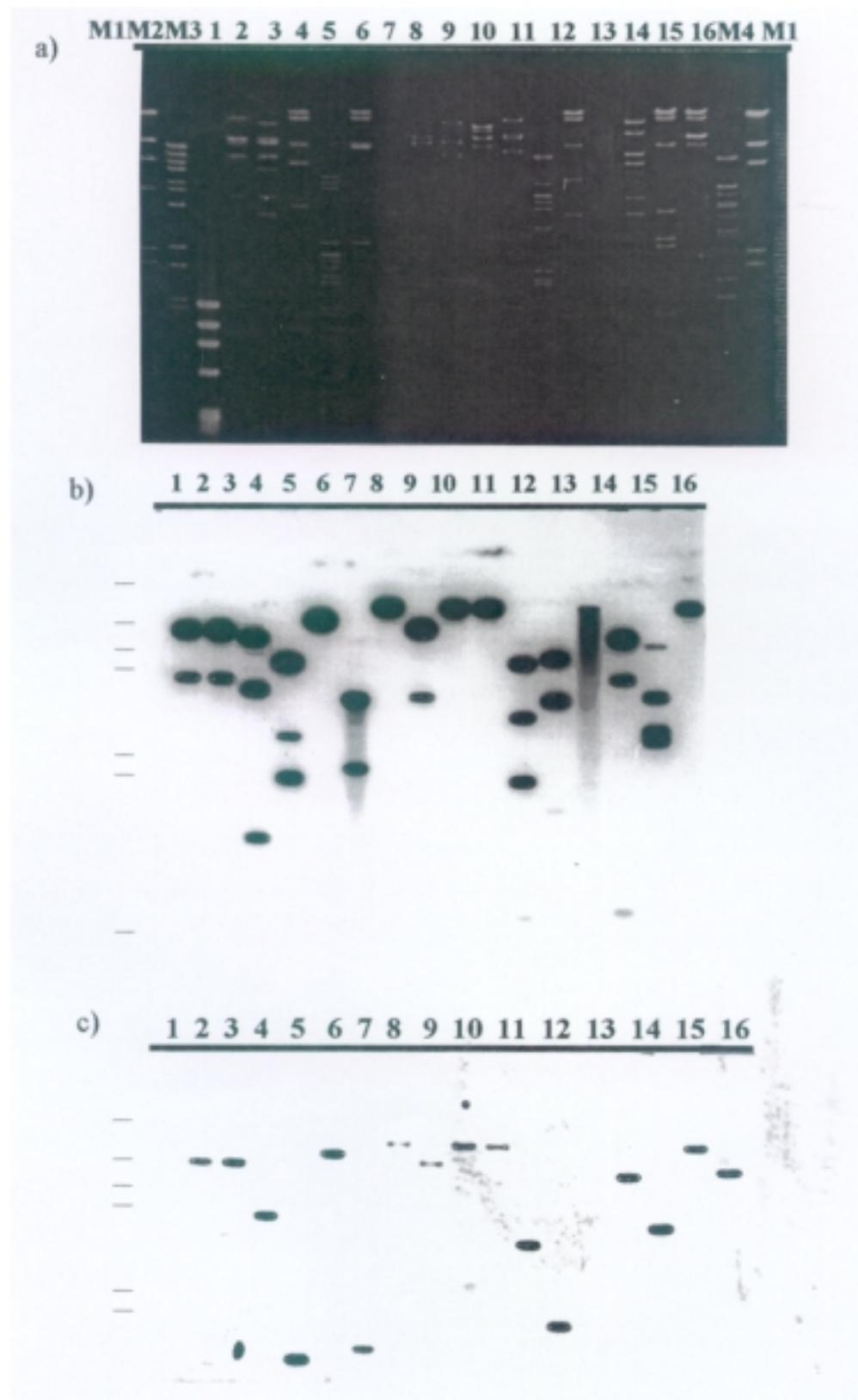


Fig. 12 a) Electroforesis del producto de las digestiones del clon λ 12QHP con los enzimas: *EcoR* I+ *Apa* I (1), *EcoR* I+ *Apa* I+*Sma* I (2), *EcoR* I+ *Bam*H I (3), *EcoR* I+*Hinc* II (4), *EcoR* I+*Hind* III (5), *EcoR* I+*Hpa* I (6), *EcoR* I+*Mlu* I (7), *EcoR* I+*Nsi* I (8), *EcoR* I+*Nru* I (9), *EcoR* I+*Pvu* I (10), *EcoR* I+*Pvu* II (11), *EcoR* I+ *Spe* I (12), *EcoR* I+*Sma* I (degradado) (13), *EcoR* I+*Stu* I (14), *EcoR* I+*Xba* I (15), *EcoR* I+*Xho* I (16). M1: λ *Hind* III, M2: λ *Bst* EII, M3: ϕ X147/*Hae* III, M4:pBR322/*Hae* III;b) Hibridación con la sonda VPH18 el filtro proveniente del gel de la figura 12 a; c) Hibridación con secuencias repetitivas humanas



Fig. 13: Esquema general del inserto del clon λ 12QHP indicando la posición de las sondas: S3 y HE. Se indica también la posición de una zona de ADN repetitivo humano tipo *Alu*; R: *EcoR* I, S: *Spe* I, H: *Hind* III, Hc: *Hinc* II.

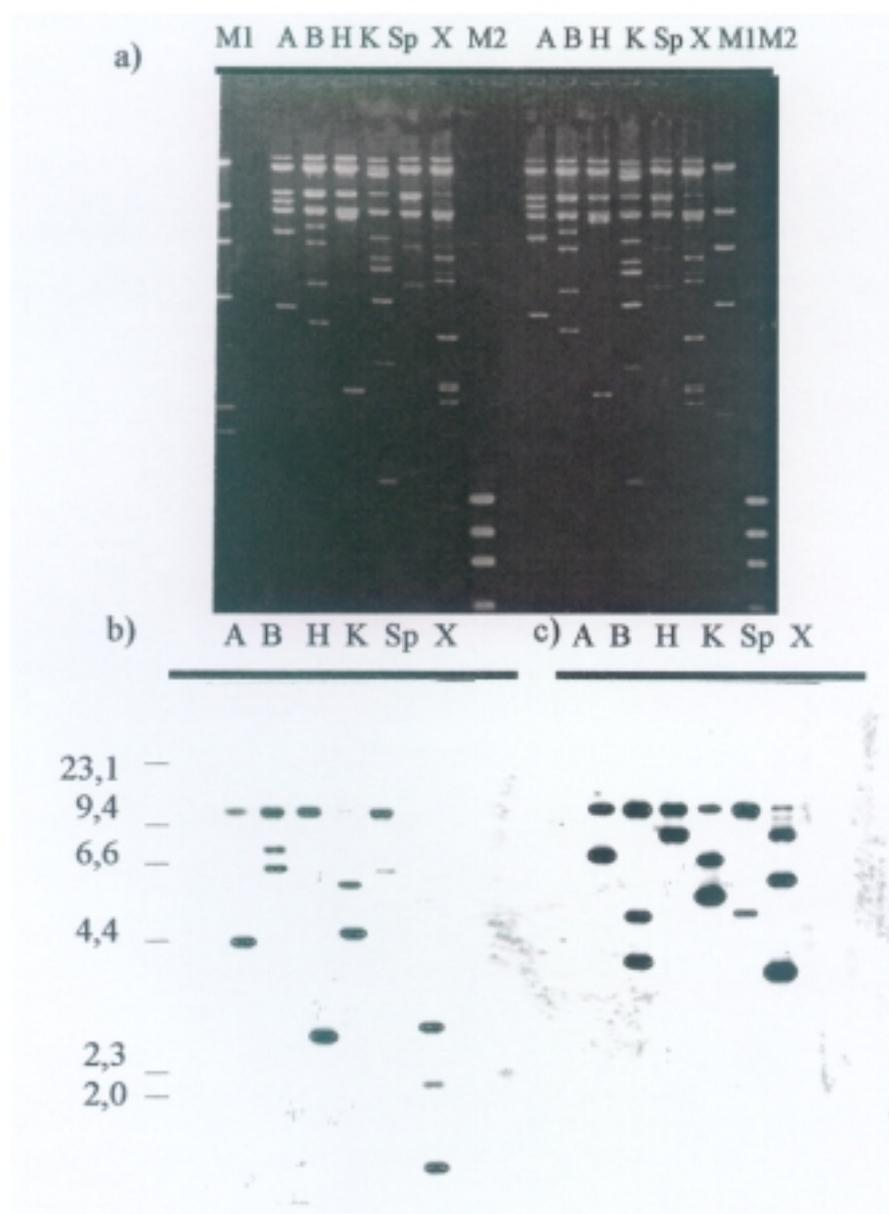


Fig. 14 a) Electroforesis de las digestiones parciales del clon λ 12QHP/*EcoR* I (digestión total) Con las endonucleasas: *Apa* I(A), *Bam*H I(B), *Hind* III(H), *Kpn* I(K), *Spe* I(S), *Xba* I(X). M1: λ *Hind* III; M2: ϕ X147/ *Hae* III . b) Hibridación con el oligonucleótido T3; c) Hibridación con el oligonucleótido T7

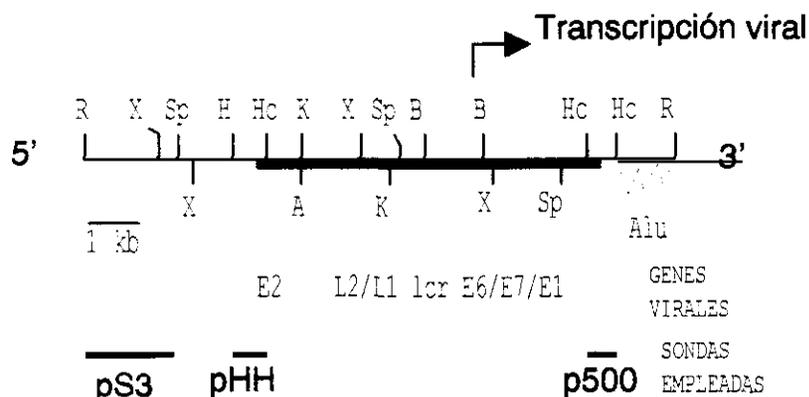


Fig. 14 d) Mapa de restricción del clon λ 12QHP, indicando los genes virales presentes (E1 y E2 no están enteros) y la posición de las sondas que se emplearán en el *screening* de la genoteca.

3.2b- Secuenciación de las zonas de recombinación entre el ADN viral y el celular

Con objeto de conocer el mecanismo de integración viral: si se produjo por recombinación ilegítima, es decir en un *locus* carente de homología con la secuencia del VPH18, o si por el contrario se produjo por recombinación homóloga en una secuencia diana del genoma celular, en la que existiera homología con alguna zona del ADN viral, era necesario subclonar los fragmentos en los que tenía lugar el punto de recombinación celular-viral 5' y 3', obtener la secuencia de ambos puntos de recombinación y estudiar la homología entre secuencias virales y celulares.

Ambos puntos de recombinación se subclonaron usando como vector el plásmido pBluescript SKII-®. El plásmido pHH contenía el punto de recombinación 5' en un inserto de 630 pb que comprendía desde el *Hind* III celular más cercano al ADN viral hasta el *Hinc* II en posición 3605 de la secuencia prototipo del VPH18 (GeneBank X05015). El fragmento fue secuenciado (GeneBank X94676) detectándose que no había homología con el ADN viral desde el nucleótido 1 hasta el 444, en el nucleótido 445 comenzaba la identidad con el nucleótido 3418 de la secuencia prototipo del VPH18, hasta el nucleótido 3605 del virus en que el acaba el inserto del clon pHH (Fig. 15 a), encontrándose 6 mutaciones puntuales en la zona de identidad con la secuencia prototipo del VPH18 en las posiciones 3462 (A por T), 3533 (T por C), 3357 (C por A), 3577 (C por T), 3584 (A por C) y 3591 (T por G).

El plásmido p500 contenía el punto de recombinación 3' en un inserto de 473 pb que comprendía desde el *Hinc* II en posición 2472 del genoma del VPH18, hasta el primer *Hinc* II

celular mostrando una homología del 98% con la secuencia prototipo de VPH18 en las 173 primeras bases del clon (fig. 15 b). Detectándose las siguientes mutaciones 2482 (T por C), 2509 (G por A) y 2551 (G por T). La homología desaparecía a partir del nucleótido 2643 de la secuencia de VPH18 y del nucleótido 474 del inserto.

a)

TTCGAGCATA CAGAAACTT GAAAGAACAA TACAATATAA AATGTCTTTT
 GCAGCTTCTT TTTCTGATCC AAGATCCAAT CAAATGCAAT TTGATCACAT
 TTGATTGTTG TATATTTTAA GTCTTTCTTA ATCTAGAATA ATCTTTCTTC
 TTTTAAATG ACATGTACTT TTTTCATATAG AATATCCCAC ACTTTCTGAA
 TTTGTCCGTT TCCTCATATA TTATGTTGTA TAATTCATAT TGCATCAGAT
 CAAGAGGCAC ATAATGTCAG GTTGTCCATA TGCTTATGAT GCTGTTTGAT
 CACCTGACTA ATGAATCAAC TCACCAGAGT TCTCCATTGG GAAGATAAAT
 TTTCTCTTT GTAATTAGTA AGAAATTCAT GGGGTGATAC TTTGATCACC
 TTTCAAATAT CCACGATCTT TTACCCAATG TGCAGTACCA GATCTTTGAC
TCTATGTGCA GTACCAGTGA CGACACGGTA TCCGCTACTC TGCTTGTTAA
ACAGCTACAG CACACCCCT CACCGTATTC CAGCACCGTG TCCGTGGGCA
CCGCAAAGAC CCACGGCCAG ACGTCGGCTG CTACAAGACC TGGACACTGT
GGACTTGCGG AGACGCAGCA GTGTGGACCT GTC

b)

AACAGATACC AAGGTGGCCA TGTTAGATGA TGCAACAACC ACGTGTTGGA
CATACTTTGA TACCTATATG AGAAATGCTT TAGATGGCAA TCCAATAAGT
ATTGATAGAA AGCACAAACC ATTAATACAA CTAAAATGTC CTCCAATACT
ACTAACCACA AATATACATC CGGTCTTGTTG GGGTAAAGGA GCATCTAGTT
 GACTTGCCCA AACTTCTCCC CTGCCACAGA CTTCCCCTTG CCACAGACTT
 CCCCTTGTTT CTCCTTGAT GCTCCCCTCT TACAATGCAG CCTTCACTCC
 AGGGACTCTG GGCCTGTTGC ATTTTACTTT TCTGTCACGA CCAGCCAACT
 TCTCTTACT GACTTTCTCT CCACCTCATA GATTTTGTGAT TATTCACAGG
 CTCTGCTGCT CCATGGCATT ATTGTCATAT GGCTACTGCT ATAAAAATTA
 GTAGTGTACT GAAAAGGTT

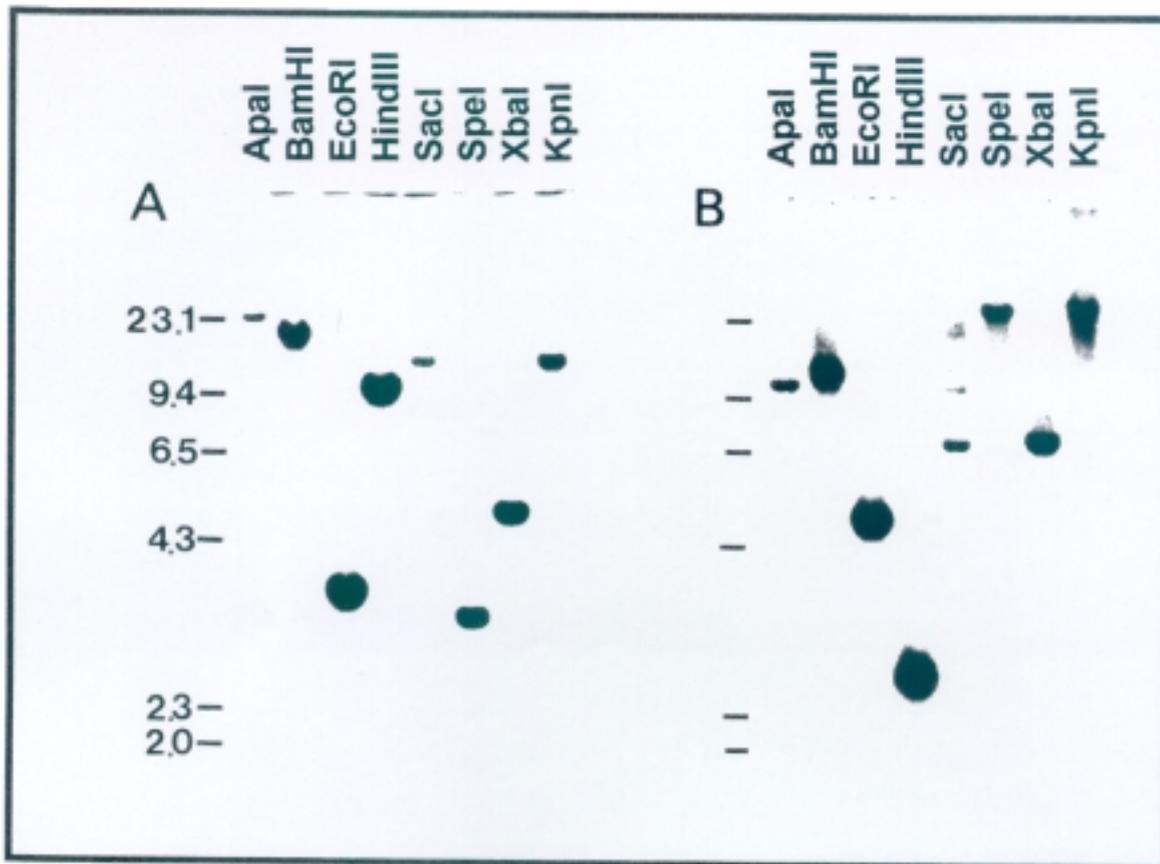
Fig. 15 a) Secuencia del inserto del clon pHH, de 633 pb, que contiene el punto de recombinación viral-celular 5' (GeneBank X94676) y b) Secuencia de inserto del clon p500 de 469 pb que contiene el punto de recombinación viral-celular 3'. Las regiones subrayadas representan las secuencias de un 98% de homología con la secuencia prototipo de VPH18.

Estos datos apuntaban que el fragmento de genoma viral comprendido entre los nucleótidos 2643 y 3418 se había perdido en el proceso de integración. Estos 775 nucleótidos delecionados constituyen la parte final marco de lectura abierto E1 y la primera mitad del marco de lectura abierto E2.

De estos resultados se dedujo que la recombinación en el *locus* de integración debió ser de tipo ilegítimo ya que no se observa homología significativa entre las secuencias celulares flanqueantes y el ADN viral.

3.2c- Las sondas celulares flanqueantes al sitio de integración reconocen regiones cromosómicas distintas.

El siguiente paso en el estudio del *locus* de integración viral consistía en estudiar si las secuencias celulares flanqueantes al ADN viral, es decir, la parte celular de los subclones p500 y pHH, eran secuencias contiguas antes de que el virus se integrara, o si por el contrario se encontraban separadas por un fragmento de ADN más o menos grande. Los estudios se hicieron sobre una línea celular de linfoma de Burkitt llamada Ramos (Klein, 1975), que no tiene alteraciones en esta región, ni secuencias de VPH integradas en su genoma, realizándose dos electroforesis idénticas de los productos de las digestiones del ADN de esta línea celular con las siguientes enzimas de restricción: *Apa* I, *Bam*H I, *Eco*R I, *Hind* III, *Sac* I, *Spe* I, *Xba* I, *Kpn* I. Se transfirieron los productos de ambas electroforesis a membranas nylon por medio de la técnica de "Southern", y se hibridaron con la sonda S3 y 500 respectivamente. El patrón de bandas obtenido con cada una de las dos sondas fue absolutamente distinto (Tabla 5), indicando que todas las enzimas mencionadas cortaban al menos una vez entre las secuencias celulares flanqueantes al ADN viral, en un cromosoma 12 normal, y por tanto ambas secuencias se encontraban separadas antes de que el virus se integrara (Fig. 16). Resultados idénticos se obtuvieron utilizando otras líneas celulares sin alteraciones en el cromosoma 12, (no se muestra).



	Apal	BamHI	EcoRI	HindIII	SacI	SpeI	XbaI	KpnI
A(kb)	24	19	3,5	9,6	15	3	5,8	15
B (kb)	12	14	4,5	2,8	6,7	30	6,9	35

Fig. 16: Hibridación del ADN de la línea celular Ramos digerido con distintas endonucleasas, con sondas 500 (A) y S3 (B).

Tabla 5: Tamaño en kb de las bandas obtenidas al hibridar con cada sonda. Puede apreciarse que para un mismo enzima las bandas obtenidas en A y en B son siempre distintas.

3.3- CLONACIÓN DEL ALELO NO-OCUPADO CORRESPONDIENTE AL *LOCUS* DE INTEGRACIÓN VIRAL, *PAL2*.

El locus de integración con estructura normal o germinal donde se integró el virus se ha denominado *PAL2* (papillomavirus integration locus -2) por continuidad con sitios de integración previamente descritos (Lazo, 1988)

3.3a- Clonación del alelo no-ocupado correspondiente al punto de recombinación 5'.

Análisis de la genoteca genómica con la sonda S3.

Con objeto de clonar el alelo no-ocupado correspondiente al *locus* de integración del ADN viral, o dicho con otras palabras, para obtener el clon de lambda que contuviera una secuencia idéntica a la que existiera en la célula del epitelio cervical antes de que se produjera la integración del ADN viral, se realizó el *screening* de una genoteca genómica comercial construida a partir de genoma humano normal, procedente de un niño caucasiano de tres años, en el fago λ Fix® II como vector. El fragmento S3, de 1,5 kb, subclonado del extremo 5' del clon λ 12QHP, es altamente específico en hibridaciones y carece de secuencias repetitivas, por ello fue empleado como sonda en el *screening* de esta genoteca. Se analizaron aproximadamente 10^6 clones extendidos sobre 8 placas de LB-agar de 400 cm². La cepa bacteriana usada en la infección fue *E.coli* XL1-Blue MRA(P2). Después de repetidos ciclos de enriquecimiento y purificación se aislaron dos clones positivos: λ F1 y λ F4, de los que se obtuvo ADN a partir de sendas infecciones a gran escala, en medio líquido. El ADN de los fagos λ F1 y λ F4 se analizó sometándolo a digestiones con las siguientes endonucleasas: *EcoR* I, *Xba* I, *EcoR* I+*Not* I, *EcoR* I+*Hind* III, *EcoR* I+*Spe* I. El producto de estas digestiones se transfirió a una membrana de nylon por medio de la técnica de "Southern" y se hibridó con la sonda S3 (Fig. 17).

En análisis posteriores del mismo filtro con la sonda HH que posee la secuencia del punto de ruptura 5' no pudo detectarse ninguna banda (no se muestra esta figura), por tanto, desafortunadamente, no había conseguido clonarse la secuencia celular no ocupada correspondiente al punto de recombinación 5'.

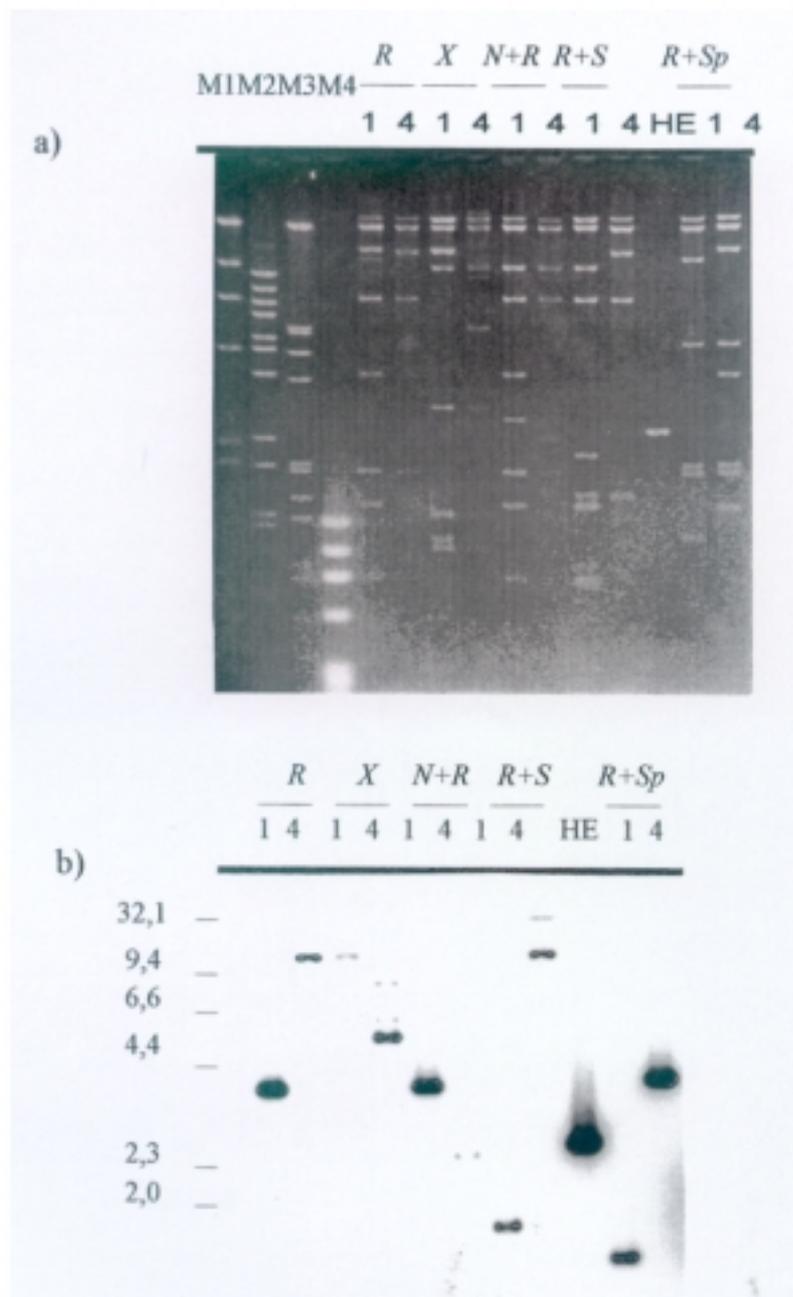


Fig. 17 a) Electroforesis del producto de las digestiones de los clones λ F1 (1) y λ F4 (4) con las endonucleasa *EcoR* I (E), *Xba* I(X), *Not* I+*EcoR* I (N+R), *EcoR* I+*Sac* I (R+S)+ *EcoR* I+*Spe* I (R+S). M1: λ *Hind* III, M2: λ *Bst* EII, M3: pBR322/*Hae* III, M4: ϕ X147/*Hae* III. HE: fragmento *Hind* III- *EcoR* I de 2500 pb purificado del clon λ 12QHP; b) Hibridación con la sonda S3, la membrana proveniente del gel de la figura 17 a.

Se realizó el mapa de restricción del inserto de λ F4 por medio de la hibridación, con los oligonucleótidos T3 y T7, del producto de las digestiones parciales del inserto con los enzimas: *Apa* I, *EcoR* I, *Hind* III, *Spe* I y *Xba* I (Fig. 18). Se observó que se había clonado la zona adyacente al punto de recombinación que quería clonarse (el correspondiente al punto de

recombinación 5') pues el clon λ F4 no incluía la secuencia celular de la sonda HH y por tanto este clon no comprendía la región del alelo no-ocupado correspondiente al punto de ruptura por la integración viral

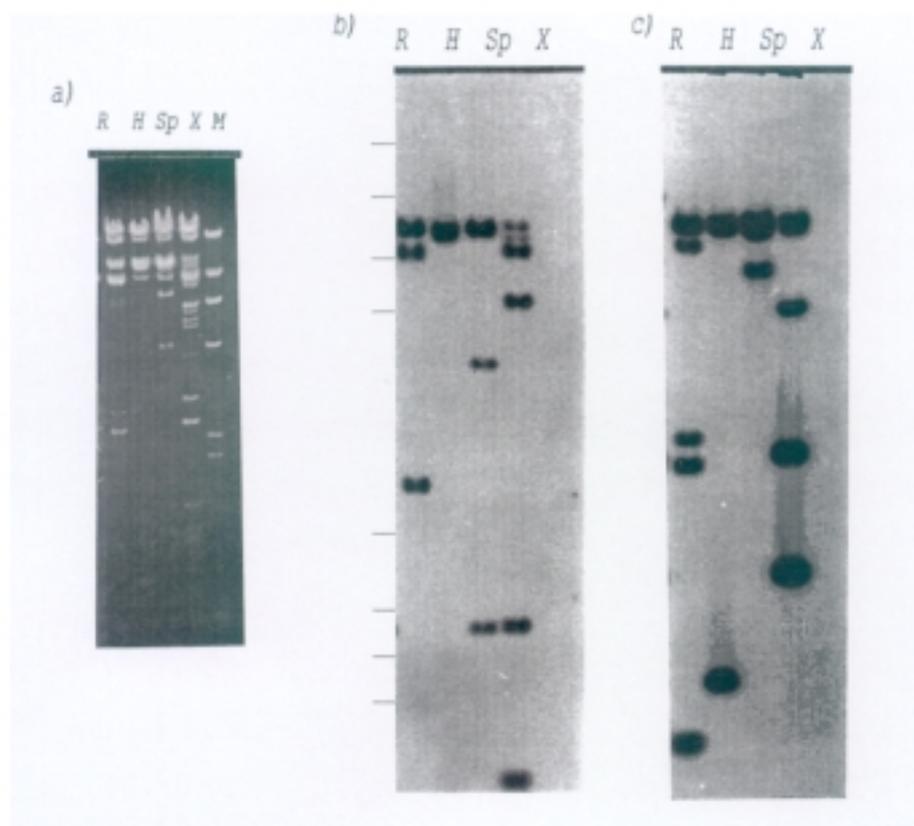


Fig. 18 a) Electroforesis de las digestiones parciales del clon λ F4/*Not* I (Digestión total), con las endonucleasas: *Eco*R I (R), *Hind* III (H), *Spe* I (S), *Xba* I (X); M λ *Hind* III; b) Hibridación con T3; c) Hibridación con T7

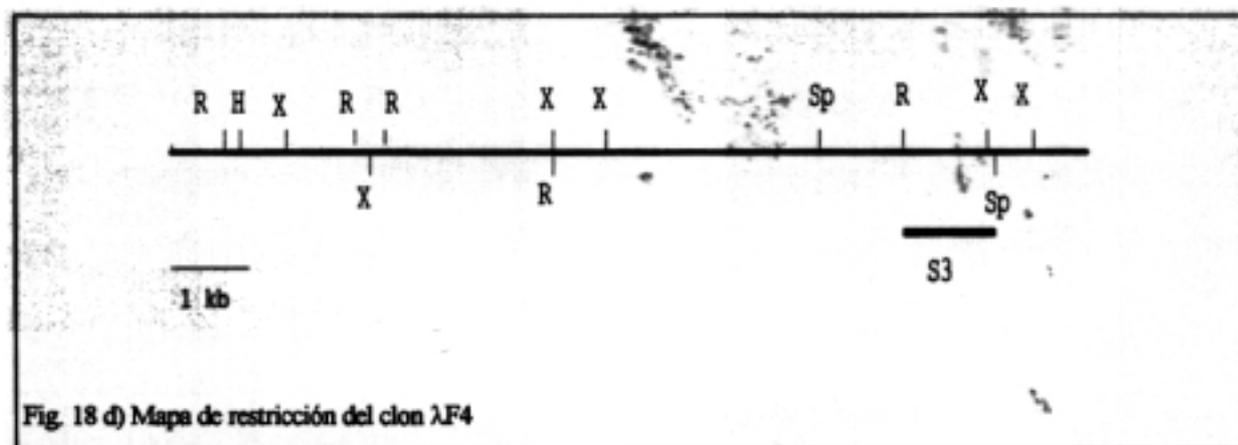


Fig. 18 d) Mapa de restricción del clon λ F4

Análisis de una genoteca genómica con la sonda HH:

Con objeto de obtener el alelo no-ocupado correspondiente al punto de recombinación 5' del *locus* de integración viral, volvieron a infectarse bacterias con 10^6 ufp. de la genoteca genómica comercial en λ Fix II, extendiéndose en 8 placas de LB-agar de 400 cm^2 y se analizaron con la sonda HH marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP por el método de "random primer". El fragmento HH contiene el punto de recombinación 5' viral-celular, e hibridaría con los clones correspondientes de esta genoteca por la parte celular de su secuencia, ya que esta genoteca no posee secuencias del virus de papiloma. Tras cuatro ciclos de enriquecimiento y purificación se obtuvieron 6 clones positivos. De cada uno de ellos se realizó un lisado en placa, se titularon los lisados y se purificó el ADN a pequeña escala. Con el fin de detectar qué fagos eran idénticos entre sí y qué fagos eran diferentes, el ADN de cada fago se digirió con la endonucleasa *Xba* I, que libera los insertos del vector λ Fix II, a demás de cortar repetidas veces en los insertos, los productos de las digestiones se fraccionaron en gel de agarosa al 1%. Los clones λ h12/82_{HH} y λ h12/6_{HH} resultaron ser diferentes. Los productos de las digestiones se transfirieron a membrana de nylon y se hibridaron a la sonda HH con objeto de comprobar que en todos estos clones existían las secuencias celulares del clon pHH. La obtención de dos señales impresionadas en la autorradiografía, de 700 y 300 pb, en el ADN proveniente de cada clon indicaba que en todos los clones existían las secuencias de la parte celular la sonda HH y por tanto existían las secuencias germinales del *locus* de integración. Por hibridación con la sonda S3 sobre el mismo filtro se comprobó que en todas ellas estaba también incluida la secuencia S3. (Fig. 19 a, b, c). Los clones λ h12/82_{HH} y λ h12/6_{HH}, que producían fragmentos diferentes en digestión con *Xba* I, fueron digeridos con: *Eco*R I, *Hind* III y *Xba* I y fraccionados en gel de agarosa detectándose fragmentos de restricción distintos y otros comunes para cada uno de las endonucleasas (Fig. 19 d).

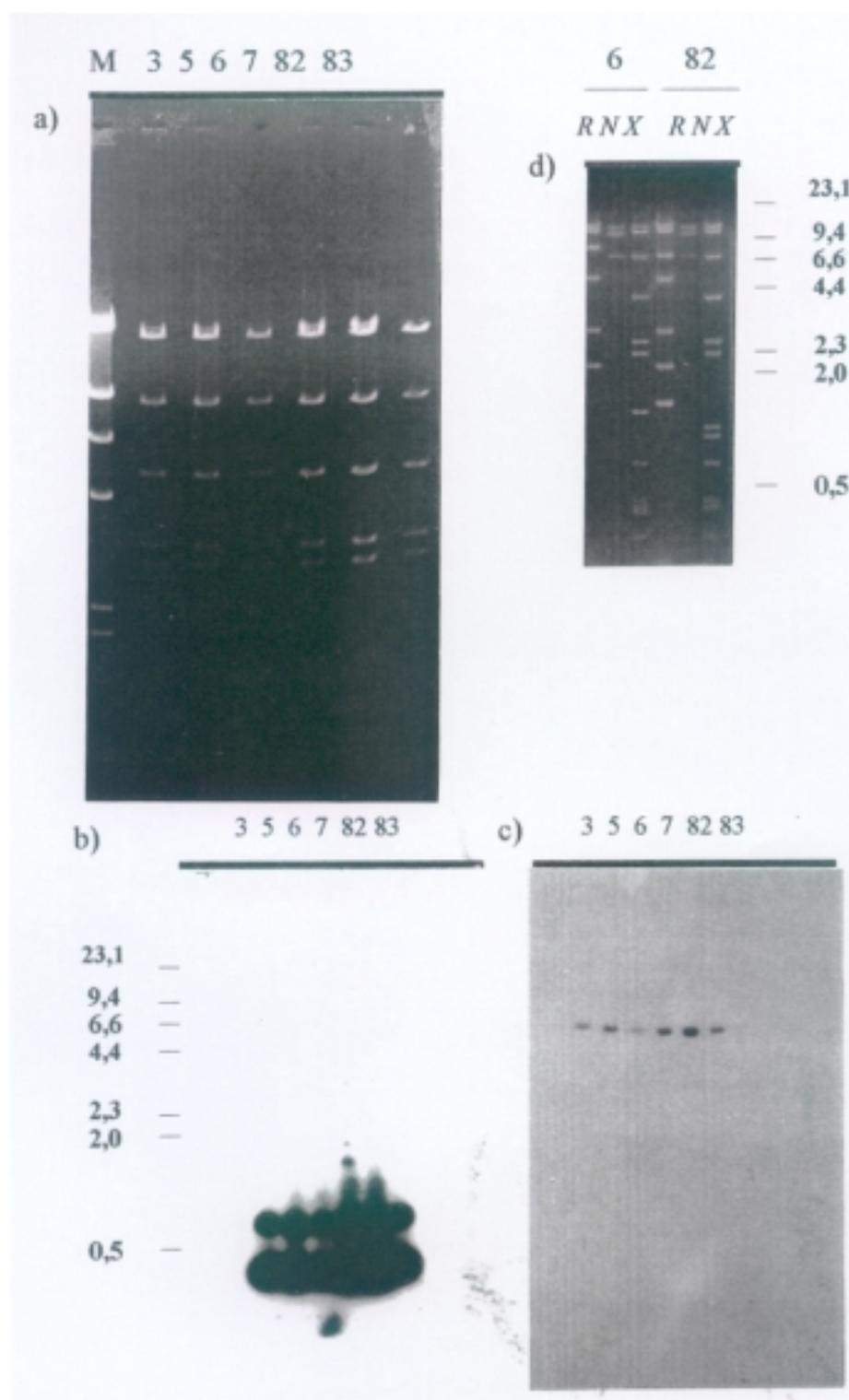


Fig. 19 a) Electroforesis del ADN de los clones λ h12/3_{HH} λ h12/5_{HH} λ h12/6_{HH} λ h12/7_{HH} λ h12/82_{HH} λ h12/83_{HH} obtenidos tras el *screening* de la genoteca con la sonda HH, digeridos con la endonucleasa *Xba* I; b) Hibridación del filtro proveniente del gel de la figura 19 a, con la sonda HH; c) Hibridación del filtro proveniente del gel de la figura 19 a, con la sonda S3 d) Electroforesis de los clones λ h12/82_{HH} y λ h12/6_{HH} con las endonucleasas de restricción: *Eco*R I (R), *Not* I (N), *Xba* I (X)

3.3b- Clonación del alelo no-ocupado correspondiente al punto de recombinación 3'.

Análisis de una genoteca genómica con la sonda 500:

Con objeto de obtener el alelo germinal o no-ocupado correspondiente al punto de recombinación 3' del *locus* de integración viral, volvió a realizarse una nueva infección de las bacterias con 10^6 ufp. de la genoteca genómica comercial en λ Fix II, extendiéndose en 8 placas de LB-agar de 400 cm². y se analizaron con la sonda 500 marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP por el método de "random primer". El fragmento 500 contiene el punto de recombinación 3' viral-celular, e hibridaría con los clones correspondientes de esta genoteca por la parte celular de su secuencia, ya que esta genoteca no posee secuencias del virus de papiloma. Tras cuatro ciclos de enriquecimiento y purificación se obtuvieron 3 clones positivos. De cada uno de ellos se hizo un lisado en placa y se purificó el ADN a pequeña escala. Con el fin de detectar si los clones eran idénticos entre sí o diferentes, el ADN de cada fago se digirió con una serie de endonucleasas de restricción que cortan repetidas veces en los insertos (Fig. 20 a), detectándose bandas diferentes en cada uno de los tres clones pero también bandas comunes, lo que indicaba que los clones eran distintos pero tenían zonas solapantes. El ADN se transfirió del gel a la membrana de nylon usando la técnica de "Southern", obteniéndose en los tres clones las mismas bandas impresionadas en la autorradiografía cuando se hibridó la membrana con la sonda 500, excepto en el fragmento EcoR I del clon λ h12/1₅₀₀, que se observa una banda de menor tamaño por coincidir con el extremo del clon (Fig. 20 b y c).

3.4- CARACTERIZACIÓN DE LOS CLONES: λ h12/82_{HH}, λ h12/1₅₀₀ y λ h12/32₅₀₀.

La caracterización de los alelos no-ocupados correspondientes a los puntos de recombinación 3' y 5' se realizó con el fin de comparar ambos *loci* entre sí, intentando determinar el tamaño de la secuencia celular delecionada. Los clones λ h12/1₅₀₀ y λ h12/32₅₀₀, obtenidos con la sonda 500, fueron elegidos para realizar el mapa de restricción del alelo no-ocupado correspondiente al punto de recombinación 3' (Fig. 21 y 22) y el clon λ h12/82_{HH}, obtenido con la sonda HH, fue elegido para realizar el mapa de restricción del punto de recombinación 5' (Fig. 23), ya que de este *locus* existía el mapa del clon λ F4, obtenido con la sonda S3;

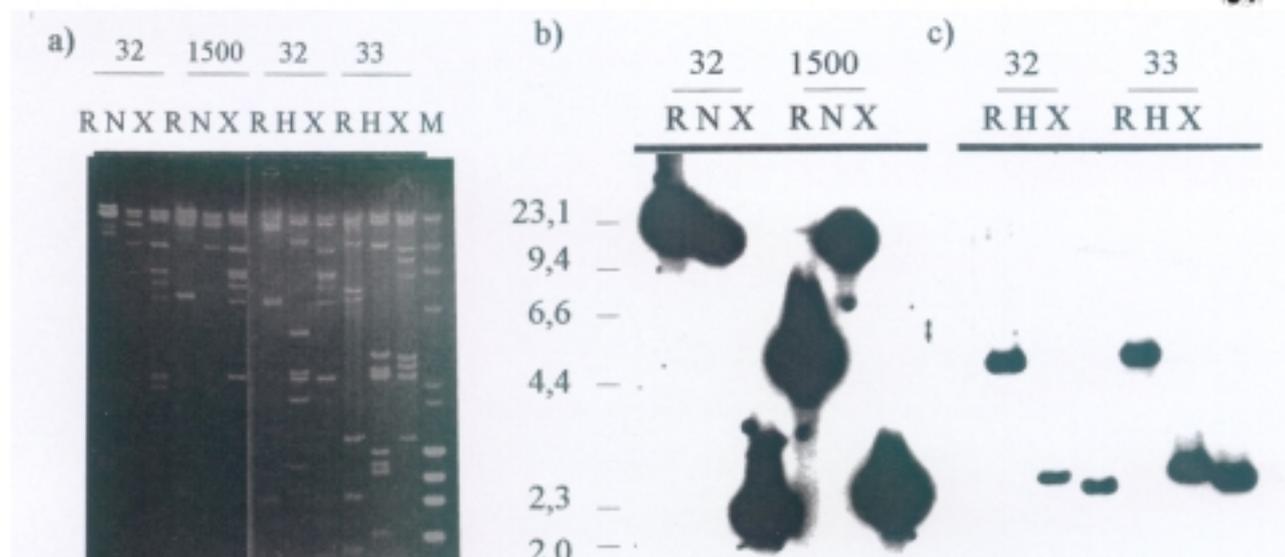


Fig. 20 a) Electroforesis de distintas digestiones del ADN de los clones λ h12/1₅₀₀ (1500), λ h12/32₅₀₀ (32) y λ h12/33₅₀₀ (33), obtenidos tras el *screening* de la genoteca con la sonda 500. R: *EcoR* I, N: *Not* I, X: *Xba* I, H: *Hind* III; b) y c) Hibridación de los filtros provenientes del gel de la figura 20 a, con la sonda 500.

Era necesario disponer de gran cantidad de ADN para la realización los mapas de restricción de los clones, por ello se llevaron a cabo infecciones a gran escala y a baja multiplicidad de bacterias de la estirpe XL1-Blue MRA. El ADN de cada clon, se extrajo a partir de partículas fago purificadas por centrifugación en gradiente escalonado de CsCl. Con el ADN de gran pureza obtenido de cada uno de estos clones, se hicieron los mapas de restricción de las siguientes endonucleasas: *EcoR* I, *Sac* I, *Spe* I, *Xba* I, *Apa* I, *Kpn* I y *Hind* III por la técnica de las digestiones parciales del ADN con cada una de las enzimas mencionadas, el fraccionamiento de sus productos por electroforesis en agarosa al 1%, transferencia a membrana de nylon e hibridación con la sonda del oligonucleótido T3 y T7, marcadas en el extremo 5' con γ -³²PdATP.

Los mapas de restricción de los dos clones del alelo no-ocupado correspondientes al *locus* de integración 5' (clones obtenidos con la sonda HH y S3) mostraron gran homología en el tamaño de los fragmentos de restricción entre el extremo 3' del clon λ h12/82_{HH} y el clon λ F4 (Fig. 24b) y Los clones obtenidos con la sonda 500 mostraron a su vez gran homología en sus fragmentos de restricción, entre el extremo 3' del clon λ h12/32₅₀₀ y el extremo 5' del clon λ h12/1₅₀₀ (Fig. 24 a).

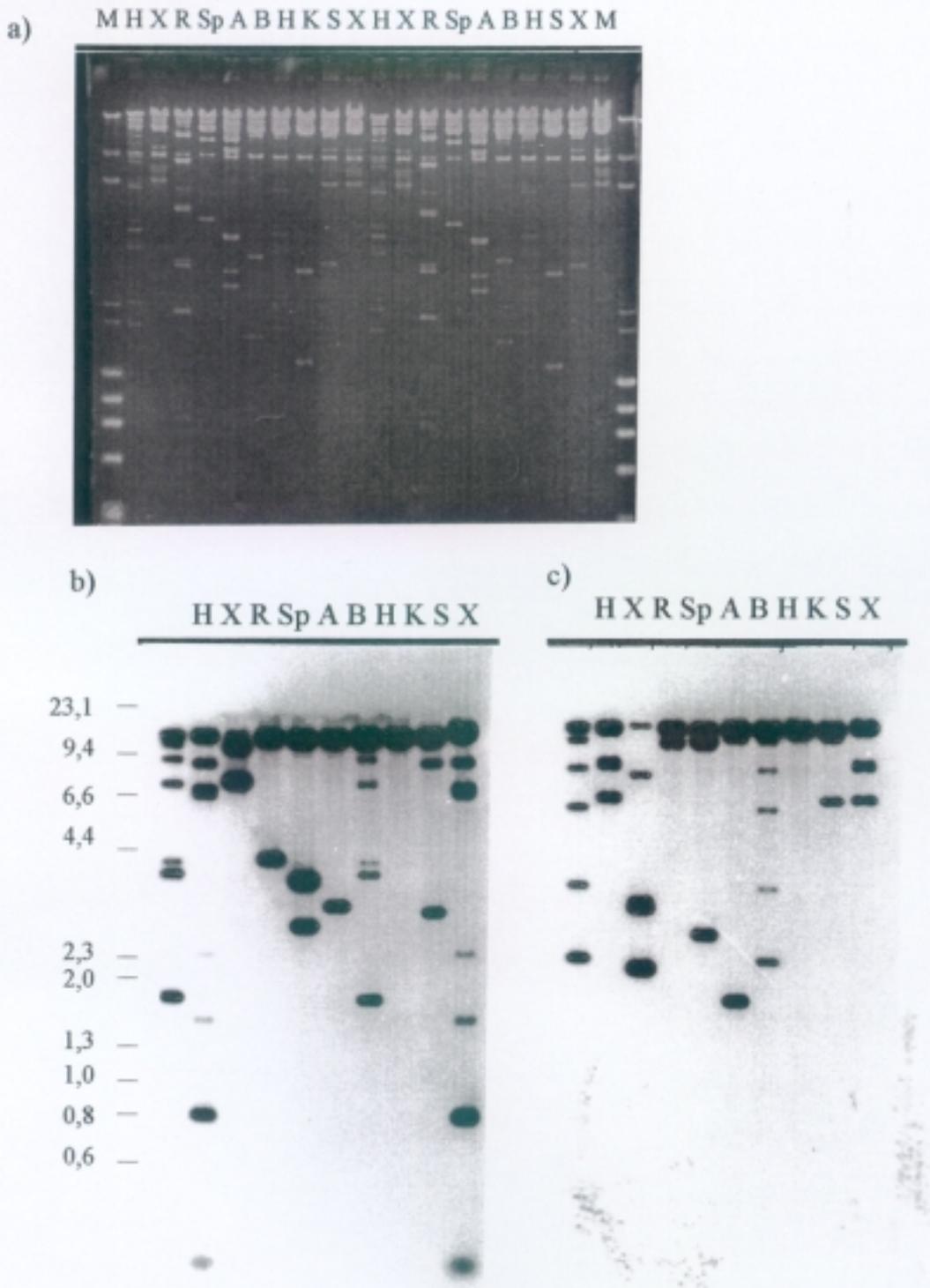


Fig. 21 a: Digestiones parciales con distintas endonucleasas del ADN del clon λ h12/32₉₉₉/Not I (digestión total). H: *Hind* III; X: *Xba* I; R: *EcoR* I; Sp: *Spe* I; A: *Apa* I; B: *BamH* I; K: *Kpn* I; S: *Sac* I; M: λ / *Hind* III; b: Filtro hibridado con T3, c: Filtro hibridado con T7.

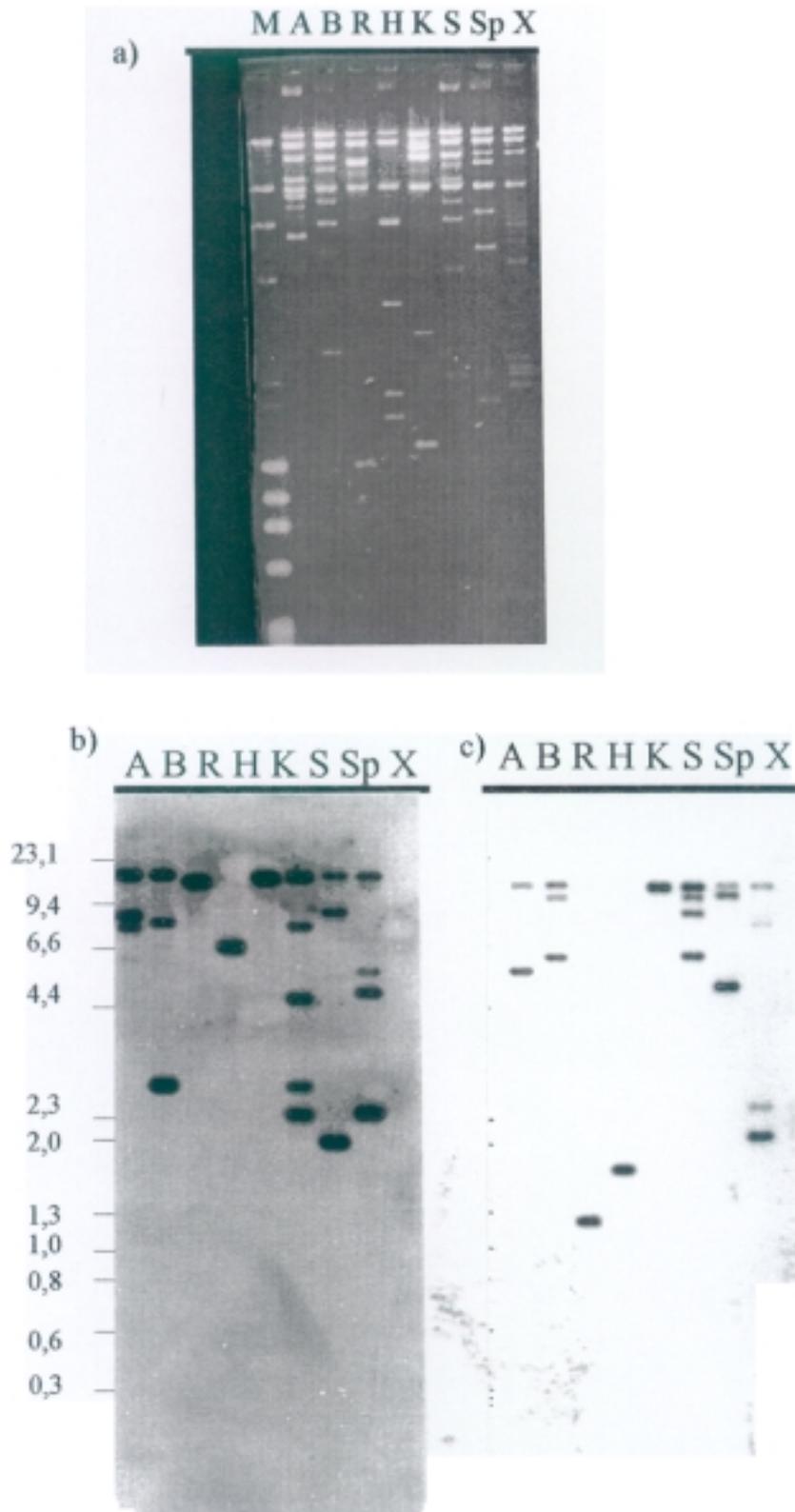


Fig. 22: Digestiones parciales con distintas endonucleasa del clon λ h12/1500 / Not I (digestión total), A: *Apa* I, B: *Bam*H I; H: *Hind* III; R: *Eco*R I; K: *Kpn* I; S: *Sac* I; Sp: *Spe* I; X: *Xba* I, M: λ / *Hind* III; b.) Filtro hibridado con T3, c.) Filtro hibridado con T7.

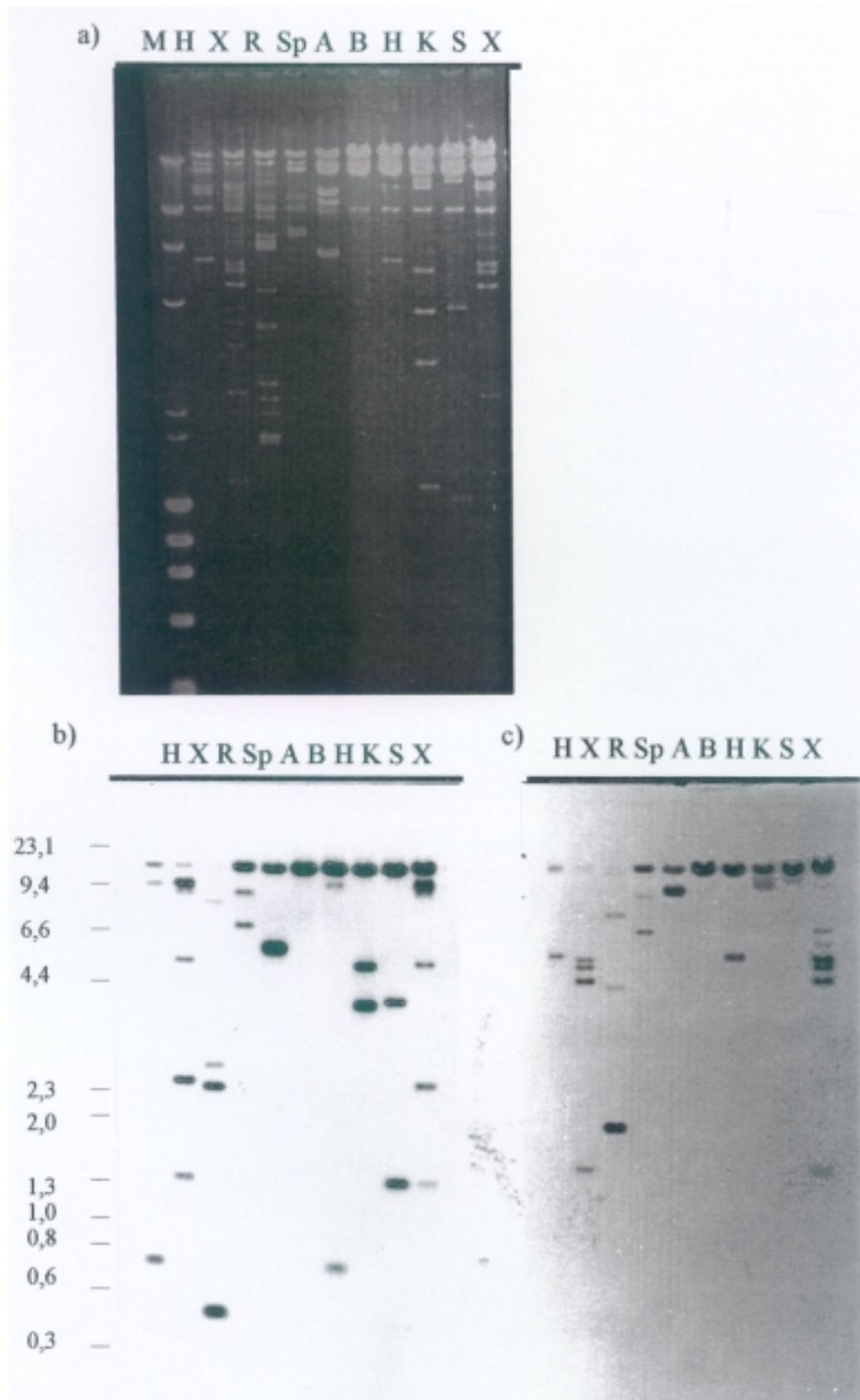


Fig. 23: Digestiones parciales con distintas endonucleasa del clon λ h12/82_{III} / *Not* I (digestión total), A: *Apa* I, B: *Bam*H I; H: *Hind* III; R: *Eco*R I; K: *Kpn* I; S: *Sac* I; Sp: *Spe* I; X: *Xba* I; M: λ / *Hind* III; b.) Filtro hibridado con T3, c.) Filtro hibridado con T7.

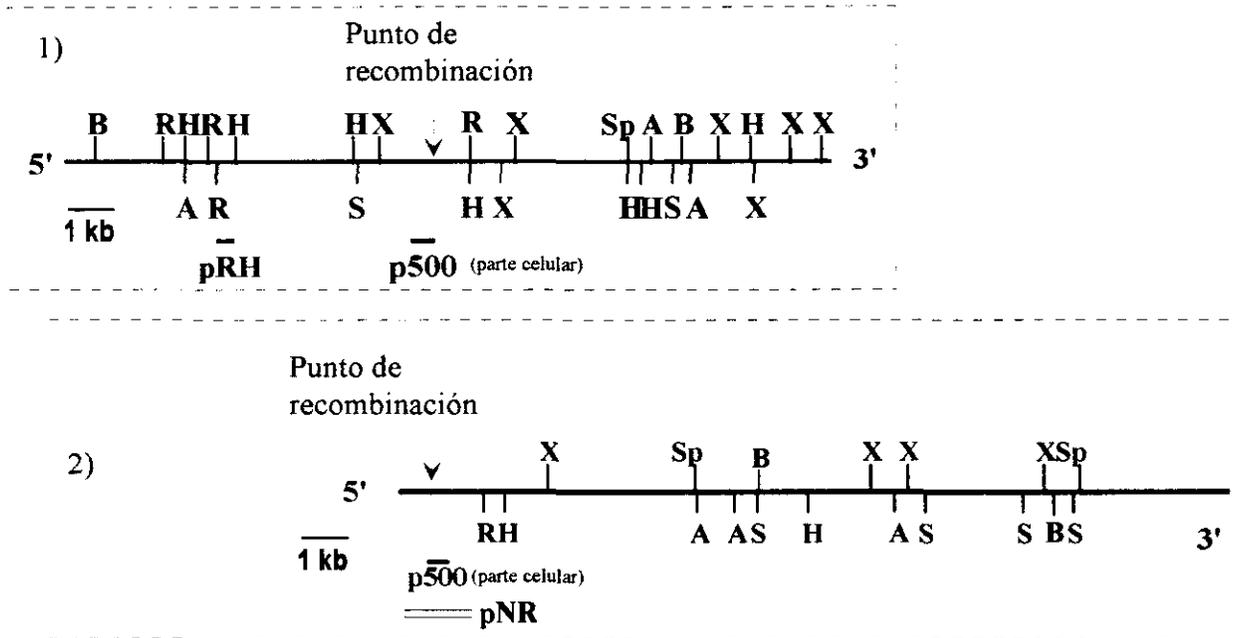


Fig. 24 a) Homología entre los mapas de restricción de los clones λ h12/32₅₀₀ (1) y λ h12/1₅₀₀ (2) indicando las posiciones de las sondas que se usaron para distintas hibridaciones. A: *Apa* I, B: *Bam*H I, H: *Hind* III, R: *Eco*R I, K: *Kpn* I, S: *Sac* I, Sp: *Spe* I, X: *λba* I; El clon p500 hibrida por la parte celular de su inserto. pNR: fragmento clonado para su secuenciación como se describirá en el apartado 3.4a.

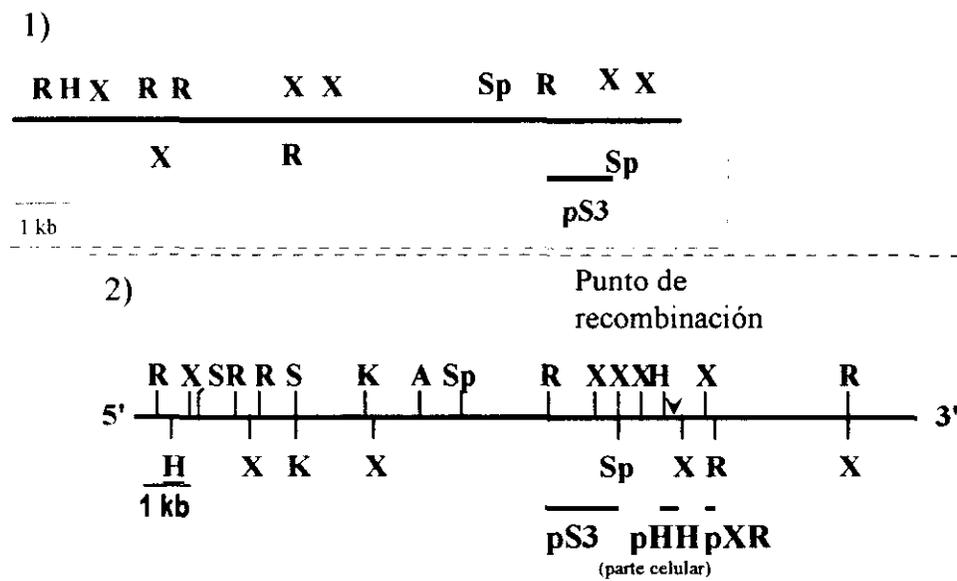


Fig. 24 b) Homología entre los mapas de restricción de los clones λ h12/82_{HH} (1) y λ F4 (2) indicando las posiciones de las sondas que se usaron para distintas hibridaciones. A: *Apa* I, B: *Bam*H I, H: *Hind* III, R: *Eco*R I, K: *Kpn* I, S: *Sac* I, Sp: *Spe* I, X: *λba* I; El clon pHH hibrida por la parte celular de su inserto. El fragmento XR fue clonado para su empleo en el experimento que se describe en el apartado 3.5.

El mapa de restricción del alelo no-ocupado del punto de recombinación 3' obtenido del clon λ h12/32₅₀₀ o del clon λ h12/1₅₀₀, se comparó con el mapa del alelo no-ocupado del punto de

recombinación 5', obtenido del clon λ h12/82_{HH} o del clon λ F4 no detectándose ninguna región homóloga entre ellos, este hecho indicaba carencia total de solapamiento entre los clones de lambda de ambos flancos y era por tanto una prueba de que las secuencias celulares adyacentes al ADN viral se encontraban separadas varias kb en un cromosoma normal o no-ocupado (fig. 25).

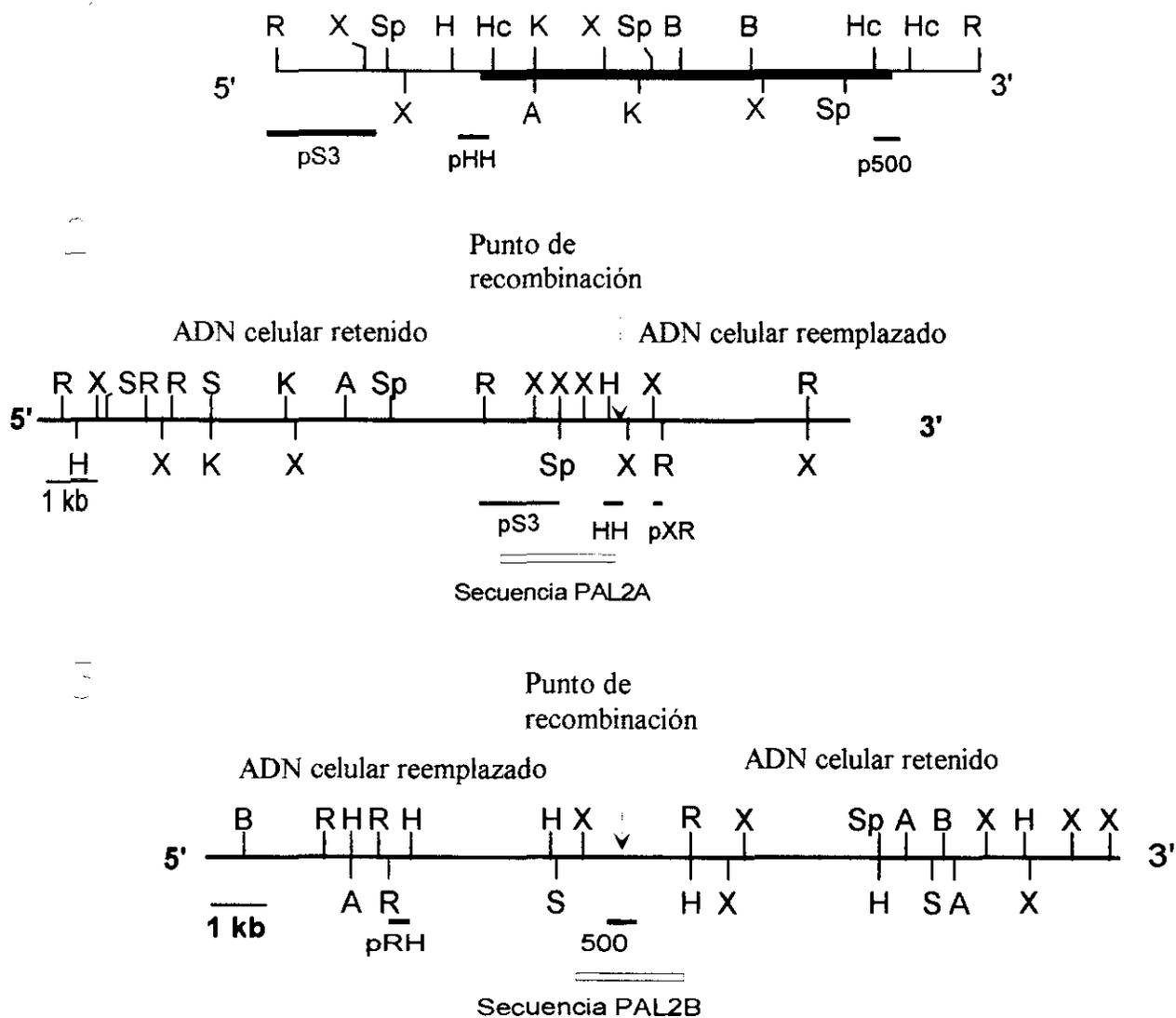


Fig. 25: Mapa de restricción del alelo ocupado (1) y no-ocupados y correspondientes al punto de recombinación 5' (2) y 3' (3), indicando las posiciones de las sondas que se usaron para distintas hibridaciones. A: *Apa* I; B: *Bam*H I; H: *Hind* III; Hc: *Hinc* II (no se muestran todos los que hay) R: *Eco*R I; K: *Kpn* I; S: *Sac* I; Sp: *Spe* I; X: *Xba* I; En (2) y en (3) las sondas HH y 500 solo hibridan por la parte celular de su secuencia. **Secuencia PAL2A** contiene el alelo no-ocupado del punto de recombinación 5' como se describirá en el apartado 3.4 a; **Secuencia PAL2B** contiene el alelo no-ocupado correspondiente al punto de recombinación 3' como se describirá en el apartado 3.4 a.

3.4a- Secuenciación de los alelos no-ocupados correspondientes al punto de recombinación 3', PAL2B y 5', PAL2A.

La secuenciación de los fragmentos de ADN procedentes de los alelos no-ocupados correspondientes al punto de recombinación 3' y 5' era necesaria para poder determinar si había homología entre la secuencia de VPH18 y la secuencia celular sustituida por el ADN viral en ambos puntos de recombinación. Para ello fue necesario subclonar el ADN de los alelos no-ocupados correspondientes a los dos puntos de recombinación. El fragmento que contenía el alelo germinal o no-ocupado de la secuencia flanqueante 3' se obtuvo a partir del fago λ h12/1₅₀₀ (fig. 24 a2) por digestión con la endonucleasa *Not* I (que no corta en el inserto, si no en el sitio de multiclonado del fago λ Fix II), y con la endonucleasa *Eco*R I. Se subclonó, en el plásmido pBluescript SKII-, el fragmento *Not* I-*Eco*R I de 1,3 kb procedente del extremo 5' del clon, al plásmido resultante se le llamó pNR. Su inserto se secuenció desde el extremo *Not* I obteniéndose una secuencia que no tenía homología significativa con el ADN viral ni con ninguna otra secuencia conocida, pero que a partir de una determinada base adquiriría una total identidad a la secuencia del clon p500 en el mismo nucleótido en el que desaparecía la homología entre el clon p500 y la secuencia de VPH18. A esta nueva secuencia se le llamó "secuencia PAL2B" (Fig. 26) (GenBank /EMBL Data Bank X88932).

El fragmento que contenía el alelo no-ocupado correspondiente al punto de recombinación 5' se obtuvo a partir del fago λ h12/82_{HH}, como un fragmento 330 pb y de extremos *Xba* I al que se le llamó XX330. También se subclonó y secuenció el fragmento *Xba* I-*Hind* III inmediatamente anterior de 135 pb, que presentó total identidad con la secuencia HH, y el fragmento *Xba* I-*Eco*R I, de 200 pares de bases, inmediatamente posterior, carente de homología con la secuencia del clon pHH. A toda esta región secuenciada se la llamo "secuencia PAL2A" (Fig. 25) (GenBank/EMBL Data Bank X88931). El clon XX330 presentaba homología del 100% con el clon HH pero a partir de el nucleótido 299 la homología con el clon pHH desaparecía radicalmente (Fig. 27). En el punto de ruptura, es de destacar la existencia de una secuencia de 17 nucleótidos, en el clon pHH, que no tiene homología con el genoma viral ni con la secuencia del clon germinal PAL2A, a diferencia de lo observado en el punto de recombinación 3' (clon p500) en el que la homología con la secuencia de VPH18 aparece en el mismo nucleótido en el que desaparece la homología con la secuencia del clon

3.4b- El alelo no-ocupado correspondiente al *locus* de integración viral, *PAL2*, se encuentra fuera de las regiones amplificadas en las líneas celulares OSA y RMS-13.

Un gran número de publicaciones han descrito en los últimos años ciertas anomalías genéticas en los sarcomas que incluyen amplificaciones de material genético un área que se extiende varias megabases en la región cromosómica 12q13-15. Con el fin de situar con mayor precisión el *locus PAL2* en el cromosoma 12 se realizó un experimento utilizando dos líneas celulares procedentes de sarcomas en las que se habían descrito sendas amplificaciones de material genético en la región cromosómica 12q13-15 estas son la línea celulares procedente de un osteosarcoma, OSA (Roberto et al., 1989) y la línea celular procedente de un rabdomyosarcoma RMS-13 (Roberto et al., 1989). El área que abarca las amplificaciones de OSA es de un tamaño mayor al área que abarca la amplificación de RMS-13, sin embargo esta última tiene mayor número de copias. Si las sondas procedentes de los *loci PAL2A* y *PAL2B* (S3 o HH y 500) se encontraban incluidas en las regiones amplificadas en estas líneas celulares, podría detectarse por medio de una banda impresionada con mayor intensidad en la autorradiografía. Para ello se digirió con *EcoR I* el ADN de las líneas celulares: OSA, RMS-13 usando como ADN control el de las líneas celulares de carcinoma de colon, Colo 320 (Quinn et al., 1979) y de linfoma, Molt 4 (Minowada et al., 1973), en las que no se han descrito alteraciones en el cromosoma 12. El “Southern” procedente de este ADN se hibridó con la sonda 500, detectándose una banda de 4,5 kb en cada una de las líneas celulares, de igual intensidad en todas ellas (Fig. 28 a). Este resultado indicaba que el flanco 3' del sitio de integración no estaba incluido en las regiones amplificadas en OSA o en RMS-13. Al hibridar la membrana con la sonda HH, se detectó una banda de 3.5 kb. de la misma intensidad en todas las líneas celulares (Fig. 28 b), detectándose exactamente lo mismo con la sonda S3, pues están en el mismo fragmento de restricción *Eco R I* indicando estos resultados que el flanco 5' del *locus* de integración viral en la línea celular SW756, no se encuentra en el área amplificada en las líneas celulares OSA y RMS-13. Si bien este experimento no sirvió para detectar si el *locus* de integración se encontraba hacia el telómero o hacia el centrómero de las regiones amplificadas. Posteriormente se supo que no había una sola secuencia amplificada en OSA en la región 12q13-15 si no que existían varias áreas de ADN amplificado separadas por áreas de ADN no amplificado a lo largo de toda la región 12q13-15 (Schoenmakers, comunicación personal).

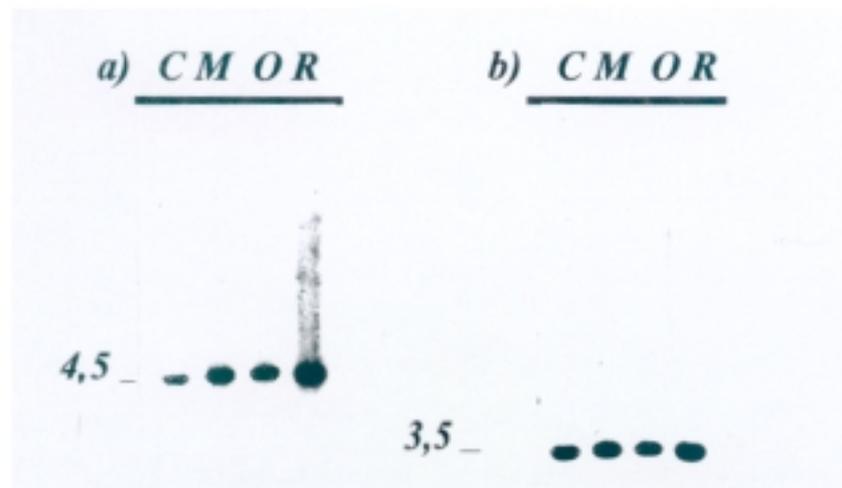


Fig. 28: "Southern" de las líneas celulares: Colo 320 (C), Molt 4 (M), OSA (O) y RMS-13 (R) con las sondas 500 (a) y HH (b) para comprobar si estaban incluidas en la zona de la región cromosómica 12q13-15 amplificadas en OSA y RMS-13.

Se repitieron membranas de "Southern" idénticas a las anteriormente descritas pero se añadiría, en un pocillo más, el ADN de SW756 digerido con *EcoR* I, y se hibridaron con sondas de los genes que han sido localizados en la región 12q13-15 y que están, o podrían estar, relacionados con la progresión tumoral. De esta manera quería determinarse si alguno de estos genes conocidos se encontraba reorganizado (detección de bandas de distinto tamaño) o deleciónado (disminución en la intensidad de la banda) en la línea celular SW756 a causa de las alteraciones que la introducción de las secuencias virales causó en la región cromosómica 12q13-15. Una información adicional podría obtenerse de este experimento pues todos aquellos genes que se detectaran amplificados en las líneas celulares OSA o RMS-13 no deben estar localizados cerca del sitio de integración viral, ya que éste no está incluido en ninguna de las zonas amplificadas en estas líneas celulares. El "Southern" fue hibridado con las sondas de los genes *SAS*, que codifica una proteína de membrana (Jankowski et al., 1994), *CDK4*, que codifica la quinasa 4 dependiente de ciclina (Demetrick et al., 1994) y del oncogen *MDM2* (Oliner et al., 1992). La amplificación del gen *SAS* (secuencia amplificada en sarcomas) y *CDK4* en osteo y rhabdomiosarcomas era ya conocida y serviría de control positivo, así como la amplificación del oncogén *MDM2* en la línea celular OSA (Reifenberger et al., 1994). El "Southern" se hibridó también con los genes de los factores de transcripción *WNT1* (van't Veer et al., 1984) y *SP1* (Gaynor et al., 1993) *ATF1* (Zucman et al., 1994), con el gen del receptor gamma del ácido retinoico, *RARG* (Lehmann, 1991) y con el gen de la quinasa de ciclina tipo 2, *CDK2* (Demetrick et al., 1994). Ninguno de los genes ensayados mostró anomalías en la línea celular SW756. En la tabla 6 se describe el origen de las sondas empleadas y el resultado obtenido en el "Southern". En la figura 29 se muestran los resultados obtenidos en algunos de los "Southern" realizados.

Sonda	Descripción	Nombre del clon	Sitio de clonación	Naturaleza de la sonda	Amplificado en OSA	Amplificado en RMS-13
<i>AQP2</i>	Acuoporina 2	pT7TsAQP2	<i>EcoR</i> I- <i>Hind</i> III	ADNc	No	No
<i>ATF1</i>	Factor de transcripción	pATF-1	<i>EcoR</i> I- <i>Bam</i> HI	ADNc	No	No
<i>CDK2</i>	Kinasa -2 de ciclina	pCDK-2	<i>Kpn</i> I-Sac I	ADNc	No	No
<i>CDK4</i>	Kinasa -4 de ciclina	pCDK-4	<i>Sma</i> I- <i>Bam</i> H I	ADNc	Si	Si
<i>CHOP</i>	Factor de transcripción	pCHOP WT	<i>Hind</i> III- <i>EcoR</i> I	ADNc	Si	Si
<i>CNTN1</i>	Contactina	phCNTN-1	<i>EcoR</i> I	Genómica	No	No
<i>ERBB3</i>	Un receptor del factor de crecimiento epidermal	pcrbB3	<i>Hind</i> III- <i>Kpn</i> I	Genómica	No	No
<i>GLI</i>	proto-oncogen	pGLI.K12	<i>Hind</i> III- <i>Xba</i> I	Genómica	No	No
<i>GT</i>	Glutation transferasa	pGT3.1	<i>EcoR</i> I	DANc	No	No
<i>WNT1</i>	Factor de crecimiento	pAL-1	<i>Hind</i> III	Genómica	No	No
<i>ITGA7</i>	Integrina 7	p α 7HF7-5	<i>EcoR</i> I	ADNc	No	No
<i>KT1</i>	Queratina 1	H1-MC	<i>Hinc</i> II	Genómica	Si	No
<i>MDM-2</i>	proteína asociada a p53	pMDM2-FL-5	<i>Bam</i> HI	ADNc	Si	No
<i>ME491</i>	Antígeno de membrana	p33HB1	<i>Hind</i> III	Genómica	No	No
<i>RARG</i>	Receptor gamma del ácido retinoico	pRAR γ 1	<i>EcoR</i> I	ADNc	No	No
<i>SAS</i>	Secuencia amplificada en sarcomas	pSJP-2	<i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I	Genómica	Si	Si
<i>Sp1</i>	Factor de transcripción	pPac SP1	<i>Xho</i> I	Genómica	No	No

Tabla 6 conteniendo las sondas de los genes situados en 12q13, que han sido empleadas en las hibridaciones con el ADN de las líneas celulares OSA y RMS-13 para comprobar si estaban incluidas en las regiones amplificadas en estas líneas celulares.

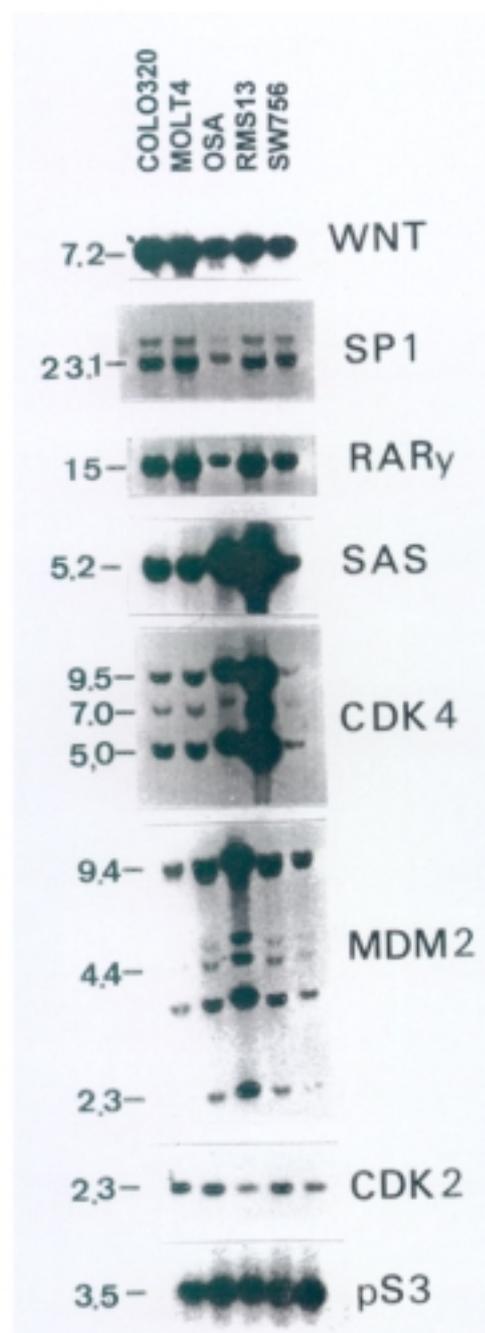


Fig. 29: Composición de figuras de "Southern" de las líneas celulares: Colo 320, Molt 4, OSA, RMS-13 y SW756 hibridados con sondas de los genes situados en 12q13: *WNT1*, *SP1*, *RAR γ* , *SAS*, *CDK4*, *MDM2*, *CDK2*, pS3.

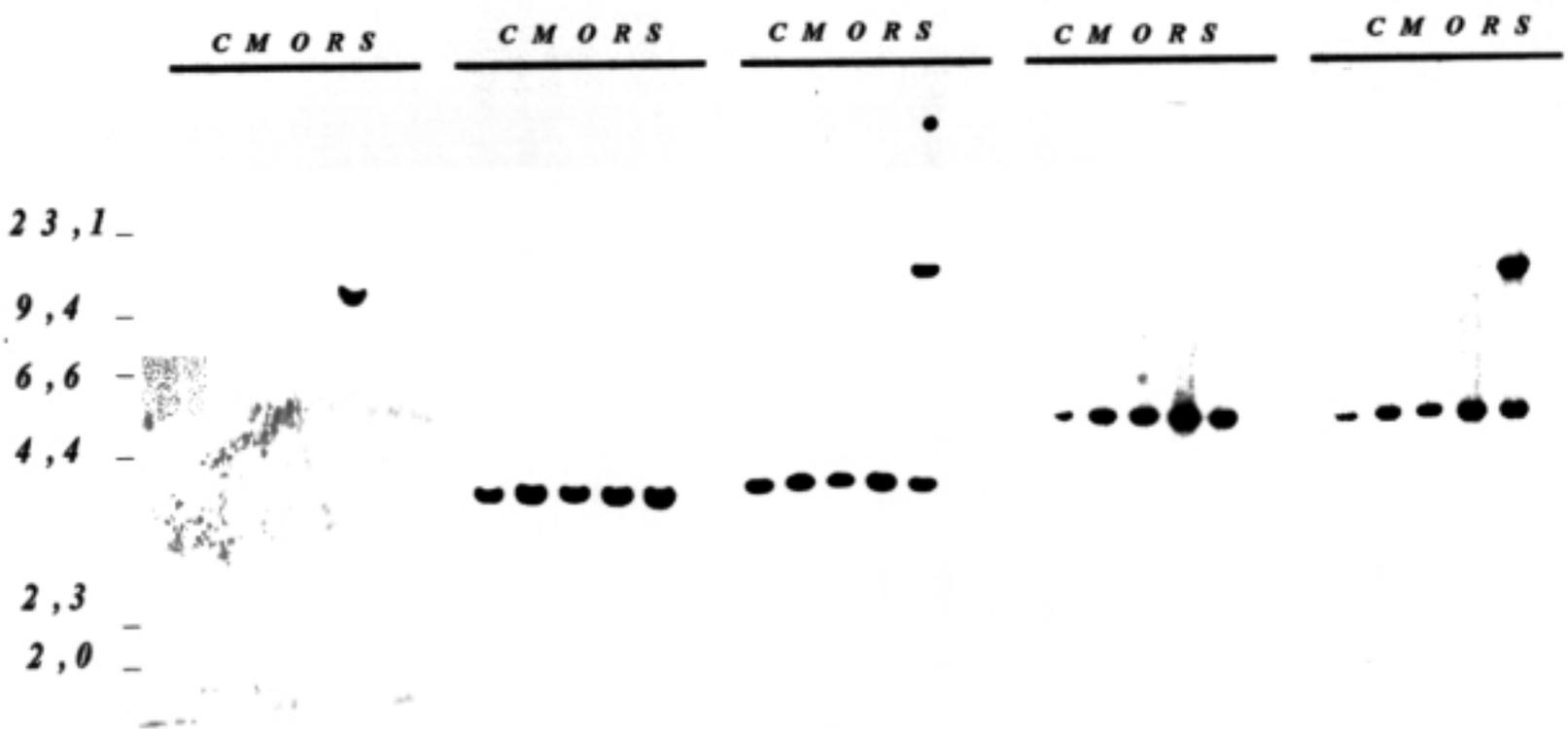
3.5- EL ADN VIRAL DESPLAZA, AL INTEGRARSE, SECUENCIAS CELULARES

Debía demostrarse que un extremo del clon λ h12/32₅₀₀ y un extremo del clon λ h12/82₁₈₁ estaban delecionados y reemplazados por ADN viral en el cromosoma afectado de la línea SW756. Para ello se subclonó del fago λ h12/32₅₀₀, el fragmento *EcoR* I, de 5 kb de tamaño, que

comprendía el alelo no-ocupado correspondiente al punto de recombinación 3'. De este subclón por digestión con *EcoR* I, *Xba* I, se obtuvo un fragmento de 150 pb de la zona de ADN celular desplazada por el ADN viral y se le llamó fragmento XR (Fig. 25 a). Simultáneamente, se subclonó, del clon λ h12/82_{HH}, el fragmento *EcoR* I de 3,5 kb, que comprendía el alelo no-ocupado correspondiente al punto de recombinación 5' del *locus* de integración viral. De este subclón se obtuvo por digestión con *Hind* III, *EcoR* I, un fragmento de 100 pb de la zona de ADN celular sustituida por el ADN viral, a este fragmento le llamamos RH (Fig. 25 b).

Se realizaron cinco "Southern" idénticos con el ADN de las líneas celulares: Colo 320, Molt 4, OSA, RMS-13 y SW756, digerido con *EcoR* I y se hibridaron con las sondas: VPH18, HH, RH, 500, XR respectivamente (Fig. 30). La sonda de VPH18 hibridó solo con el fragmento *EcoR* I de 12.5 kb que contiene la secuencia de VPH18 en la línea celular SW756 y no hibridó con el ADN de las otras líneas celulares porque estas no tienen secuencias virales integradas. La sonda HH (punto de recombinación 3') hibridó con el ADN de todas las líneas celulares produciendo una banda de 3.5 kb, e hibridó también con el fragmento de 12,5 kb del cromosoma 12 ocupado de SW756. La sonda RH hibridó con el ADN de todas las líneas celulares detectándose una banda de 3.5 kb, pero no pudo detectarse, con esta sonda, la banda de 12,5 kb del cromosoma 12 ocupado de SW756. La sonda 500 hibridó con un fragmento de 4,5 kb en todas las líneas celulares, en SW756 además hibridó al fragmento de 12.5 kb del alelo ocupado. Con la sonda XR se detectó la banda de 4,5 kb en todas las líneas celulares, pero no aparecía la banda de 12.5 kb del alelo ocupado de SW756. Con la sonda S3 obteníamos exactamente los mismos resultados que con la sonda HH, pues están en el mismo fragmento de restricción *EcoR* I, tanto en el cromosoma 12 normal como en el cromosoma 12 alterado (no se muestra). Como quiera que la sonda RH está en el mismo fragmento de restricción *EcoR* I que la sonda 500 (que detecta el reordenamiento en el alelo alterado) debería detectar también el reordenamiento en este "Southern". La no detección del alelo reordenado es indicativo de que la secuencia que comprende la sonda RH está delecionada en el alelo ocupado de la línea celular SW756. El mismo razonamiento debe de hacerse con respecto a las sondas XR y HH, pues están en el mismo fragmento de restricción *EcoR* I y mientras la sonda HH detecta los alelos normal y reordenado (no-ocupado y ocupado) la sonda XR solo detecta el alelo normal.

Fig. 30. Hibridación del ADN de las líneas celulares: Colo 320, Molt 4, OSA, RMS-13 y SW756, digerido con *Eco*R I, con las sondas: 500 (1^o), RH (2^o), HH (3^o), XR (4^o), VPH18(5^o)



3.6- LOCALIZACIÓN PRECISA DEL *LOCUS PAL2* EN EL MAPA FÍSICO DEL CROMOSOMA 12.

En la actualidad se conoce el orden en el que los grandes fragmentos clonados en forma de cromosomas artificiales de levadura (YACs) se suceden y se solapan (recorriendo prácticamente todo el cromosoma 12) constituyendo el mapa físico completo del cromosoma 12 (Krauter et al., 1995).

Con objeto de situar con precisión el *locus* de integración PAL2 en el mapa físico del cromosoma 12 y poder de esta manera caracterizar con mayor facilidad la región cromosómica en la que se integró el ADN viral en la línea SW756, era preciso realizar la búsqueda en una genoteca del cromosoma 12 en cromosomas artificiales de levadura llamados YAC (del inglés, yeast artificial chromosome), y así obtener el clon o los clones que contuvieran el *locus PAL2*. El *screening* de esta genoteca se realizó en el Centro de Genética Humana de la Universidad de Lovaina, (Bélgica), pues allí se disponía de genotecas genómicas en cromosomas artificiales de levadura y genotecas de cósmidos específicas para el cromosoma 12 humano³. Para el análisis de la genoteca se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, denominada comúnmente por sus siglas en inglés, PCR. Al no conocerse el tamaño de la deleción no podía saberse si el *locus PAL2A* y el *locus PAL2B* estarían, o no, contenidas en el mismo cósmido ni siquiera en el mismo YAC. Por lo que el análisis de la genoteca se realizó simultáneamente con dos pares de cebadores: un par que amplificaban un fragmento de 250 pb de ADN celular en el punto de recombinación 3', comprendido por los ADN-cebadores: [5'-TCT TGT GGG GTA AAG GAG CAT C-3'] como ADN-cebador directo y [3'-TGA CAA TAA TGC CAT GGA GCA G-5'] como ADN-cebador inverso, a este fragmento se le llamó "amplicón-3" y con un par de cebadores que amplificaban un fragmento de 151 pb de ADN celular del punto de recombinación 5', comprendido por los siguientes oligonucleótidos: [5'-TCT GAA TTT GTC CGT TTC CTC A-3'] como ADN-cebador directo y [3'-GGT CTC AAG AGG TAA CCC TTC T-5'] como ADN-cebador inverso. A este fragmento se le llamó "amplicón-5".

³ Las genotecas de YACs se caracterizan por albergar fragmentos de ADN de tamaños comprendidos entre 200 y 1000 kb. los cósmidos a diferencia de los YACs son vectores bacterianos que albergan fragmentos de ADN de unos 40 kb

Antes de comenzar el análisis de la genoteca se realizaron reacciones de PCR con cada par de cebadores para optimizar la temperatura de anillamiento para unos parámetros de concentración salina previamente fijados. Gracias a la naturaleza de las muestras de ADN control que se usaron en esta primera PCR pudo simplificarse tremendamente el trabajo de búsqueda en la genoteca. Las muestras de ADN que se usaron fueron (1) ADN humano total, (2) ADN de una línea celular híbrida que poseía todos los cromosomas de ratón excepto el cromosoma doce que era humano (Warburton et al., 1990) y (3) ADN de una línea celular híbrida que poseía el cromosoma humano 16 con una translocación en la cual se había sustituido la parte p terminal del cromosoma 16 por la parte q terminal del cromosoma 12: der.(16)t(12;16)(q13;p11.2) (Schoenmakers et al., 1993), de tal manera que del cromosoma 12 humano solo existía el fragmento que comprende desde el gen *GADD153* (CHOP) en (12q13-14) hasta el telómero. La obtención de secuencias amplificadas 3' y 5' en el ADN humano total a ambas temperaturas de anillamiento, 58°C y 60°C; sirvió para saber que la reacción había tenido lugar a ambas temperaturas, la obtención de secuencias amplificadas 3' y 5' en la primera de las líneas celulares mencionadas, sirvió para la confirmación de que el *locus* de integración del ADN viral se encontraba en el cromosoma 12 y la obtención de secuencias amplificadas 3' y 5' en el ADN de la segunda línea celular, sirvió para saber que *PAL2* se encontraba más hacia el telómero que *GADD153* (Fig. 31).

Como quiera que existía un mapa físico de gran resolución de la región ULCR12, de 450 kb, situada en 12q13-15 inmediatamente telomérica del gen *GADD153*, basado en 60 clones de cósmidos solapantes y contiguos (Schoenmakers et al., 1995b). Se decidió realizar el *screening* de este grupo de 60 cósmidos obtenidos de la genoteca LL12NCO1 (Montgomery et al., 1993) con ambos pares de cebadores. Simultáneamente, se había comenzado el análisis de una genoteca de Mega-YACs, llamada CEPH-II, específica del cromosoma 12, que albergaba fragmentos de unas 900 kb, de una genoteca de YACs específica de cromosoma 12, CEPH-A (Albertsen et al., 1990), que alberga fragmentos de unas 200 kb y la genoteca de cósmidos específica de cromosoma 12, LL12NCO1.

De las 60 cósmidos solapantes, ordenados, que constituyen el mapa de la región ULCR12, cinco, localizados en el extremo de ULCR12 más cercano al centrómero, resultaron ser positivos tanto para el par de cebadores 5' como para el par de cebadores

3'. Este hallazgo suponía la localización precisa del *locus* de integración viral en el mapa del cromosoma 12, puesto que eran ya conocidos los YACs que incluían la región ULCR12 y estos YACs estaban perfectamente localizados y ordenados en el mapa físico del cromosoma 12, (Schoenmakers et al., 1995 a y b). Por lo que no fue necesario continuar con el *screening* de las otras genotecas. Los cósmidos detectados como positivos por la técnica de PCR fueron confirmados como tales por hibridación del filtro correspondiente, de la genoteca de cósmidos LL12NCO1 (fig. 32).

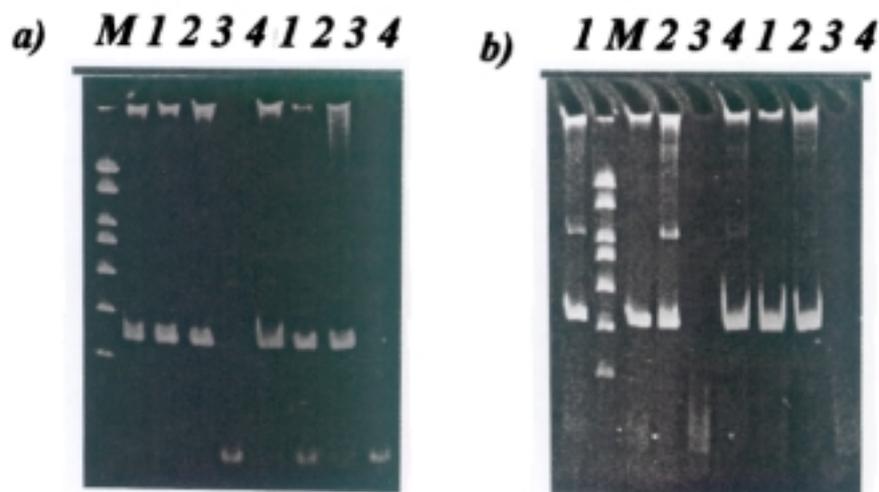


Fig. 31: Electroforesis en gel de acrilamida del resultado de la PCR realizada a 58°C y a 60°C sobre ADN total (1), ADN línea híbrida con el cromosoma 12 humano(2), ADN línea híbrida der (16)t(12;16)(q13;p11.2)(3), con el par de cebadores de la región 5' (a) y con el par de cebadores de la región 3' (b); M: pKun19/TaqI

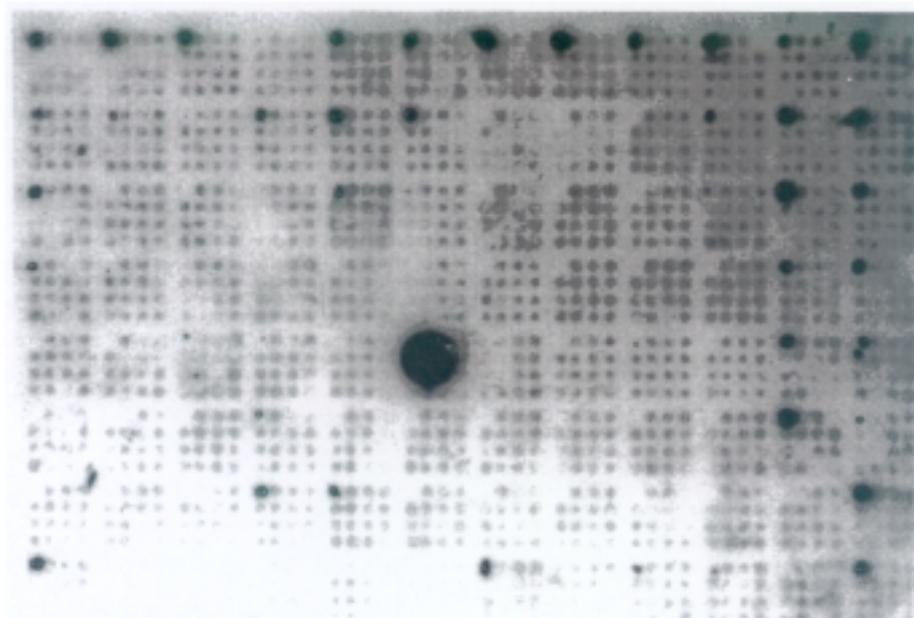


Fig. 32: Hibridación de un filtro de la genoteca LL12NCO1 con las sonda del "amplión-3'" obtenida como se muestra en la figura 34(a). Dada la producción automática de estas genotecas, la obtención de una colonia positiva en una posición permite la identificación precisa del clon al que corresponde dicha colonia. La primera colonia de cada grupo corresponde al clon control positivo.

A 150 kb en dirección al telómero, de los cósmidos positivos en el *screening* se encuentra el primer exón del gen *HMGI-C*, que codifica una proteína estructural del complejo de transcripción de muchos genes, que ha sido relacionada recientemente con la patología de tumores benignos de tipo mesenquimal (Ashar et al., 1995; Schoenmakers et al, 1995b).

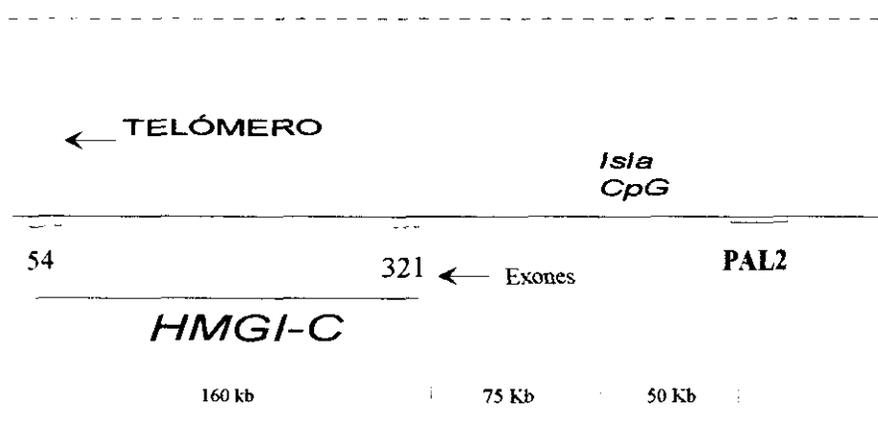


Fig. 33: Mapa a escala del fragmento de ADN genómico que contiene el gen *HMGI-C* y el locus de integración de VPH18 . PAL 2

3.6a- Caracterización del cósmido 107E

Los cósmidos 107E2, 103E12 y 206C9 son tres de los cósmidos positivos en el *screening* tanto por PCR, con ambos pares de ADN-cebadores, como por hibridación, con las sondas del “amplicón-3” y del “amplicón-5”. Los cósmidos 107E2 y 103E12 resultaron ser idénticos (fig. 34 c, d, e) (solo se muestra uno de ellos) y el clon 206C9 distinto (Fig. 34 b).

El mapa de restricción del cósmido 107E2 se realizó por hibridación con los cebadores T3 y T7 de los productos de las digestiones parciales del inserto con las endonucleasas: *Eco R I*, *Pst I*, *Hind III*, *BamH I*, y posterior interpretación de los resultados mediante el empleo de la gráfica que relaciona la distancia recorrida en cm con el log del tamaño del fragmento en pares de bases. (Fig. 35). El error en los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos con este método es mayor cuando se analizan cósmidos que cuando se analizan clones de fago lambda ya que los cósmidos tienen el doble de tamaño y la resolución de los fragmentos de ADN en gel de agarosa es deficiente. Sin embargo a pesar de la imprecisión en el mapa del cósmido 107E2 se encontraron grandes zonas de alta homología, cuando éste se comparó con los mapas de los clones de lambda $\lambda h12/82_{HH}$, $\lambda h12/1_{500}$ y $\lambda h12/32_{500}$.

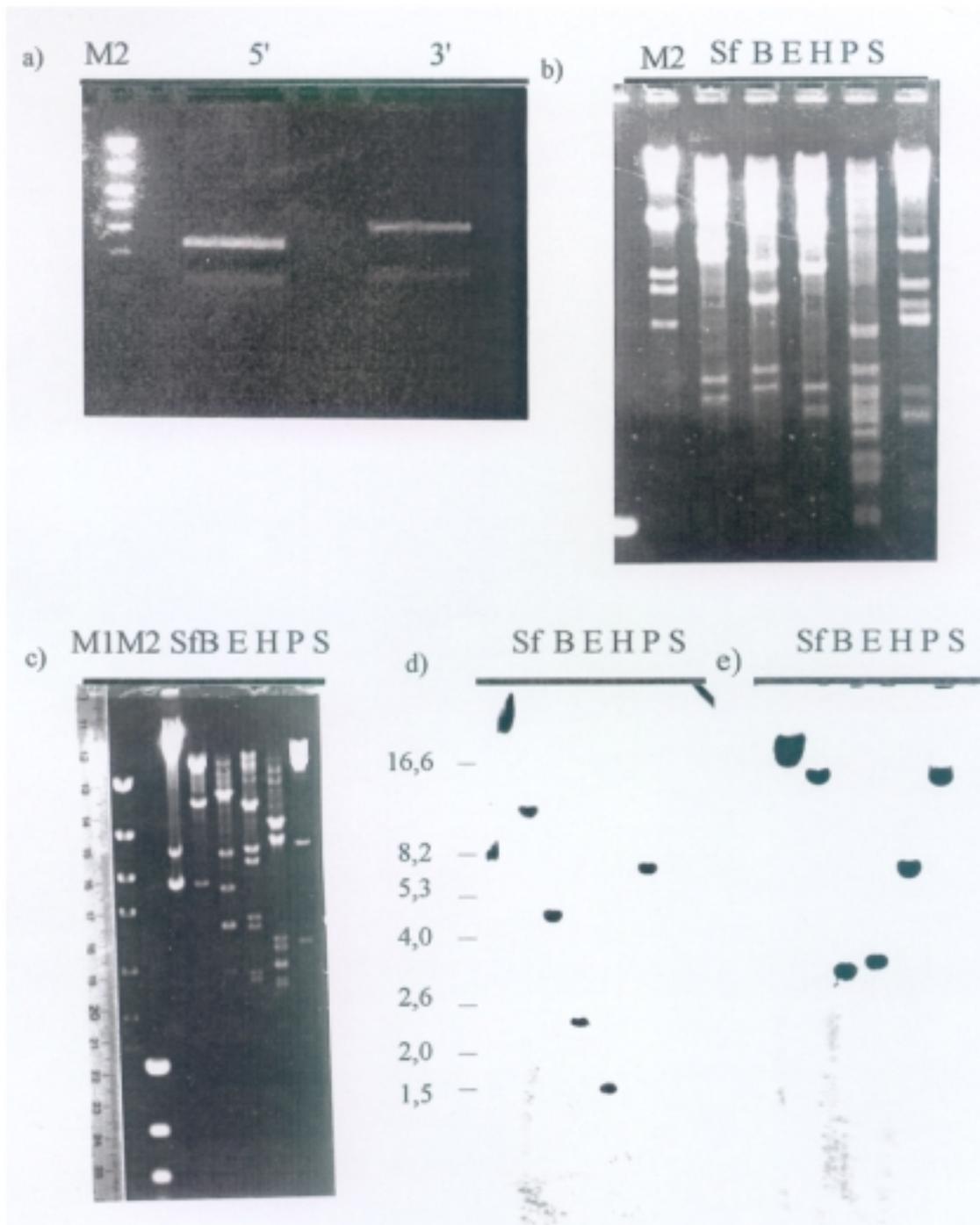


Fig. 34: a) Electroforesis de los fragmentos amplificados 3' y 5', producto de las PCR positivas, fraccionadas en agarosa para su purificación y utilización como sonda en las hibridaciones.
 b) Electroforesis del ADN del clon 206C9 digerido con *Sfi* I (Sf), *Bam*H I (B), *Eco*R I (E), *Hind* III (H), *Pst* I (P); *Sac* I (S), M2: pKun19/*Taq* I
 c) Electroforesis del ADN del clon 107E2 digerido con: *Sfi* I (Sf), *Bam*H I (B), *Eco*R I (E), *Hind* III (H), *Pst* I (P); M1: p161.1.E (Schoenmakers et al., 1995b); M2: pKun19/*Taq* I.
 d) Hibridación con las sondas del amplicon 3' y 5'

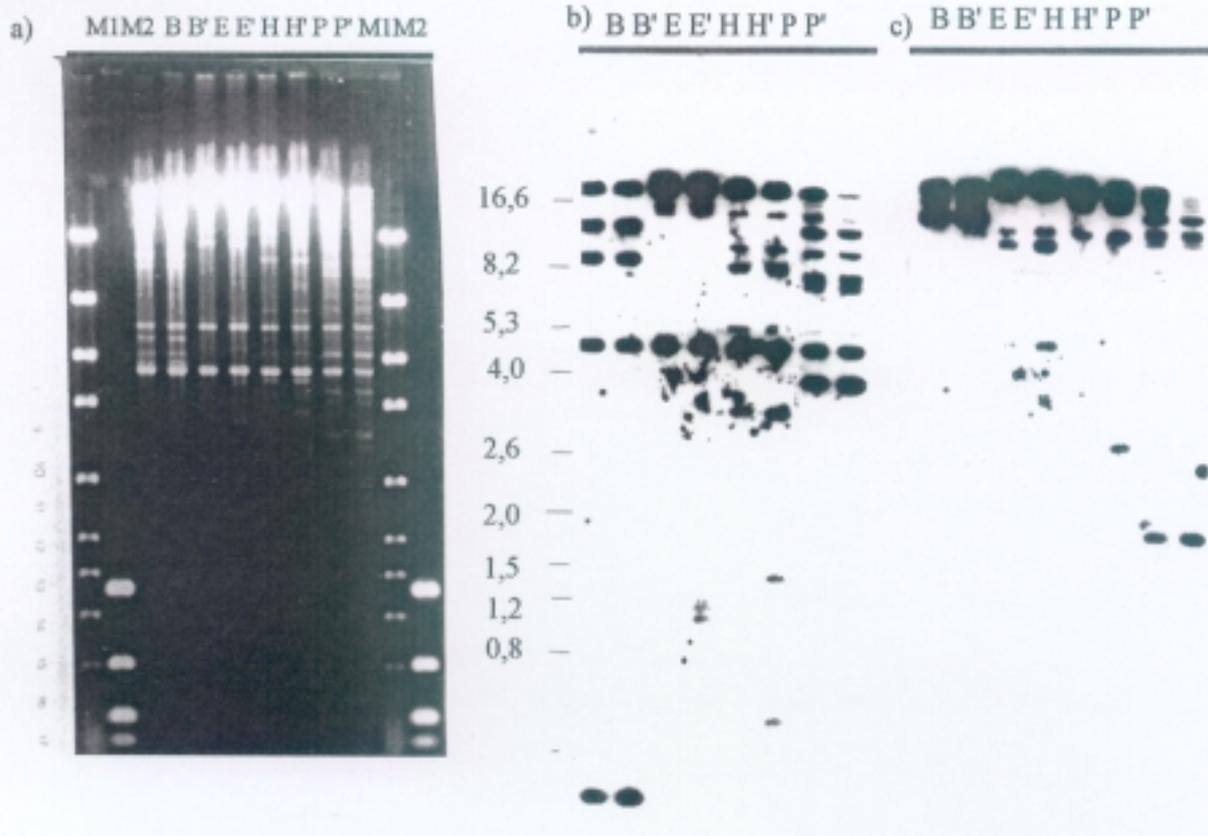
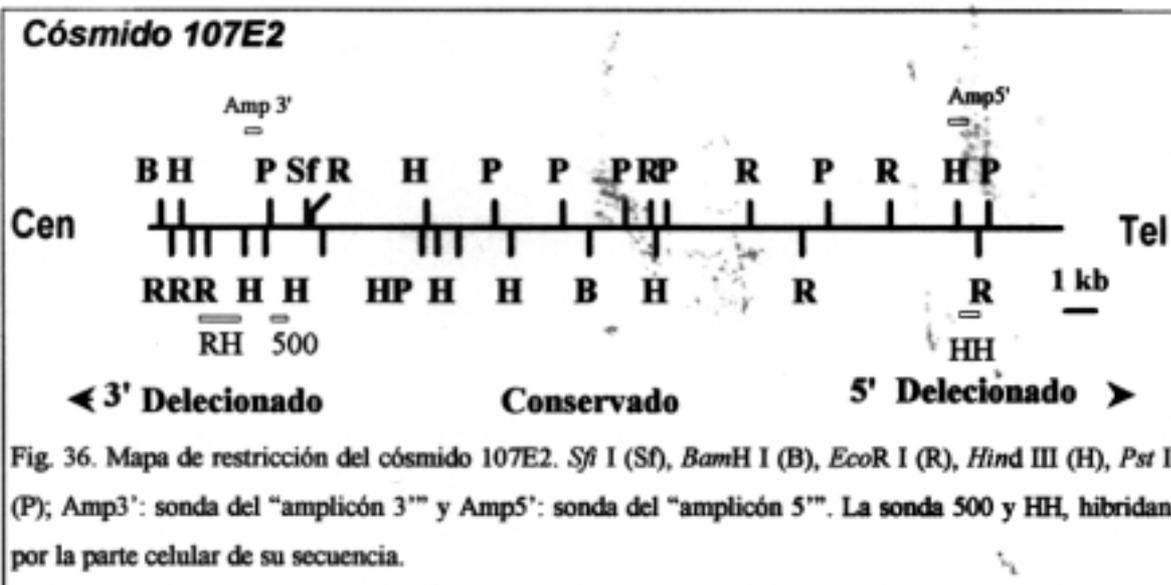


Fig. 35: a) Electroforesis del producto de las digestiones parciales del cósmido 107E12/*Sfi* I, con las endonucleasas: *Bam*H I, 2 minutos (B), *Bam*H I, 5 minutos (B'), *Eco*R I, 2 minutos (E), *Eco*R I, 5 minutos (E') *Hind* III, 2 minutos (H), *Hind* III, 5 minutos (H), *Pst* I, 2 minutos (P), *Pst* I, 5 minutos (P'); b) Hibridación con T3; c) Hibridación con T7.



Los clones λ h12/1₅₀₀ y λ h12/32₅₀₀ eran completamente superponibles al extremo del inserto cercano a la secuencia del oligonucleótido T3 del vector mientras que el clon λ h12/82_{HH}, y λ F4 era superponible al extremo del inserto cercano a la secuencia T7 (Fig. 37). Pero sorprendentemente, la orientación relativa en la que se encontraban los clones era opuesta a la que se había postulado basada en la estructura y las secuencias del clon híbrido viral-celular λ 12QHP. Estos resultados solo pueden explicarse suponiendo que la reorganización que ocurrió durante la integración del ADN viral fue más compleja que una simple deleción, y en ella entraron en juego inversiones de secuencias. En este reordenamiento complejo, podía tener su origen la aparición de la secuencia de 17 nucleótidos en el extremo 5' del ADN viral que no tiene homología con la secuencia del alelo germinal, PAL2A, ni con la secuencia del ADN de VPH18.

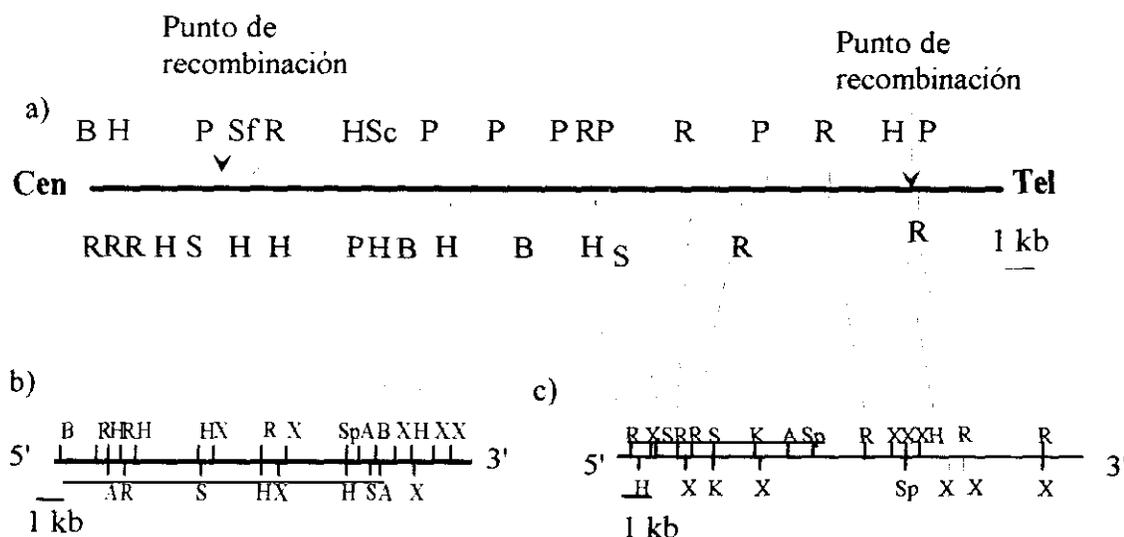


Fig. 37: Mapas de restricción del cósmido 107E12 (a) y de los clones de lambda λ h12/32₅₀₀ (b) y λ h12/82_{HH} (c): *Sfi* I (Sf), *Bam*H I (B), *Eco*R I (E), *Hind* III (H), *Pst* I (P), *Xba* I (X), *Spe* I (Sp), *Sac* I (S)

3.6b- Localización del oligonucleótido de 17 pb en el cósmido 184A9

Con objeto de localizar la procedencia de la secuencia de 17 nucleótidos del clon pHH, que no presentaba homología con las secuencias virales ni con las secuencias del clon germinal o no-ocupado correspondiente, PAL2A (secuencia en negrilla de la Fig. 27). Se diseñó un experimento basado en la hibridación con un oligonucleótido sintético de 17 pb y secuencia idéntica a la problema, marcado en el extremo 5' con γ -³²P-ATP.

Conocidos los cósmidos contiguos al cósmido 107E2 (Schoenmakers et al., 1995b y Schoenmakers, comunicación personal), se purificó ADN de estos cósmidos y se digirió con *EcoR* I. Los fragmentos obtenidos se fraccionaron por electroforesis en agarosa (fig. 38 a), se transfirieron a membrana de nylon y se hibridaron al oligonucleótido marcado. En uno de los fragmentos *EcoR* I del cósmido 184A9 pudo observarse hibridación específica (Fig. 38 b), indicando que la secuencia de 17 nucleótidos posiblemente tenga su origen en este cósmido situado hacia el telómero respecto del cósmido 107E2. Esto supone que durante el proceso de la integración del ADN viral tuvo lugar una reorganización de secuencias, de tal manera que estos 17 pares de bases quedaron intercalados entre la secuencia viral y la secuencia celular flanqueante (Fig. 38 a y b)

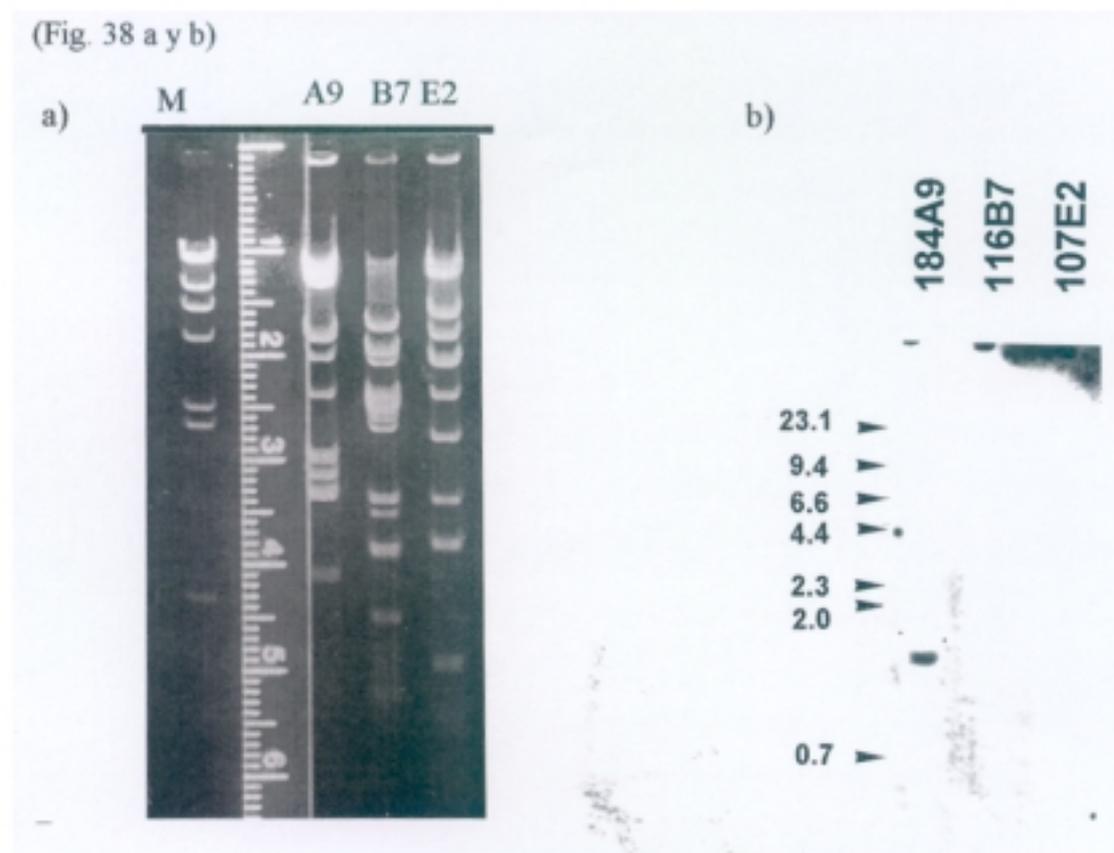


Fig. 38 a) Electroforesis del ADN los cósmidos 184A9 (A9), 116B7 (B7) y 107E2 (E2) digerido con *EcoR* I; b) "Southern" procedente del gel de la figura 38 a, hibridado con el oligonucleótido de 17 pb

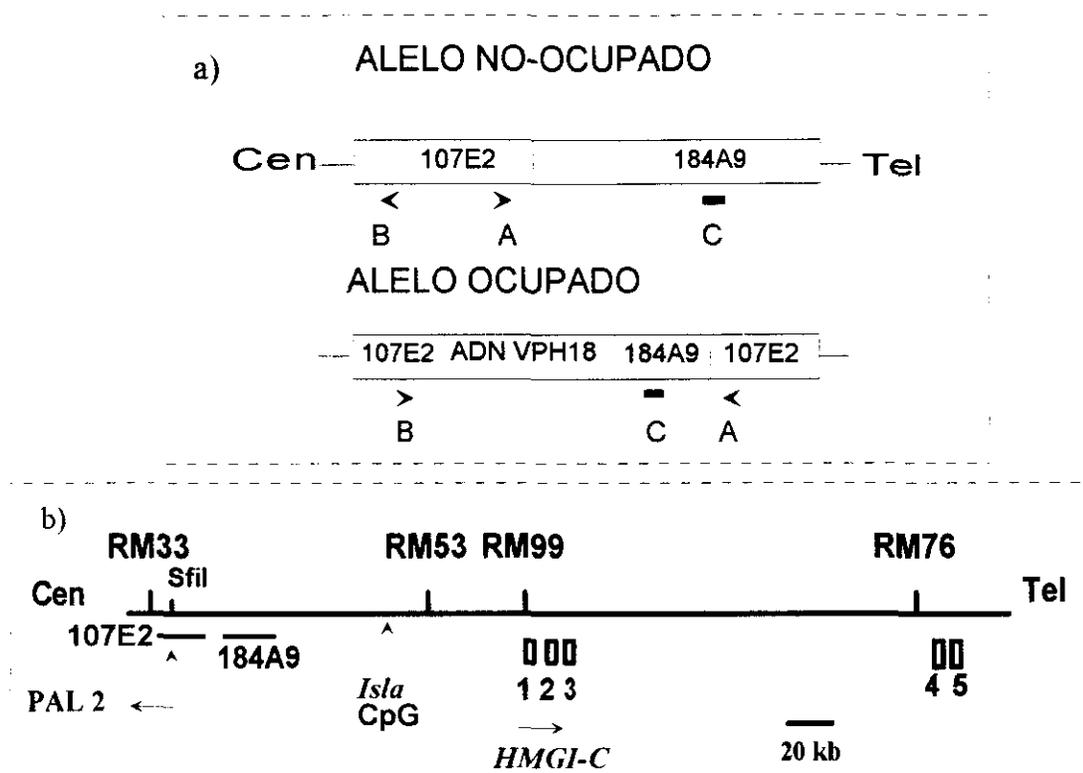


Fig. 39 a) Localización de la secuencia desconocida de 17 nucleótidos, antes y después de la integración viral.

b) Esquema a escala de la región ULCR12, indicando la posición de los exones del gen *HMGI-C*, de las STS 12-RM33, STS 12-RM53, STS 12-RM99 y STS 12-RM76 y de los cósmidos 107E2 y 184A9.

3.7- ¿ESTA AFECTADO EL GEN *HMGI-C* EN LA LÍNEA CELULAR SW756?.

Dada la proximidad del primer exon del gen *HMGI-C* al sitio de integración del ADN viral y sabiendo que en el *locus* de integración viral había tenido lugar una compleja reorganización que incluía deleciones de material genético, se analizó la posible implicación de este gen, asociado a la patología de tumores benignos de tipo mesenquimal, en el tumor maligno de tipo ectodérmico del que proviene la línea celular SW756. El análisis se abordó desde dos perspectivas: (1) Detección de variaciones en la expresión del gen *HMGI-C* en la línea celular SW756, por medio de la técnica de "Northern" con el inconveniente de que la expresión de *HMGI-C* es tan baja en todos los tejidos y líneas celulares que es indetectable por medio de esta técnica por lo que solo podrían apreciarse incrementos en la expresión y no disminuciones y tampoco se disponía de anticuerpos para la detección de la proteína por técnicas bioquímicas. (2) El análisis de alteraciones en la estructura del ARN mensajero, basado en la técnica de la amplificación por PCR del extremo 3' del ADNc del gen *HMGI-C* (3'-RACE) ya que

esta técnica se ha aplicado con éxito para detectar mensajeros quiméricos del gen *HMGI-C* con secuencias ectópicas, en lipomas y hamartomas, con translocaciones que afectan a la región cromosómica 12q13-15.

3.7a- Expresión del gen *HMGI-C* en la línea celular SW756

Se preparó ARN de las líneas celulares derivadas de carcinomas de cervix: SW756, HeLa, C4I, SiHa. Todas estas líneas celulares poseen secuencias de ADN de VPH18 integradas en su genoma excepto SiHa que posee secuencias de VPH16. SW756 es la única línea celular que posee las secuencias virales integradas en 12q13-15, por lo que es la única que ha sufrido una reorganización genómica en la región 12q13-15, como control positivo se usó el ARN de una línea celular proveniente de un hepatoma llamada Hep-3B, que sobreexpresa el gen *HMGI-C* de tal manera que su ARNm es fácilmente detectable en "Northern". 10 µg de ARN de cada una de estas líneas celulares fueron fraccionados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% conteniendo formaldehído, transferidos a membrana de nylon y fijados por calor. La membrana se hibridó con una sonda del gen *HMGI-C* (Schoenmakers et al., 1995). Tras exponer 6 días la autorradiografía solo pudo detectarse la banda del ARNm del gen *HMGI-C* de la línea Hep-3B. Indicando que la cercanía del ADN viral al gen *HMGI-C* en la línea celular SW756 no producía un aumento detectable de su expresión (Fig. 40 a y b).

3.7b- Amplificación por PCR del ADNc del gen *HMGI-C*

Este experimento se realizó con el ARN de la línea celular SW756, el ARN de la línea celular SiHa como control, ya que esta línea celular no tiene alteraciones en 12q13-15. Para la obtención del ADN complementario se usó la enzima transcriptasa en reverso RT- SuperScript® y un cebador comercial, inespecífico, de la casa GIBCO BRL llamado "AP2" (adapter primer) que se une a todas las cadenas de poli A del extremo 3' de los ARN mensajeros. Una vez obtenido el ADNc de SW756 y SiHa, se realizaron 3 reacciones de PCR sobre el ADNc de SW756 y 3 sobre el ADNc de SiHa, empleando tres cebadores directos, obtenidos de la secuencia de los tres primeros exones del gen *HMGI-C*, amplificándose específicamente los fragmentos que se extendían desde cada

uno de los cebadores del gen *HMGI-C*, hasta un cebador inverso universal, comercial, llamado "UAP2"(universal amplification primer 2), de la casa GIBCO BRL. En esta reacciones las secuencia de los ADN-cebadores directos específicos del gen *HMGI-C* fueron: [5'-CTT CAG CCC AGG GAC AAC-3'] (reacción A₁). [5'-CAA GAG GCA GAC CTG GGA-3'] (reacción A₂). [5'-AAC AAT GCA ACT TTT AAT TAC TG-3'] (reacción A₃).

Usando como ADN-molde una dilución 1/10 del producto de cada una de las reacciones de la fase A, se realizó una segunda fase, fase B, de PCRs. En todas ellas se empleó de nuevo el cebador inverso, universal, UAP2 y tres cebadores directos específicos del gen *HMGI-C* distintos de los de la fase A, diseñados de tal manera que su secuencia estuviera incluida en los fragmentos amplificados en la primera fase de PCRs. Estos ADN-cebadores fueron B₁: [5'-CUA CUA CUA CUA CGC CTC AGA AGA GAG GAC-3'], ADN-cebador B₂: [5'-CUA CUA CUA CUA GTT CAG AAG AAG CCT GCT-3'], y ADN-cebador B₃: [5'-CUA CUA CUA CUA TTG ATC TGA TAA GCA AGA GTG GG-3'].

Tras la reacción, se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa y se compararon las bandas que se obtuvieron a partir del ARN de la línea celular SiHa con las bandas obtenidas a partir del ARN de la línea celular SW756, solo las bandas que fueran diferentes podrían corresponder con transcritos aberrantes (Fig. 41).

Se extrajo el ADN de la agarosa de las bandas que aparecían en los productos de la PCR de SW756 y no aparecían entre los productos de la PCR de SiHa y se ligaron al plásmido pAMP1®, Gibco BRL. Se transformaron bacterias DH5α competentes y se preparó ADN de las colonias recombinantes. 12 clones fueron secuenciados por el personal técnico del laboratorio del Prof. Van de Ven, en el Centro de Genética Humana de la Universidad de Lovaina (Bélgica), usando el método de terminación por dideoxinucleótidos y los reactivos comerciales de la casa Pharmacia/LKB, analizando las reacciones en un secuenciador autoático ALF DNA sequencer® (Pharmacia Biotech), no encontrándose que ningún ADNc que proviniese de un ARN de fusión aberrante.

La diferencia entre las bandas obtenidas con el ADNc control y el proveniente de la línea celular SW756 eran debidas a artefactos producidos por procesamiento aberrante del ARN, en los que la secuencia del gen *HMGI-C* se rompía en un punto pero volvía a reiniciarse en otro punto del tercer o cuarto exon del mismo gen. Este tipo de procesamiento aberrante del ARN ya se había descrito para casos de lipomas en la

publicación de Schoenmakers et al., (1995). Con estos experimentos no pudo detectarse ninguna alteración del gen *HMGI-C* en la línea celular SW756.

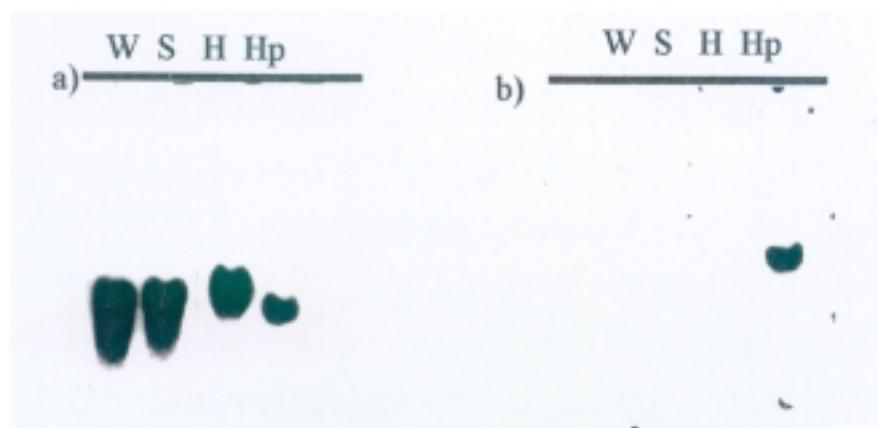


Fig. 40: "Northern" de las líneas celulares SW756 (W), SiHa (S), HeLa (H) y Hep 3B (Hp), hibridado con la sonda del gen de la actina (a) y con la sonda *HMGI-C* (b)

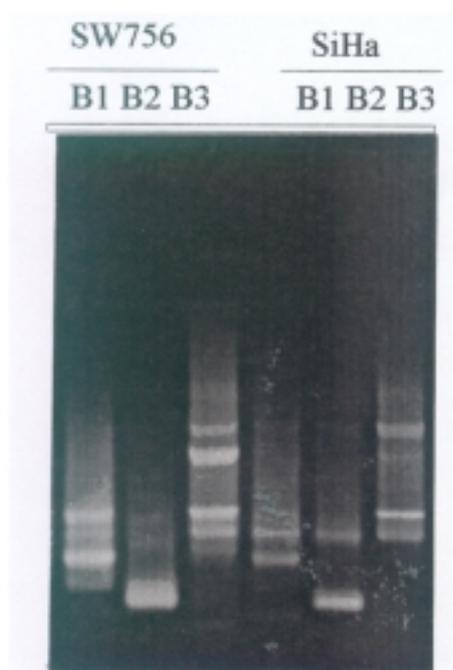


Fig. 41: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la segunda fase de PCRs, sobre el ADNc del gen *HMGI-C* procedente de las líneas celulares SW756 y SiHa.

4.-DISCUSIÓN

La carcinogénesis es un proceso escalonado en el que pueden distinguirse varias etapas, cada una de las cuales constituye la manifestación fenotípica de alteraciones en determinados genes celulares, como pudo demostrarse en el estudio del cáncer de colon (Fearon y Vogelstein, 1991), de mama (Bièche y Lidereau, 1995) y glioma (Louis y Gusella, 1994). La caracterización y clonación de alteraciones cromosómicas recurrentes se utiliza en la actualidad para la identificación de genes relacionados con algún aspecto del fenotipo tumoral, en todos los tipos tumorales (Mitelman, 1994). Estas alteraciones pueden detectarse en forma de translocaciones, deleciones, amplificaciones, o mutaciones puntuales.

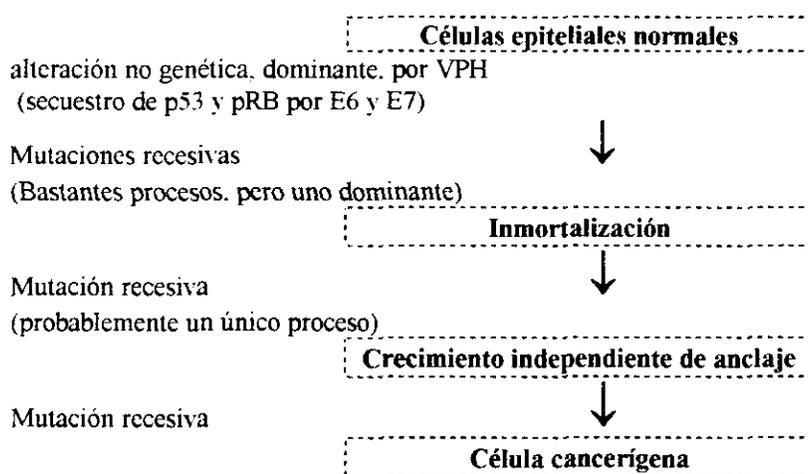
Existe un grupo de tumores sólidos humanos cuya aparición en el individuo está asociada a procesos infecciosos previos, con ciertos tipos de virus. Estos son: los carcinomas genitales, que están asociados a la infección por algunos tipos del virus del papiloma humano (Dürst et al, 1983; Boshart et al, 1984; Schwarz et al 1985) y los carcinomas hepáticos que están asociados a la infección por el virus de la hepatitis B (Matsubara y Tokino, 1990). En las células de estos dos tipos de tumores, como en las del resto de tumores sólidos, pueden distinguirse varias etapas que serán entre otras: inmortalización celular, crecimiento independiente de anclaje, y la adquisición de la capacidad de proliferar en tejido extraño. Cada una de estas etapas constituyen la manifestación fenotípica de alteraciones genéticas concretas que es preciso desentrañar para llegar a la comprensión de la naturaleza del cáncer (Chen et al. 1993).

La integración de secuencias de los virus tumorales humanos en el genoma celular no forma parte del ciclo de vida estos virus es, sin embargo, un fenómeno comúnmente observado en las células de carcinomas genitales y hepáticos (Popescu et al 1990; Lazo et al, 1992; Matsubara y Tokino, 1990). En carcinomas cervicales, se detectan secuencias de VPH en el 99% de los casos analizados (zur Hausen y de Villiers. 1994; Matsukura y Sugase, 1995). La integración viral constituye una característica clonal de las células de un tumor. En los carcinomas genitales, la contribución del fenómeno de la integración viral a la progresión tumoral puede observarse desde dos aspectos:

1º) A través de la integración se obtiene la expresión constitutiva de los oncogenes virales E6 y E7 en todas las células del tumor (Schneider-Gädicke y Schwarz, 1986; zur Hausen 1991), incluso se ha detectado mayor vida media de los ARNm virales E6 y E7 cuando el ADN viral está integrado que cuando se encuentra en su forma nativa (episomal) (Jeon y Lambert., 1995). De esta manera, la integración supone una mutación dominante en la célula, ya que la expresión de estos

dos genes es imprescindible para el desarrollo del carcinoma genital (salvo excepciones en las que se han detectado mutaciones en el gen *TP53*, Park et al., 1994; Cannistra et al., 1996), de hecho una característica diferencial entre los carcinomas genitales, VPH positivos y el resto de los tumores epiteliales es que son independientes de mutaciones en genes supresores de tumores como *TP53* (Furihata et al., 1995), *CDKN2* (Kelley et al., 1995) y en protooncogenes como *RAS* (Moyet-Lalle et al., 1995; Tenti et al., 1995). No es necesaria la mutación de estos genes ya que las proteínas oncogénicas E6 y E7 de los virus del papiloma de alto riesgo producen efectos fenotípicos semejantes a estas. Con frecuencia se observa que los genes virales integrados están además amplificados indicando este hecho la fuerte presión selectiva en la expresión de los genes E6 y E7 (Jeon et al., 1995).

2º) La expresión de los oncogenes virales aunque imprescindible, no es suficiente siquiera para que una célula adquiriera la propiedad de la inmortalización, como se deduce de los experimentos de carcinogénesis *in vitro* llevados a cabo por R. Schlegel et al. (1988), en los que observó que la inmortalización celular era un fenómeno poco frecuente comparado con la eficiencia de la transfección de las secuencias virales. Basándose en estos datos y tras la realización de experimentos de transfección y fusión celular, Chen y colaboradores (1993), afirman que en la inmortalización celular por VPH16 y VPH18 es necesaria, además de la expresión de los oncogenes E6 y E7, la activación o inactivación de otros procesos celulares a través de alteraciones en genes de fenotipo recesivo. Sugiriendo el siguiente modelo de carcinogénesis cervical *in vitro*, que explica en parte, el importantísimo efecto sinérgico de los carcinógenos químicos y físicos en los tumores cervicales, debido a su poder mutagénico .



Recientemente ha podido establecerse una relación entre deleciones de ADN en el sitio frágil cromosómico *FRA3B*, provocadas por carcinógenos químicos como los del humo del tabaco,

con la pérdida o inactivación del gen, recientemente clonado, *FHIT* (Otha et al., 1996) y el probable aunque aun no demostrado efecto que tiene la pérdida de este gen, en la desregulación del ciclo celular y por tanto en las primeras etapas de la progresión tumoral (Pennisi, 1996). El sitio frágil *FRA3B* es además uno de los *loci* donde se ha detectado integración de secuencias de VPH18 en un carcinoma de cervix (tabla 3) (Wilke et al, 1996).

A la vista de lo expuesto anteriormente se deduce que es importante la detección y clonación de cambios en el ADN de las células de tumores cervicales pues pueden ser causantes de alteraciones en genes cuya manifestación fenotípica va determinando cada etapa de la progresión tumoral (Jesudasan et al, 1995; Mullocandov et al., 1996). Una de las alteraciones más significativas, de estos tumores, viene dada por la integración del ADN viral en el genoma celular. La integración viral se ha estudiado a nivel molecular en un número de casos de carcinoma y de líneas celulares derivadas de estos (Matsukara et al., 1986; Baker et al., 1987; Schneider-Maunoury et al., 1987; el Awady et al., 1987; Choo et al., 1990; Kahn et al., 1994; Bauer-Hofmann et al., 1996), no encontrándose homología significativa, entre las secuencias virales y las secuencias celulares en el *locus* de integración, necesaria para la recombinación homóloga. Más bien parece que se trata de un fenómeno de recombinación ilegítima en el que se pierde una fracción de tamaño variable del genoma viral, detectándose también pérdidas de secuencias celulares en todos los casos estudiados.

En experimentos de transfección de secuencias de VPH, *in vitro* y posterior análisis de los *loci* de integración, llevados a cabo por Smith y colaboradores (1992), se observó que las secuencias virales se integraban de manera aparentemente aleatoria en cualquier cromosoma pero siempre en regiones cercanas a sitios frágiles cromosómicos. Sin embargo, en el número creciente de casos en los que se estudia la localización del *locus* de integración viral *in vivo*, se observa la existencia de *loci* preferidos para la integración, posiblemente porque de todos los posibles *loci* de integración viral, se seleccionan los que más contribuyen a la progresión tumoral.

La hipótesis que relaciona las alteraciones que se producen en el *locus* de integración con la progresión maligna se basa en fundamentalmente en dos observaciones: a) En la mayoría de los casos estudiados la integración se produce en una región cromosómica asociada ya con el fenotipo tumoral, tanto por conocerse uno o más oncogenes que se encuentran localizados en ese área (Dürst et al 1987; Popescu et al 1990, Couturier et al., 1990) como por tratarse de una región en la que frecuentemente se observan aberraciones cromosómicas asociadas a otros tipos de tumores (recopilado en Lazo et al 1992, Wilke et al., 1996). En el escaso número de casos en los que se ha

estudiado la localización cromosómica de las secuencias virales integradas, se han encontrado dos regiones recurrentes para la integración viral, estas son: 8q24 en la cual se han localizado secuencias virales de VPH16 y VPH18 en cinco casos de carcinomas primarios o de líneas celulares derivadas de éstos (Couturier et al., 1991) y 12q13-15 en la que se han localizado secuencias de VPH en dos casos (recopilado en Lazo et al 1992; Sastre-Garau et al., 1995). Esta hipótesis estaría en concordancia con las observaciones realizadas por Tschlis y Lazo (1991) en oncogénesis experimental por retrovirus no transformantes.

La región cromosómica 12q13-15 está afectada por la integración de secuencias de VPH en dos líneas celulares; SW756 derivada de un carcinoma cervical invasivo (Freedman et al 1982), y SK-*v* derivada de una neoplasia vulvar pre-invasiva (Schneider-Maunoury et al., 1987), conteniendo secuencias de VPH18 y VPH16 respectivamente. En el caso de SW756 existen evidencias citogenéticas de la pérdida de una banda cromosómica, en el *locus* de integración de VPH18 (Popescu y DiPaolo, 1990). Esta observación microscópica sugiere la existencia de una delección de gran tamaño, fenómeno que en células cancerígenas se asocia a la posible pérdida o inactivación de un gen supresor de tumores (Knudson, 1993). Es de gran importancia el hecho de que se hayan detectado aberraciones cromosómicas en la región 12q13-15 asociadas a una serie de tumores sólidos, tanto malignos como benignos. Los tumores malignos implicados son: liposarcomas mixoides con translocaciones que afectan al gen del factor de transcripción CHOP, llamado *GADD153*, (Rabbitts, 1993), melanoma maligno de tejidos blandos con translocaciones que afectan al gen del factor de transcripción ATF-1 (Zucman et al, 1993) y un subgrupo de sarcomas (Oliner et al, 1992) y de gliomas malignos (Reifenberger et al, 1994) con amplificaciones de secuencias que incluyen varios genes como los de la quinasa de ciclina CDK4 (Demetrick et al, 1994), los de la proteína de membrana SAS (Jankowski et al, 1994), y el protooncogen *MDM2* (Oliner et al, 1992). Entre los tumores benignos se han encontrado amplificaciones del gen *GII* en gliomas (Kinzel et al., 1989), translocaciones cromosómicas en 12q13-15 en multitud de tumores de origen mesenquimal entre los que destacan: leiomiomas uterinos, lipomas y adenomas pleomórficos de las glándulas salivares (Schoenmakers et al 1994). Los puntos de recombinación de las translocaciones de estos tumores benignos han sido recientemente localizadas en una región de 1,7 Mb llamada MAR (Multiple Aberration Region) situada en 12q14-15 (Van de Ven et al., 1995), dentro de la cual ha podido localizarse un gen, el *HMGI-C*, cuyo marco de lectura abierto se encuentra interrumpido por translocaciones en un número de lipomas, adenomas y hamatomas estudiados (Ashar et al., 1995, Schoenmakers et al, 1995 b; Kazmierczak et al 1996).

Otras anomalías cromosómicas de la región 12q13-15, aun no bien caracterizadas, incluyen pérdida de heterocigosidad (en la región 12q13-qter) detectada en número significativo de seminomas (Murty et al, 1994). Las pérdidas de heterocigosidad son consecuencia de deleciones en uno de los alelos y su presencia en células cancerígenas puede ser indicativa de la existencia de un gen supresor de tumores en dicho *locus*. Se ha detectado, también, supresión de la tumorigenicidad en un experimento realizado con células de cáncer de próstata en cultivo, a las que se transfectó la región cromosómica 12pter-q13 (Bérubé et al, 1994). Esta observación es indicativa de la presencia de un gen supresor de tumores en esta región, si bien en este caso el posible gen supresor de tumores quedaría en una región más cercana al centrómero que el hipotético gen supresor de tumores en seminomas.

Entre otras anomalías de la región 12q13-15 asociadas al fenotipo tumoral cabe mencionar la existencia de un caso de carcinoma hepático en el que la integración de secuencias del VHB ha sido detectada en la región 12q13 (Matsubara y Tokino, 1990).

Toda esta riqueza de anomalías cromosómicas en la región 12q13-15 ha sido determinante en el interés que ha llevado a la clonación del *locus* de integración viral en la línea celular SW756. En este trabajo se describe tanto la clonación del *locus* de integración como su correspondiente alelo no-ocupado (*PAL2*), detectándose un complejo reordenamiento genómico que incluye inversiones y deleciones de secuencias. El reordenamiento que sufre el área adyacente a las secuencias virales hace de la integración del ADN de VPH18 en SW756 un fenómeno interesante para el estudio molecular, no solo porque aparezcan secuencias exógenas, integradas, con demostrado poder oncogénico, sino porque las deleciones e inversiones que tienen lugar a consecuencia de la integración pueden ser la causa de alteraciones en el marco de lectura abierta de algún gen importante en el funcionamiento celular. Por esta razón fue analizada, por medio de la técnica de "Southern", la posible alteración de gran parte de los genes relacionados con el fenotipo tumoral que han sido localizados en la región 12q13-15 hasta el momento, no detectándose alteraciones en ninguno de ellos a causa de la integración del genoma viral, en la línea celular SW756.

Por medio del análisis de secuencia, se estudió la presencia de áreas codificantes en el ADN celular inmediatamente adyacente al *locus* de integración (*PAL2*), observándose que el genoma viral no interrumpe directamente ninguna secuencia codificante. Esto no descarta la posibilidad de que las secuencias virales estén integradas en el intrón de un gen, o la posible pérdida de un exón entero o más, a causa de la deleción.

Conocidos los 300 pares de bases flanqueantes a las secuencias de VPH16 integradas en la región 12q14-15 en la línea celular SK-v (Schneider-Mounoury et al., 1987) se realizó el análisis comparativo entre dichas secuencias y las flanqueantes al ADN viral en la línea celular SW756 (secuencia PAL2A y secuencia PAL2B). No detectándose homología significativa entre ellas. Este resultado está en concordancia con las observaciones hechas por otros autores (Baker et al., 1987; el Awady et al., 1987; Choo et al., 1990; Smith et al., 1992; Bauer-Hofmann et al., 1996) que no detectan la existencia de secuencias diana para la integración del ADN de VPH en el genoma celular.

Se localizó el *locus PAL2*, con exactitud, en el mapa físico del cromosoma 12 (Krauter et al., 1995). En un primer análisis se detectó que dicho *locus* se encontraba fuera de la zona que comprende las secuencias amplificadas, en 12q13-15, de las líneas celulares procedentes de sarcomas: OSA y RMS-13. Un análisis posterior basado en el *screening* de una genoteca de cósmidos del cromosoma 12 hizo posible la localización precisa del *locus* en el mapa físico del cromosoma 12, entre los marcadores polimórficos D12S1585 y D12S1649 dentro de la llamada región MAR (Multiple Aberration Region) (Van de Ven et al., 1995) a 150 Kb del primer exon del gen *HMGI-C*. En la figura 42 se muestra la localización relativa de *PAL2* en la región 13q13-15.

El gen *HMGI-C* se encuentra sobreexpresado en tumores malignos de tipo mesenquimal, como el carcinoma hepático e interrumpido por translocaciones en algunos casos de tumores benignos de tipo mesenquimal, no se encuentra, sin embargo, sobreexpresado en la línea celular SW756. Al estudiarse la posible alteración del marco de lectura abierta del gen *HMGI-C* en la línea celular SW756 por alteraciones en su genoma debidas al complejo reordenamiento de secuencias que tuvo lugar durante la integración viral, no pudo detectarse la existencia transcritos aberrantes. El no detectar aumento en la expresión del gen *HMGI-C* en la línea celular SW756, así como la imposibilidad de detectar transcritos aberrantes de éste gen son circunstancias que sugieren una no implicación de *HMGI-C* en el carcinoma de cervix del que deriva la línea celular SW756.

Es sin embargo altamente probable la existencia de genes relacionados con el control del funcionamiento celular, situados en 12q13-15, que aun no hayan sido clonados, ya que la localización y clonación de genes implicados en el fenotipo tumoral conlleva un largo proceso, que en ocasiones, requiere el análisis de multitud de muestras clínicas, seguido de estudios moleculares que terminan en la "clonación posicional" del gen. Esta empresa queda fuera de los objetivos de este trabajo, cuyo propósito es el análisis molecular del fenómeno de la integración viral en un caso concreto y la localización precisa del *locus* de integración *PAL2* en el mapa físico del cromosoma

12. Sentando así las bases para estudios posteriores que habrán de desvelar qué genes están alterados en el carcinoma de cervix del que procede la líneas celular SW756. Uno de ellos posiblemente sea el alterado por el propio genoma viral al integrarse.

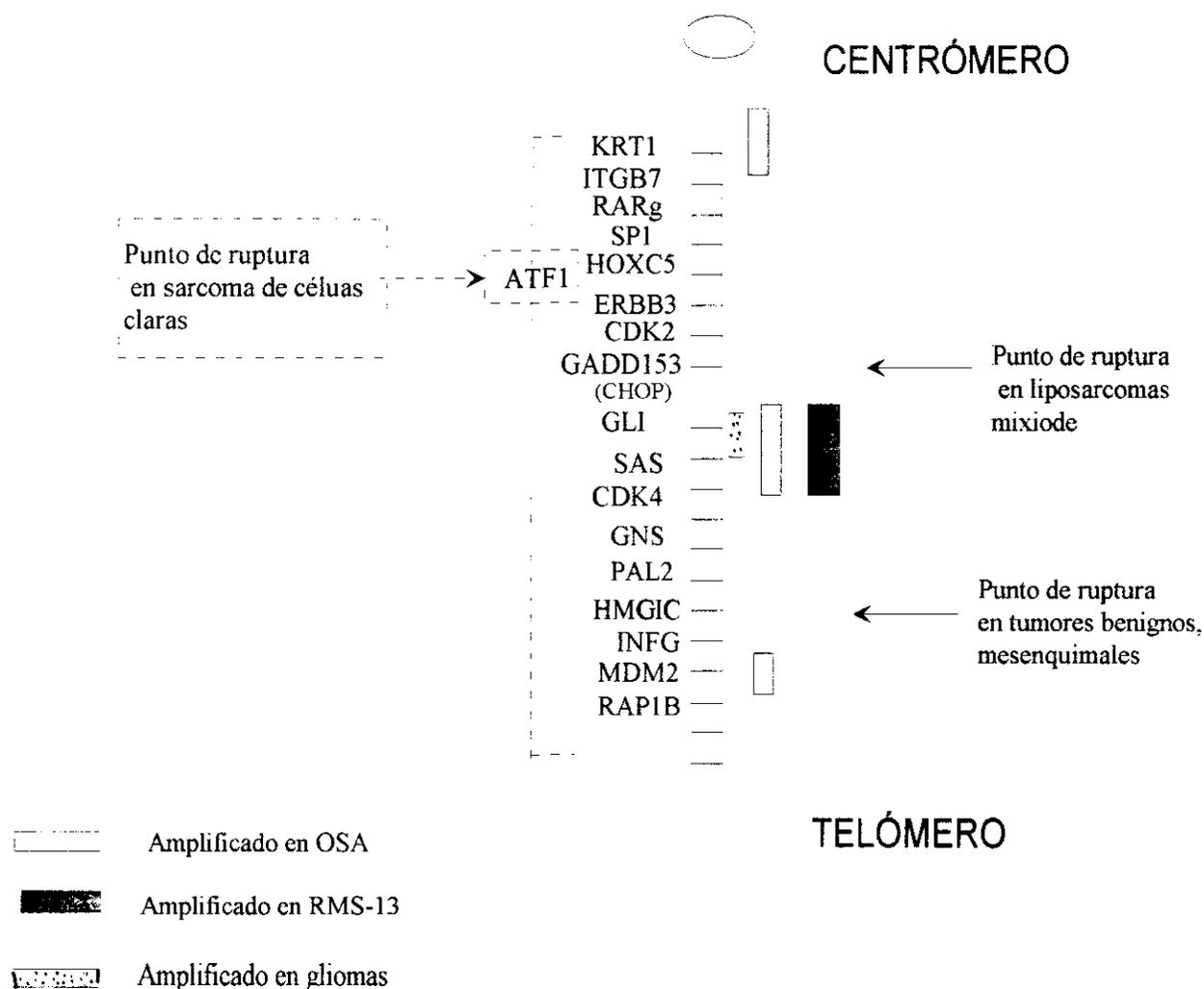


Fig. 42. localización relativa del locus *PAL2*. entre los genes localizados en la región 12q13-15. Basado en el mapa físico de AECOM/YALE. 1995. También se señalan la posición de las alteraciones genéticas asociadas a tumores

En lo referente a los genes virales integrados la línea celular SW756, es un aspecto que ha sido ya estudiado por otros grupos y su estudio no era el objetivo primordial de este trabajo, sin embargo ha podido confirmarse por el análisis directo de las secuencias el patrón de ruptura del genoma viral propuesto por A. Shneidr-Gädicke y E. Schwarz en 1986. Se ha estudiado, por medio de la técnica de "Northern", la expresión los genes E6, E7 y E1 observándose que dan lugar a transcritos aberrantes debido a que poseen secuencias celulares en el extremo 3'. No detectándose transcripción del gen E2, en concordancia, también, con los experimentos de A. Shneidr-Gädicke y E. Schwarz. 1986. Estas características en el patrón de expresión se repiten en la inmensa mayoría de los casos de integración de secuencias virales en cánceres genitales, y confirman la existencia de una fuerte selección en la expresión de los genes E6 y E7 que se manifiesta también por la no expresión del inhibidor de su transcripción el gen E2.

Se ha confirmado por análisis de secuencia que las dos terceras partes en el extremo 5' del gen E2 se han delecionado durante o después del proceso de integración en el genoma celular y el 1/3 restante de su marco de lectura abierto, ha quedado localizado 5' de las secuencias promotoras virales, URR o LCR, por lo que este gen en ningún caso hubiera podido transcribirse desde el promotor viral, como quiera que al gen le falta la mayor parte de su secuencia del extremo 5' tampoco podrá transcribirse desde promotores celulares adyacentes. El gen E1 se encuentra situado 3' de las secuencias promotoras virales URR o LCR por lo que se transcribe desde el promotor viral, sin embargo, el último tercio del marco de lectura abierta de este gen está delecionado por lo que el gen E1 es aberrante y de traducirse la proteína no será funcional. La proteína E1 tiene función en la replicación del ADN viral.

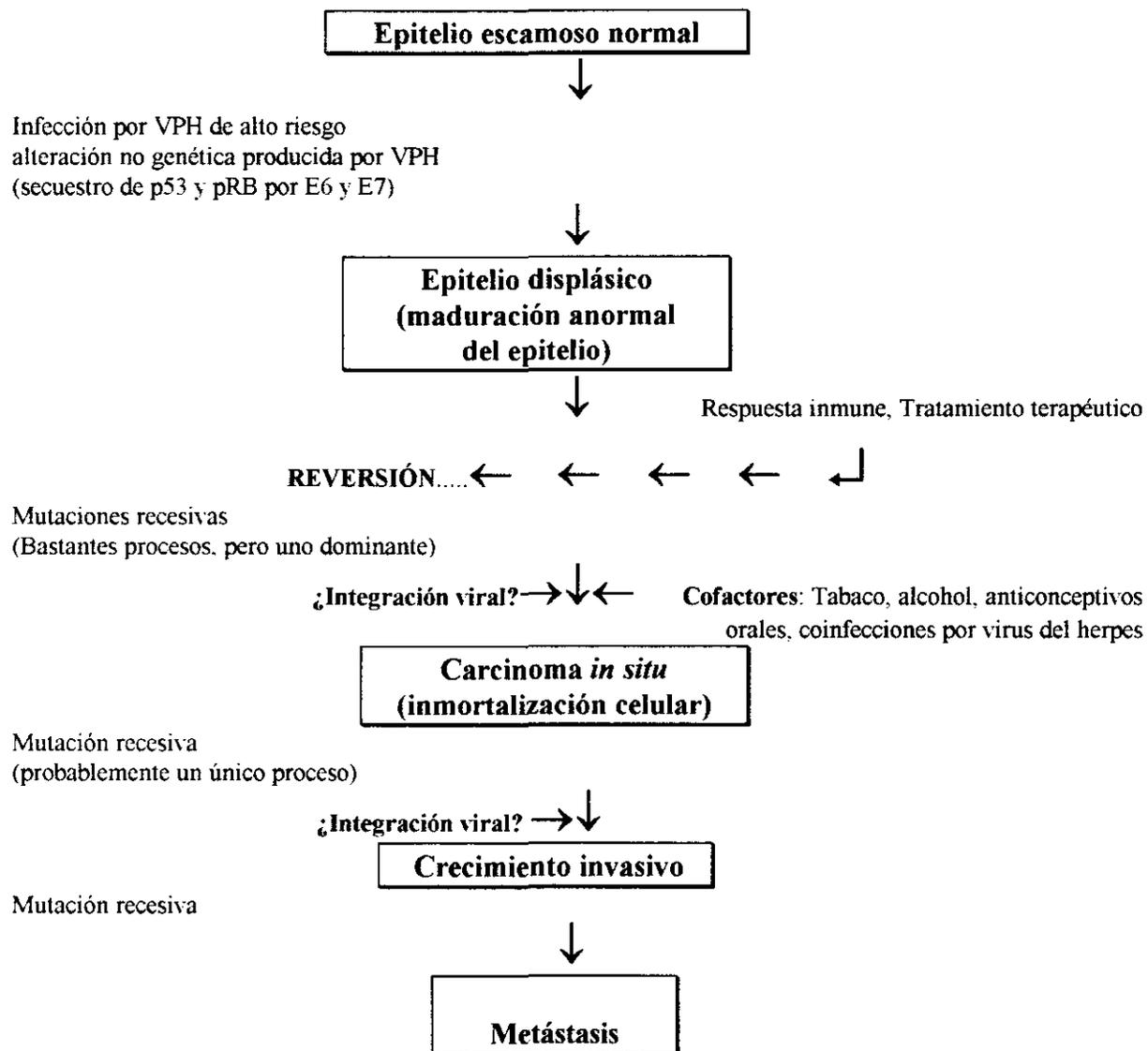
Estos resultados se compararon con los publicados por Schneider-Manoury et al., (1987) en los que describen las secuencias virales integradas en la región 112q14-15 en la línea celular SK-v. observándose que el patrón de integración es sensiblemente diferente ya que aunque en ambos casos se conservan las secuencias reguladoras URR o LTR y las de los genes E6 y E7 (al igual que en el resto de los casos de integración de secuencias de VPH estudiados) en el genoma viral integrado en la línea celular SK-v la ruptura se produce del nucleótido 3661 al nucleótido 4474 de la secuencia de VPH16, es decir de la mitad de los gen E2 y E4 a la mitad del gen estructural L2, quedando completamente delecionado el gen E5.

El siguiente estudio a realizar será la comparación entre el *locus PAL2* y el afectado por la integración de secuencias de VPH16 en la línea celular SK-v. Para ello es preciso localizar con

exactitud en el mapa físico del cromosoma 12 el *locus* de integración en SK-v, como se describe en este trabajo con *PAL2*. Pues es poco probable que la coincidencia de dos *loci* de integración viral se deba solo al azar, y la repetición de alteraciones genómicas en una región cromosómica en distintos casos de un mismo tipo de tumor es clave para la identificación de genes relacionados con la progresión de dichos tumores.

4.1- MODELO DE CARCINOGENESIS GENITAL ASOCIADA A LA INFECCIÓN POR LOS GENOTIPOS DE VPH DE ALTO RIESGO.

Aunque aun no se han detectado ninguna de las alteraciones genéticas que intervienen en la progresión del cáncer genital se sabe que deben existir alteraciones de genes concretos, responsables de la progresión maligna en cada etapa del tumor. La integración viral causa una alteración en el genoma que puede ser responsable de la progresión en alguna de las etapas. Al no conocerse en qué momento se produce la integración, no puede determinarse en qué etapa del proceso interviene. Es de gran importancia caracterizar la alteración que se produce en el genoma en un gran segmento alrededor del punto de integración, ya que las reorganización que tienen lugar son complejas y pueden afectar a genes localizados a gran distancia. Hasta este momento no ha sido posible este abordaje y los estudios moleculares previos sobre el *locus* de integración de los VPH se limitaban a estudiar la secuencia en el punto de recombinación. Gracias al progresivo conocimiento del genoma humano está siendo posible caracterizar alteraciones que abarcan grandes segmentos de ADN, es necesario valerse de esto nuevos conocimientos en el estudio del efecto de la integración viral sobre la progresión maligna para llegar a conclusiones concretas que ayuden a desvelar las rutas implicadas en las distinta etapas de la carcinogénesis genital, como ya se ha hecho con otros tipos de procesos malignos. A continuación se expone un esquema de las fases por las que podría transcurrir el tumor y los posibles momentos en los que podría intervenir la integración viral. Este modelo se basa en los datos bibliográficos sobre carcinogénesis genital clínica, estudios *in vitro* con líneas celulares derivadas de muestras tumorales y estudios moleculares y citogenéticos de los *loci* de integración viral.



5.-CONCLUSIONES

- 1- Se ha clonado el *locus* de integración de VPH18 en la línea celular SW756, denominado *PAL2* y se han secuenciado los puntos de recombinación entre el ADN viral y el ADN humano, encontrándose que la ruptura del genoma circular viral había tenido lugar entre los nucleótidos 2643 y 3418 resultando en una delección de 775 pb del ADN viral, que comprenden el último tercio del marco de lectura abierta del gen E1 y la casi totalidad del marco de lectura abierta del gen E2.
- 2- La secuencia celular flanqueante 3' (parte celular del clon p500) y la secuencia celular flanqueante 5' (parte celular del clon pHH) se encontraban separadas antes de que el ADN viral se integrase ya que detectan fragmentos de restricción distintos, con todas las endonucleasas analizadas, en el ADN de una célula que no tiene alteraciones en esta región cromosómica.
- 3- Se han clonado, en fago lambda, los alelos germinales, o no-ocupados, correspondientes a los puntos de recombinación viral-celular 5' y 3' en la línea celular SW756,
- 4- Los clones de fago lambda que comprenden el alelo germinal correspondiente al punto de recombinación 5' (*locus PAL2A*) y al punto de recombinación 3' (*locus PAL2B*), no son solapantes en ningún punto como ha podido observarse por comparación de sus mapas de restricción. Este hecho llevó a suponer la existencia de una delección mayor de 12 kb en el *locus* de integración viral en la línea celular SW756.
- 5- Se ha observado una total identidad de secuencias entre la parte celular del fragmento que comprende el punto de recombinación 5' (secuencia celular del clon pHH) y su correspondiente germinal (secuencia *PAL2A*), y entre la parte celular del fragmento que comprende el punto de recombinación 3' (secuencia celular del clon p500) y su correspondiente germinal (secuencia *PAL2B*). Debe mencionarse, sin embargo, la existencia de una secuencia de 17 pb en el punto de recombinación 5' que no tiene su homólogo en el la secuencia *PAL2A*, sugiriendo este hecho, que la integración tuvo lugar en varias etapas y es compleja.

- 6- No existe homología significativa entre las secuencias virales y las celulares en los puntos de recombinación 5' y 3', indicando, este hecho, que la recombinación que tuvo lugar entre las secuencias virales y las celulares, durante el proceso de integración del ADN viral, fue de tipo no homóloga o ilegítima.
- 7- El *locus* *PAL2* no se encuentra incluido en las áreas amplificadas que se detecta en la región cromosómica 12q13-15, en los sarcomas de los que provienen las líneas celulares OSA y RMS-13.
- 8- La integración del ADN de VPH18 y las reorganizaciones genómicas subsiguientes no han tenido efectos aparentes en la estructura de otros *loci* oncogénicos localizados en la misma región cromosómica, 12q13-15. Los genes: *GADD153* (CHOP), *WNT1*, *ITGB7*, *RARG*, *SP1*, *ATF1*, *ERBB3*, *CDK2*, *CDK4*, *GLI*, *SAS* y *MDM2* no se encuentran alterados en SW756.
- 9- Se ha clonado un fragmento de ADN genómico de 40 kb que contenía las secuencias de los alelos germinales correspondientes a los puntos de recombinación viral-celular: 5', secuencia *PAL2A*, y 3', secuencia *PAL2B*. El nombre del clon cosmidico es 107E2 y ambas secuencias están situadas en sendos extremos de su inserto, separadas por 30 kb de ADN genómico.
- 10- La secuencia de 30 kb entre los *loci* *PAL2A* y *PAL2B* no está delecionada en el alelo ocupado de SW756, la región delecionada en dicho alelo se corresponde, en el alelo no-ocupado, con dos regiones distintas separadas por la secuencia de 30 kb. Estos resultados indican que la reorganización que tuvo lugar en el alelo ocupado fue compleja comprendiendo inversiones de secuencias y deleciones.
- 11- Se ha localizado con gran precisión el *locus* *PAL2* en el mapa físico y genético del cromosoma 12. Así el *locus* de integración del VPH18 en SW756 se convierte en un nueva secuencia conocida situada entre los STS 12-RM33 y STS 12-RM53, a 150 kb del primer

exón del gen *MHGI-C* (gen alterado en tumores de origen mesodérmico). Sin embargo, no ha podido detectarse ninguna alteración en el gen *MHGI-C* en la línea celular SW756, por acción de las secuencias reguladoras virales o a causa de la recombinación que tuvo lugar en el *locus* de integración.

- Albertsen, HM; Alderrahim, H; Cann, HM; Dausset, J; Le Paslier, D; Cohen, D (1990): Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing seven haploid human genome equivalents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4256-4260.
- Arends, MJ; Donaldson, YK; Duvall, E; Wyllie, AH; Bird, CC (1993): Human papillomavirus type 18 associates with more advanced cervical neoplasia than human papillomavirus type 16. *Hum. pathol.* **24**, 251-256.
- Ashar, HR; Schoenberg-Fejzo, M; Tkachenko, A; Zhou, X; Fletcher, JA; Weremowicz, S; Morton, CC; Chada, K (1995): Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* **82**, 57-65.
- Auersperg, N; Hawryluck, AF (1962): *A. F. J. natn. Cancer Inst.* **28**, 605-627.
- Baker, C; Phelps, WC; Lindgren, V; Braun, MJ; Gonda, MA; Howley, PM (1987): Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J. Virol* **61**, 962-971.
- Bauer-Hofmann, R; Borghouts, C; Auvinen, E; Bourda, E; Rösl, F; Alonso, A (1996): Genomic cloning and characterization of the nonoccupied allele corresponding to the integration site of human Papillomavirus type 16 DNA in the cervical cancer line SiHa. *Virol.* **217**, 33-41.
- Bedell, MA; Jones, KH; Laimins, LA (1987): The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and Rat-1 cells. *J. Virol* **61**, 3635-3640.
- Benton, WD; Davies, RW (1977): Screening lambda-gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* **196**, 180-182.
- Berglund, EO; Ranscht, B (1994): Molecular cloning and in situ hybridization of the human contactin gene (CNTN1) on chromosome 12q11-q12. *Genomics* **21**, 571-582.
- Bernard, BA (1993): Human papillomavirus and malignant transformation. En: *Molecular Biology of the Skin: The Keratinocyte*. 1^a ed. (Eds: Darmon, M; Blumenberg, M) Academic Press, Inc., San Diego, California., 207-243.
- Bérubé, NG; Speevak, MD; Chevrette, M (1994): Suppression of tumorigenicity of human prostate cancer cells by introduction of human chromosome del(12)(q13). *Cancer Research* **54**, 3077-3081.
- Bièche, I; Lidereau, R (1995): Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosom. Cancer* **14**, 227-251.
- Birnboim, HL; Doly, J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid. Res.* **7**, 1513-1523.
- Board, PG; Coggan, M; Woodcock, DM (1992): The human Pi class glutathione transferase sequence at 12q13-14 is a reverse-transcribed pseudogene. *Genomics* **13**, 470-471.
- Bosch, FX; Manos, MM; Muñoz, N; Sherman, M; Jansen, AM; Peto, J; Schiffman, MH; Moreno, V; Kurman, R; Shah, KV; International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group (1995): Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a Worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 796-802.
- Boshart, M; Gissmann, L; Ikenberg, H; Kleinheinz, A; Scheurlen, W; zur Hausen, H (1984): A new type of papillomavirus DNA, its presence in cervical cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO. J.* **3**, 1151-1157.

- Cannistra,SA; Niloff, JM (1996): Cancer of the uterine cervix. *N.Engl.J.Med.* **334**, 1030-1038.
- Cavenee,WK; White,RL (1995): The genetic basis of cancer. *Sci. Am.* **272**, 72-79.
- Chen,T-M; Pecoraro,G; Defendi,V (1993): Genetic analysis of "in vitro" progression of human papillomavirus-transfected human cervical cells. *Cancer Research* **53**, 1167-1171.
- Chong,T; Apt,D; Gloss,B; Isa,M; Bernard,A-U (1991): The Enhancer of human papillomavirus type 16: Binding Sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J. Virol* **65**, 5933-5943.
- Choo,K-B; Lee,H-H; Liew,L-N; Chong,K-Y; Chou,H-F (1990): Analysis of the unoccupied site of an integrated human papillomavirus 16 sequence in a cervical carcinoma. *Virol.* **178**, 621-625.
- Cib,C; Fauré,S; Fizames,C; Samson,D; Drouot,N; Vignal,A; Millasseau,P; Marc,S; Hazan,J; Seboun,E; Lathrop,M; Gyapay,G; Morissette,J; Weissenbach,J (1996): A comprehensive genetic map of human genome based on 5,264 micrisatellites. *Nature* **380**, 152-154; Supplement: A1-A134.
- Cole,ST; Danos,O (1987): Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. *J. Mol. Biol.* **193**, 599-608.
- Couturier,J; Sastre-Garau,X; Schneider-Maunoury,S; Labib,A; Orth,G (1991): Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for protooncogene expression. *J. Virol* **65**, 4534-5438.
- Cromme,FV; McCance,DJ; Straight,SW; et al. (1994): Abstract No. 49 from the *13th International Papillomavirus Conference, Amsterdam, 1994*: Expression of HPV-16 E5 protein in keratinocytes in vitro leads to post-transcriptional loss of MHC-I and ATP-I expression., .
- Crozat,A; Aman,P; Mandahl,N; Ron,D (1993): Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liosarcoma. *Nature* **363**, 640-644.
- Cyster,Jason G; Williams,Alan F (1992): The importance of cross-linking in the homotypic aggregation of lymphocytes induced by anti-leukosialin(CD43) antibodies. *Eur. J. Immunol.* **22**, 2565-2572.
- Czeglédy,J; Iosif,C; Hansson,BG; Evander,M; Gergely,L; Wadell,G (1995): Can a test for E6 y E7 transcripts of human papillomavirus type 16 serve as diagnostic tool for the detection of micrometastasis in cervical cancer? *Int. J. Cancer* **64**, 211-215.
- Deen,PMT; Weghuis,DO; Sinke,RJ; Geurts van Kessel,A; Wieringa,B; van Os,CH (1994): Assignment of the human gene for the water channel of renal collecting duct Aquaporin 2 (AQP2) to chromosome 12 region q12-q13. *Cytogenet. Cell. Genet.* **66**, 260-262.
- Demetrick,DJ; Zhang,H; Beach,DH (1994): Chromosomal mapping of human CDK2, CDK4 and CDK5 cell cycle kinase genes. *Cytogenet. Cell. Genet.* **66**, 72-74.
- Devereux,J; Haeberly,P; Smithies,O (1984): A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acid. Res.* **12**, 387-395.
- de Villiers,E-M (1994): Human pathogenic papillomavirus types. An update. *Current Top.Microbiol.Immunol.* **186**, 1-12.
- Dorak,MT (1996): The implications for childhood leukemia of infection with adenovirus. *Trends Microbiol.* **4**, 60-63.

- Dürst,M; Croce,CM; Gissmann,L; Schwarz,E; Huebner,K (1987): Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1070-1974.
- Dürst,M; Gissmann,I; Ikenberg,H; zur Hausen,H (1983): A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence en cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3812-3815.
- Dyson,N; Howley,PM; Munger,K; et al. (1992): The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to retinoblastoma gene product. *Science* **243**, 934-937.
- El Awady,MK; Kaplan,JB; O'Brien,SJ; Burk,RD (1987): Molecular Analysis of integrated human papillomavirus 16 sequences in the cervical cancer cell line SiHa. *Viol.* **159**, 389-398.
- Fearon,ER; Vogelstein,B (1990): A genetic model for colorrectal tumorigenes. *Cell* **61**, 759.
- Feinberg,AP; Vogelstein,B (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem.* **132**, 6.
- Freedman,RS; Bowen,JM; Leibovitz,A; Pathak,S; Siciliano,M; Gallager,HS; Giovanella,BC (1982): Characterization of a cell line (SW756) derived from a human squamous carcinoma of the uterine cervix. *In Vitro* **18**, 719-726.
- Friedl,F; Kimura,I; Osato,T; Ito,Y (1970): Studies on a new human cell line (SiHa)derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and morphology. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **135**, 543-545.
- Furihata,M; Yamasaki,I; Ohtsuki,Y; Sonobe,H; Morioka,M; Yamamoto,A; Terao,N; Kuwahara,M; Fujisaki,N (1995): p53 and human papilomavirus DNA in renal pelvic and ureteral carcinoma including dysplastic lesions. *Int. J. Cancer* **64**, 298-303.
- Gallego,MI; Zimonjic,DB; Popescu,NC; DiPaolo,JA; Lazo,PA (1994): Integration Site of Human Papilomavirus Type-18 DNA in Chromosome Band 8q22.1 of C4-I Cervical Carcinoma: DNase I Hypersensitivity and Methylation of Cellular Flanking Sequences. *Genes Chromosom. Cancer* **9**, 28-32.
- Gaynor,RB; Shieh,B-H; Klisak,I; Sparkes,RS; Lusk,AJ (1993): Localization of the transcription factor SPI gene to human chromosome 12q12-q13.2. *Cytogenet. Cell. Genet.* **62**, 210-212.
- Gey,GO; Coffman,WD; Kubicek,MT (1952): . *Cancer Research* **12**, 264.
- Green,ED; Olson,MV (1990): Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries using the polymerase chain reaction. *Methods Mol.Cell.Biol.* **4**, 257-265.
- Hanahan,D (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557.
- Hart,TC; Zhou,J; Champagne,C; Van Dyke,TE; Rao,PN; Pettenati,MJ (1994): Assignment of the human diacylglycerol kinase gene (DAGK) to 12q13.3 using fluorescence in situ hybridization analysis. *Genomics* **22**, 246-247.
- Hershey,RI (1987): *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. 2° ed. Alan R. Liss Edit., N.Y.
- Hohn,B (1979): *Methods in enzymology*. Vol. **68**. (Eds: Colowick,SP & Kaplan,NO) Academic Press, New York.

- Hotta,H; Ross,AH; Huebner,K; Isobe,M; Wendeborn,S; Chau,MV; Ricciardi,RP; Tsujimoto,Y; Croce,CM; Koprowski,H (1988): Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Research* **48**, 2955-2962.
- Hudson,JB; Bedell,MA; McCance,DJ; Laimins,LA (1990): Inmortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J. Virol* **64**, 519-526.
- Huibregtse,JM; Scheffner,M (1994): Mechanisms of tumor suppressor protein inactivation by the human papillomavirus E6 y E7 oncoproteins. *Seminars Virol.* **5**, 357-367.
- Hwang,ES; Neager,LK; DiMaio,D (1996): Activation of the endogenous p53 growth inhibitory pathway in HeLa cervical carcinoma cells by expresion of the bovine papillomavirus E2 gene. *Oncogene* **12**, 795-803.
- Internacional Agency for Reseach on Cancer (IARC) (1989): *Biennial Report 1988/1989*. IARC, Lyons, France.
- Jankowski,SA; Mitchell,DS; Smith,SH; Trent,JM; Meltzer,PS (1994): SAS, a gene amplified in human sarcomas, encodes a new member of the transmembrane 4 superfamily of proteins. *Oncogene* **9**, 1205-1211.
- Jeon,S; Allen-Hoffmann,BL; Lambert,P (1995): Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J. Virol* **69**, 2989-2997.
- Jeon,S; Lambert,P (1995): Integration of human papilomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 y E7 mRNAs: Implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1654-1658.
- Jesudasan,RA; Rahman,RA; Chandrashekarappa,S; Evans,GA; Srivatsan,ES (1995): Delection and translocation of chromosome 11q13 sequences in cervical carcinoma cell lines. *Am.J.Hum.Genet.* **56**, 705-715.
- Kahn,T; Turazza,E; Ojeda,R; Berchovich,A; Strelau,A; Lichter,P; Poustka,A; Grinstein,S; zur Hausen,H (1994): Integration of human papillomavirus type 6a in tonsillar carcinoma: chromosomal localization and nucleótide sequence of the genomic target region. *Cancer Research* **54**, 1305-1312.
- Kazmierczak,B; Hennig,Y; Wanschura,S; Rogalla,P; Bartnitzke,S; Van de Ven,W; Bullerdiek,J (1995): Description of a novel fusion transcript between HMGI-C, a gene encoding for a member of the high movility group proteins, and the mitochondrial aldehyde dehidrogenase gene. *Cancer Research* **55**, 6038-6039.
- Kelley,MJ; Otterson,GA; Kaye,FJ; Popescu,NC; Jhohnson,BE (1995): CDKN2 in HPV-positive and negative cervical-carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* **63**, 226-230.
- Kinzler,KL; Ruppert,JM; Bigner,SH; Vogelstein,B (1988): The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc-finger proteins. *Nature* **332**, 371-374.
- Kinzler,KW; Vogelstein,B (1995): *Colorectal tumors*. In: *The Methabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7ª ed. (Eds: Scriver,CR; Beaudet,AL; Sly,WS; Valle,D) McGraw-Hill,Inc., NY, 642-663.
- Klein,G; Giovanella,B; Westman,A; Stehlin,JS; Mumford,D (1975): An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. *Intervirology* **5**, 319-334.

- Klingelhutz.AJ; Foster.SA; McDougall,JK (1996): Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* **380**, 79-82.
- Knudson.AG (1993): Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10914-10921.
- Kouzarides.T (1995): Functions of pRB and p53: what's the connection? *Trends Cell.Biol.* **5**, 448-450.
- Krauter.K; Montgomery,K; Yoon,S-J; et als. (1995): A second generation YAC contig map of human chromosome 12. *Nature* **377**, 321-333.
- Kraus.MH; Issing.M; Popescu,NC; Aaronson.SA (1989): Isolation and characterization of ERBB3 a third member of ERBB/epiderm growth factor receptor family. Evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9193-9197.
- Kubota.R; Wang.Y; Minoshima.S; Kudoh.J; Mashima,Y; Oguchi,Y; Shimizu.N (1995): Mapping of human gene for a melanocyte protein Pmel 17 (D12S53E) to chromosome 12q13-q14. *Genomics* **26**, 430-431.
- Kucherlapati.R; Craig,I; Marynen,P (1994): Repot of the second international workshop on human chromosome 12 mapping 1994. *Cytogenet. Cell. Genet.* **67**, 245-276.
- Lazo.PA (1987a): Integration of papillomavirus DNA in HeLa Cells and its implications for tumorigenesis. *Cancer Cells* **5**, 359-365.
- Lazo.PA (1987b): Structure, DNaseI Hypersensitivity and expression of papillomavirus DNA integrated in the genome of HeLa cells. *Eur.J.Biochem.* **165**, 393-401.
- Lazo.PA (1988a): Human papillomaviruses in oncogenesis. *BioEssays* **9**, 158-162.
- Lazo.PA (1988b): Rearrangement of both alleles of human chromosome 8 in HeLa cells. one of them as a result of papillomavirus DNA integration. *J. Biol. Chem.* **263**, 360-367.
- Lazo.PA; Gallego.MI; Ballester,S; Feduchi,E (1992): Genetic alterations by human papillomaviruses in oncogenesis. *FEBS Lett.* **300**, 109-113.
- Lechner.MS; Lamins,LA (1994): Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J. Virol* **68**, 4262-4273.
- Lehmann.JM; Hoffmann.B; Pfahl,M (1991): Genomic organization of the retinoic acid receptor gamma gene. *Nucleic Acid. Res.* **19**, 573.
- Lehrach.HD; Diamond,JM; Wozney,JM; Boezdtker.H (1977): RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743.
- Little,FR (1987): Choice and use of cosmid vectors. En: *DNA cloning*. Vol. 3. (Ed: Glover,DM) IRL Press., 19-42.
- Maniatis.T; Hardison,RC; Lacy,E; Lauer,C; O'Connell,C; Quon,D; Sim,GK; Etstratiadis,A (1978): The isolation of structural genes from libriaris of eucaryotic DNA. *Cell* **15**, 687.
- Matsubara.K; Tokino.T (1990): Integration of hepetitis B DNA and its implications for hepatocarcinogenesis. *Mol.Biol. & Med.* **7**, 243-260.

- Matsukura,T; Kanda,T; Furuno,A; Yoshikawa,H; Kawana,T; Yoshiike,K (1986): Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 DNA integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. *J. Virol* **58**, 979-982.
- Matsukura,T; Sugase,M (1995): Identification of genital human papillomaviruses in cervical biopsy specimens: segregation of specific virus types in specific clinicopathologic lesions. *Int. J. Cancer* **61**, 13-22.
- Meyers,C; Frattini,MG; Hudson,JB; Laimins,LA (1992): Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science* **257**, 971-973.
- Minowada,J; Onuma,T; Moore,GE (1972): Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for thymus-derived lymphocytes. *J.Natl.Cancer Inst.* **49**, 891-895.
- Mitelman,F (1994): *Catalog of Human Chromosomal Aberrations in Cancer*. 5th ed. Wiley-Liss, New York.
- Montgomery,KT; Leblanc,JM; Tsai,P; McNinch,JS; Ward,DC; De Jong,PJ; Kucherlapaty,R; Krauter,KS (1993): Characterization of two chromosome 12 cosmid libraries and development of STSs from cosmid mapped by FISH. *Genomics* **17**, 682-693.
- Moyret-Lalle,C; MarÇais,C; Jacquemier,J; Moles,J-P; Daver,A; Soret,J-Y; Jeanteur,P; Ozturk,M; Theillet,C (1995): ras,p53 and HPV status in benign and malignant prostate tumors. *Int. J. Cancer* **64**, 124-129.
- Mullokanov,MR; Kholodilov,NG; Atkin,NB; Burk,RD; Jhonson,AB; Klinger,HP (1996): Genomic alterations in cervical carcinoma: losses of chromosome heterozygosity and human papilloma virus tumor status. *Cancer Research* **56**, 197-205.
- Muñoz,N; Bosch,FX Sanjosé,S; Tafur,L; Izarzuaga,Y; Gili,M; Viladiu,P; Navarro,C; Martos,C; Ascunce,N; Gonzalez,LC; Kaldor,JM; Guerrero,E; Lőrincz,A; Santamaria,M; Alonso de Ruiz,P; Aristicibal,N; Shah,K (1992): The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int. J. Cancer* **52**, 743-749.
- Murty,VVVS; Bosl,GJ; Houldsworth,J; Meyers,M; Mukherjee,AB; Rueter,V; Chaganti,RSK (1994): Allelic loss and somatic differentiation in human male germ cell tumors. *Oncogene* **9**, 2245-2251.
- Myers,G; Delius,H; Icenogel,J; Bernard,HU; Baker,C; Halpern,A; Wheeler,C (1995): *Human Papillomaviruses 1995. A compilation and analysis of nucleic acid and aminoacid sequences*. 1995 ed. Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos,NM,USA.
- Ohta,M; Inoue,H; Cotticelli,MG; Kastury,K; Baffa,R; Palazzo,J; Siprashivili,Z; Mori,M; McCue,P; Druck,T; Croce,CM; Huebner,K (1996): The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* **84**, 587-597.
- Oliner,JD; Kinzler,KW; Meltzer,PS; George,DL; Vogelstein,B (1992): Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* **350**, 80-83.
- Park,DJ, Wilczynski,SP, Paquette,RL, Miller,CW, Koeffler,HP (1994): P53 mutations in HPV-negative cervical carcinoma. *Oncogene*. **9**, 205-210
- Pennisi,E (1996): New gene forges link between fragile sites and many cancers. *Science* **272**, 649.

- Phelps,WC; Munger,K; Yee,CL; et al. (1992): Structure-function analysis of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J. Virol* **66**, 2418-2427.
- Pirisi,L; Creek,KE; Doniger,J; DiPaolo,JA (1988): Continuous cell lines with altered growth and differentiation properties originate after transfection of human keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *Carcinogenesis* **9**, 1563-1579.
- Popescu,N; Zimonjic,D; DiPaolo,JA (1990): Viral integration, fragile sites, and proto-oncogenes in human neoplasia. *Am.J.Hum.Genet.* **84**, 383-386.
- Popescu,NC; Amsbaugh,SC; Dipaolo,JA (1987): Human papillomavirus type 18 DNA is integrated at a single chromosome site in cervical carcinoma cell line SW756. *J. Virol* **51**, 1682-1685.
- Popescu,NC; DiPaolo,JA (1989): Preferential sites for viral integration on mammalian genome. *Cytogenet. Cancer Genet.* **42**, 157.
- Quinn,LA; Moore,GE; Morgan,RT; Woods,LK (1979): Cell lines from human colon carcinomas with unusual cell products, double minutes, and homogenously staining regions. *Cancer Research* **39**, 4914-4924.
- Rabbits,TH (1994): Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* **372**, 143-149.
- Rabbits,TH; Foster,A; Larson,R; Nathan,P (1993): Fusion of the dominant negative transcription factor gene CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. *Nature Genet.* **4**, 341-345.
- Reifenberger,G; Reifenberger,J; Ichimura,K; Meltzer,PS; Collins,VP (1994): Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS and MDM2. *Cancer Research* **54**, 4299-4303.
- Roberts,WM; Douglass,EC; Peiper,SC; Houghton,PJ; Look,AT (1989): Amplification of the gli gene in childhood sarcomas. *Cancer Research* **49**, 5407-5413.
- Romanczuk,H; Howley,PM (1992): Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3159-3163.
- Rosenberg,M; Fuchs,M; Le Beau,MM; Shows,TB (1991): Three epidermal and one simple epithelial type Ikeratin genes maps to human chromosome12. *Cytogenet. Cell. Genet.* **57**, 33-38.
- Rousseau-Merck,MF; Pizon,V; Tavitian,A; Berger,R (1990): Chromosome mapping of human RAS-related RAP1A, RAP1B and RAP2 genes to chromosomes 1p12-> 1p13, 12q14, and 13q34, respectively. *Cytogenet. Cell. Genet.* **53**, 2-4.
- Sambrook,J; Fritsch,EF; Maniatis,T (1989): *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2^a ed. Vol. 1,2,3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,N.Y.
- Sanger,F; Nicklen,S; Coulson,AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sastre-Garau,X; Couturier,J; Favre,M; Orth,G (1995): A recurrent human papillomavirus integration site at chromosome region 12q14-15 in SW756 and SK-v cell lines derived from genital tumors. *C.R.Acad.Sci. (Paris)* **318**, 475-478.

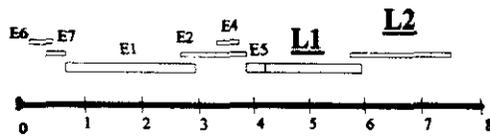
- Sastre-Garau,X; Schneider-Maunoury,S; Couturier,J; Orth,G (1990): Human papillomavirus type 16 DNA is integrated into chromosome region 12q14-15 in a cell line derived from a vulvar intraepithelial neoplasia. *Cancer Genet. Cytogenet.* **44**, 243-251.
- Schiffman.MH (1994): Epidemiology of cervical human papillomavirus infections. *Current Top.Microbiol.Immunol.* **86**, 56-81.
- Schneider-Gädicke,A; Schwarz,E (1986): Different human cervical cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO. J.* **5**, 2285-2292.
- Schneider-Maunoury,S; Croissant,O; Orth,G (1987): Integration of papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J. Virol* **61**, 3295-3298.
- Schoenmackers.EFPM; Kools,PFJ; Mols,R; Kazmierczak,B; Bartnitzke,S; Bullerdieck,J; Dal Cin,P; De Jong,P; Van den Berghe,H; Van de Ven,WJM (1994): Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. *Genomics* **20**, 210-222.
- Schoenmakers.EFPM; Geurts,JMW; Kools,PFJ; Mols,R; Huysmans,C; Bullerdieck,J; Van den Berghe,H; Van de Ven,WJM (1995a): A 6-Mb yeast artificial chromosome contig and long-range physical map encompassing the region on chromosome 12q15 frequently rearranged in a variety of benign solid tumors. *Genomics* **29**, 665-678.
- Schoenmakers.EFPM; Wanschura,S; Mols,R; Bullerdieck,J; Van den Berghe,H; Van de Ven,WJM (1995b): Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours. *Nature Genet.* **10**, 436-444.
- Schoenmakers.HFPM; Kools,PFJ; Kazmierczak,B; Bullerdieck,J; Claussen,U; Horsthemke,B; Van den Berghe,H; Van de Ven,WJM (1993): Isolation of a somatic cell hybrid retaining the der(16)t(12;16)(q13;p11.2) from a myxoid liposarcoma cell line. *Cytogenet. Cell. Genet.* **62**, 159-161.
- Schwarz,E; Freese,UK; Gissmann,L; Mayer,W; Roggenbyck,B; Stremlau,A; Zur Hausen,H (1985): Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**, 111.
- Seedorf,K; Oltersdorf,T; Krämmmer,G; Röwekamp,W (1987): Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16 (HPV 16) and type 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells. *EMBO. J.* **6**, 139-144.
- Shah,KV; Howley,PM (1990): Papillomaviruses. En: *Virology*. 2^a ed. (Eds: Fields,BN; Et Al.,) Raven Press, New York, 1651-1676.
- Soussi,T (1996): The p53 tumor suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Mol.Med.Today* **2**, 32-37.
- Southern,EM (1975): Detection of specific sequences among ADN fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503.
- Sozzi,G; Veronesse,ML; Negrini,M; Raffaele,B; Cotticelli,MG; Inoue,H; Tornielli,S; Pilotti,S; De Gregorio,L; Pastorino,U; Pierotti,MA; Ohta,M; Huebner,K; Croce,CM (1996): The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* **85**, 17-26.

- Stauss.MJ; Shaw.EW; Bunting.H; Melnick.JL (1949): "Crystalline" virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **72**, 46.
- Tenti.P; Romagnoli.S; Silini.E; Pellegata.NS; Zappatore.R; Spinollo.A; Zara.C; Ranzani.GN; Carnevali.L (1995): Analysis and clinical implications of K-ras gene mutations and infection with human papillomavirus types 16 and 18 in primary adenocarcinoma of uterine cervix. *Int. J. Cancer* **64**, 9-23.
- Thomas.M; Massimi.P; Jenkins.J; Bamks.L (1995): HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation. *Oncogene* **10**, 261-268.
- Tschlis.PB; Lazo.PA (1991): Tumor induction and progression by rodent and human retroviruses: insertional mutagenesis and transactivation. *Current Top. Microbiol. Immunol.* **171**, 95-171.
- Ullman.CG; Emery.VC (1996): Transforming proteins of human papillomaviruses. *Rev. Med. Virol.* **6**, 39-55.
- Unger.ER; Vernon.S; Thoms.WW; Nisenbaum.R; Spann.CO; Horowitz.IR; Icenogle.JP; Reeves.WC (1995): Human papillomavirus and disease-free in FIGO stage Ib cervical cancer. *J. Infect. Dis.* **172**, 1184-1190.
- Vande Pol.SB; Howley. PM (1990): A bobine papillomavirus constitutive enhancer is negatively regulated by E2 represor through competitive binding for a cellular factor. *J. Virol* **64**, 5420-5429.
- Van de Ven.WJM; Schoenmakers.EFPM; Wanschura.S; Kazmierczak.B; Kools.PFJ; Geurts.JMW; Bartnitzke.S; Van den Berghe.H; Bullerdiek.J (1995): Molecular Characterization of MAR, a Multiple Aberration Region on Human Chromosome Segment 12q13-q15 implicated in various solid tumors. *Genes Chromosom. Cancer* **12**, 296-303.
- van't Veer.LJ; van Kessel.AG; van Heerikhuizen.H; van Ooyen.A; Nussen.R (1984): Molecular cloning and chromosomal assignment of human homolog of int-1, a mouse gene implicated in mammary tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2532-2534.
- Vogelstein.B; Kinzler.KW (1993): The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* **11**, 138-141.
- Wang.W; Wu.W; Desai.T; Ward.DC; Kaufman.SJ (1995): Localization of the alfa7 integrin gene (ITGA7) on human chromosome 12q13: clustering of integrin and hox genes implies parallel evolution of these genes families. *Genomics* **26**, 563-570.
- Warburton.D; Gersen.S; Yu.M-T; Jackson.C; Handelin.B; Housman.D (1990): Monochromosomal rodent-human hybrids from microcell fusion of human lymphoblastoid cells containing an inserted dominant selectable marker. *Genomics* **6**, 358-366.
- Werness.BA; Levine.AJ; Howley.PM (1990): Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**, 76-79.
- Wilke.CM; Hall.BK; Hoge.A; Paradee.W; Smith.DI; Glover.TW (1996): FRA3B extends over a broad region and contains a spontaneous HPV16 integration site: direct evidence for the coincidence of viral integration sites and fragile sites. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 187-195.
- Yasumoto.S; Burkhardt.AL; Doniger.J; DiPaolo.J (1986): Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J. Virol* **57**, 572-577.

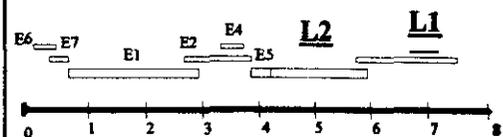
- Yukawa,K; Butz,K; Yasui,T; Kikutani,H; Hoppe-Seyler,F (1996): Regulation of human papillomavirus transcription by the differentiation-dependent epithelial factor Epc-1/skn-1a. *J. Virol* 70, 10-16.
- Zucman,J; Delattre,O; Desmace,C; Epstein,AL; Stenman,G; Speleman,F; Fletchers,DM; Aurias,A; Thomas,G (1993): EWS and ATF-1 gene fusion induced by t(12;22) translocation in malignant melanoma of soft parts. *Nature Genet.* 4, 341-345.
- zur Hausen.H (1986): Intracellular surveillance of persisting viral infections. *Lancet* ii, 489-491.
- zur Hausen,H (1991): Papillomavirus/host cell interactions in the pathogenesis of anogenital cancer. En: *Origins of Human Cancer: A Comprehensive Review.* (Eds: Brugge,J; Curran,T; Harlow,E; McCormick,F) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 685-703.
- zur Hausen.H (1994): Molecular pathogenesis of cancer of cervix and its causation by specific HPV types. *Current Top.Microbiol.Immunol.* 86, 131-156.
- zur Hausen.H; de Villiers,EM (1994): Human papillomaviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 427-447.

FE DE ERRATAS

En las páginas 12 y 45, donde dice



Debe decir:



En la página 53, figura 11 donde dice:

b) Electroforesis del producto de las digestiones del clon λ 12QHP con las endonucleasas: Hind III (1), Kpn I (2), Pst I (3) y Sac I (4). M1: λ Hind III; M2: λ Bst EII; M3; ϕ X147/ Hae III

Debe decir:

b) Electroforesis del producto de las digestiones del clon λ 12QHP con las endonucleasas: Kpn I (1), Hind III (2), Pst I (3) y Sac I (4). M1: λ Hind III; M2: λ Bst EII; M3; ϕ X147/ Hae III

En la página 66, donde dice:

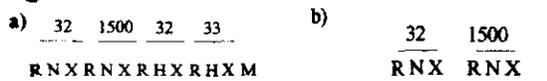
El ADN se transfirió del gel a la membrana de nylon usando la técnica de "Southern", obteniéndose en los tres clones las mismas bandas impresionadas en la autorradiografía cuando se hibridó la membrana con la sonda 500, excepto en el fragmento EcoR I del clon λ h12/1₅₀₀, que se observa una banda de menor tamaño por coincidir con el extremo del clon (Fig. 20 b y c).

Debe decir:

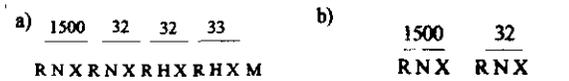
El ADN se transfirió del gel a la membrana de nylon usando la técnica de "Southern", obteniéndose en los tres clones las mismas bandas impresionadas en la autorradiografía cuando se hibridó la membrana con la sonda 500, excepto en el fragmento EcoR I del clon λ h12/1₅₀₀, que se observa una banda de mayor tamaño constituida por ADN del vector y del inserto ya que coincide con el extremo del clon (Fig. 20 b y c).

En la página 67, donde dice:

Fig. 20:



debe decir:



En la página 80, en la línea 12 donde dice:
La sonda HH (punto de recombinación 3')

Debe decir:

La sonda HH (punto de recombinación 5')

En la página 82, donde dice

Debe decir:

[3'-TGA CAA TAA TGC CAT GGA GCA G-5']

[5'-TGA CAA TAA TGC CAT GGA GCA G-3']

En la página 100, línea 16, donde dice:
13q13-15

Debe decir:

12q13q15

En la página 108, donde dice:

Debe decir:

MHGI-C

HMGI-C