



Departamento de Medicina Física y Farmacología  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Sección Medicina

Trabajo de Fin de Grado

---

**Clonaje y expresión de la proteína accesoria E2 del  
Virus del Papiloma Humano (VPH):  
*estudio de su localización y efecto sobre la división  
mitótica en un modelo celular.***

---

**Autora:** Rodríguez Dos Santos, Valeria Patricia

**Tutores:** Dr. García Luis, Jonay y Dr. Valenzuela Fernández, Agustín

Curso académico 2022-2023



# ÍNDICE

---

<b>RESUMEN/ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.....	3
1.2. SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA ACTUAL DE LA INFECCIÓN POR VPH.....	3
1.3. CLASIFICACIÓN DEL VPH .....	4
1.4. ESTRUCTURA Y MORFOLOGÍA DEL VPH.....	4
1.5. GENOMA Y PROTEÍNAS DEL VPH.....	5
1.6. CICLO VIRAL DEL VPH .....	6
1.7. PROTEÍNA VIRAL E2: FUNCIONES Y RELEVANCIA EN LA INFECCIÓN POR VPH.....	8
1.8. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS ACTUALES Y PROSPECTIVAS FRENTE AL VPH .....	9
1.8.1. Vacunas profilácticas: la proteína viral L1 como inmunógeno de elección .....	9
1.8.2. Vacunas terapéuticas: importancia de la proteína viral E como inmunógeno .....	9
1.8.3. Inhibidores moleculares pequeños ( <i>small molecular inhibitors</i> ): E2 como diana.....	10
1.9. <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> : ORGANISMO EUCARIOTA MODELO PARA EL ESTUDIO DEL VPH ..	10
1.10. CLONAJE MOLECULAR EN <i>S. CEREVISIAE</i> : ADAPTACIÓN AL MÉTODO <i>GOLDEN GATE</i> .....	11
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>13</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
4.1. SECUENCIA DE ADN DEL GEN VIRAL E2 .....	15
4.2. DISEÑO DE CEBADORES PARA PCR.....	15
4.3. CONSTRUCCIONES DE ADN VIRAL .....	16
4.4. CEPAS CELULARES EMPLEADAS EN EL ESTUDIO.....	16
4.5. MEDIOS DE CULTIVO.....	17
4.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....	17
4.7. ENSAMBLAJE DE LOS FRAGMENTOS GENÓMICOS MEDIANTE ESTRATEGIA DE <i>GOLDEN GATE</i> .....	18
4.7.1. Introducción de secuencia E2 en vector plasmídico: creación parte 3 y 3B.....	18
4.7.2. Ensamblaje de las distintas partes: creación del constructo final .....	18
4.8. TRANSFORMACIÓN EN <i>E. COLI</i> .....	19
4.9. PURIFICACIÓN DEL ADN .....	19
4.10. VERIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS GENERADOS.....	19
4.10.1. Digestión enzimática para comprobación de los fragmentos ensamblados y su orden .....	19
4.10.2. Electroforesis de ADN en gel de agarosa .....	20

4.11.	PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>S. CEREVISIAE</i> .....	20
4.12.	TRANSFORMACIÓN EN <i>S. CEREVISIAE</i> .....	20
4.13.	ANÁLISIS DE CRECIMIENTO DE <i>S. CEREVISIAE</i> POR LA TÉCNICA DE GOTEO EN PLACA. ....	21
4.14.	MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS VIRALES ....	21
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
5.1.	OPTIMIZACIÓN DE UN MODELO DE CLONAJE FUNDAMENTADO EN EL MÉTODO DE CLONAJE MODULAR DE GOLDEN GATE, PARA LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA E2 DEL VPH EN <i>S. CEREVISIAE</i> . ....	23
5.1.1.	Comprobación de cada una de las partes .....	25
5.1.2.	Rediseño del ensamblaje: de integrativo a episomal.....	25
5.1.3.	Control del empleo de concentraciones de ADN viral equivalentes.....	26
5.1.4.	Purificación del ADN plasmídico .....	27
5.2.	SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA E2 DEL VPH EN <i>S. CEREVISIAE</i> PARA ESTUDIAR SU EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO Y PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR. ....	28
5.3.	SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA E2 DEL VPH ETIQUETADA CON PROTEÍNA FLUORESCENTE EN <i>S. CEREVISIAE</i> PARA DETERMINAR SI ESTA AFECTA A LAS FUNCIONES DE E2, ASÍ COMO SU SUBLOCALIZACIÓN CELULAR. ....	30
5.3.1.	Determinar si el etiquetado de E2 con proteína fluorescente afecta a su función.....	30
5.3.2.	Determinar su sublocalización celular .....	32
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>37</b>
<b>8.</b>	<b>¿QUÉ HE APRENDIDO DE ESTE TRABAJO DE FIN DE GRADO?</b> .....	<b>37</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>39</b>

## ABREVIATURAS

---

- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- E: *early proteins*.
- L: *late proteins*.
- LCR: *long control region*; región larga de control.
- MTOC: *microtubule organizing centre*; centro organizador de los microtúbulos.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- ORF: *open reading frame*; marco abierto de lectura.
- PCR: *polymerase chain reaction*; reacción en cadena de polimerasa.
- SPB: *spindle pole body*; cuerpo polar del huso.
- TFG: Trabajo de Fin de Grado.
- VHS: Virus del Herpes Simple.
- VP: Virus del Papiloma.
- VPH: Virus del Papiloma Humano.



## RESUMEN/ABSTRACT

---

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) es la infección viral más común del aparato reproductor, siendo su asociación con el cáncer de cérvix una de las consecuencias más importantes y la cuarta neoplasia más frecuente en las mujeres en el mundo. Si bien las vacunas profilácticas proporcionan medidas preventivas contra esta infección, sigue siendo necesario el desarrollo de estrategias para tratar la infección una vez establecida, donde destaca la importancia de la caracterización molecular de proteínas accesorias del VPH como E2. Esta proteína juega un papel importante en el mantenimiento de la infección persistente de este virus, así como en el proceso de la oncogénesis, haciéndola candidata para dichos tratamientos post-infección. En el presente trabajo se ha optimizado un método de clonaje basado en la estrategia de clonaje modular *Golden Gate* para la expresión de esta proteína en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Usando este modelo, se ha estudiado el efecto de E2 sobre el crecimiento celular de *S. cerevisiae*, así como su localización subcelular. Se ha observado que la expresión de E2 en *S. cerevisiae* resulta en la inhibición de su crecimiento y esta expresión se localiza de manera focal en el núcleo, tal como se ha determinado a través de microscopía de epifluorescencia. Este modelo permitirá continuar investigando los mecanismos moleculares básicos de esta proteína de una manera rápida y versátil, que después podrán ser trasladados rápidamente a sistemas eucarióticos de mayor complejidad.

*Human papillomavirus (HPV) infection is the most common viral infection of the reproductive system, with its association with cervical cancer being one of the most significant consequences and the fourth most common neoplasm in women worldwide. While prophylactic vaccines provide preventive measures against this infection, the development of strategies to treat established infection remains necessary, with the molecular characterization of HPV accessory proteins such as E2 being of particular importance. This protein plays a crucial role in maintaining persistent infection of this virus, as well as in the oncogenic process, making it a candidate for post-infection treatments. In this study, a cloning method based on the Golden Gate modular cloning strategy has been optimized for the expression of this protein in the yeast Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae). Using this model, the effect of E2 on the cellular growth of S. cerevisiae has been studied, as well as its subcellular localization. It has been observed that the expression of E2 in S. cerevisiae results in the inhibition of its growth, and this expression is focalized in the nucleus, as determined through epifluorescence microscopy. This model will allow for further investigation of the basic molecular mechanisms of this protein in a fast and versatile manner, which can then be rapidly translated into more complex eukaryotic systems.*

**Palabras clave:** Virus del Papiloma Humano (VPH); proteína viral E2; localización celular; mitosis.

**Keywords:** Human Papilloma Virus (HPV); viral protein E2; cellular localization; mitosis.



# 1. Introducción

---

## 1.1. Antecedentes históricos de la infección por el virus del papiloma humano

Desde mediados y finales del siglo XIX, se tenían sospechas de que tanto el cáncer de cérvix, como las verrugas anogenitales, debían tener un agente etiológico de transmisión sexual (1). La primera prueba de que este debía ser un virus llega en 1907, cuando Giuseppe Ciuffo demuestra posible la transmisión de dichas verrugas mediante inoculación libre de células.

Los primeros virus del papiloma (VP) fueron identificados en conejos en 1933 (2), como causa del crecimiento de papilomas benignos. Dos años más tarde, se descubre su potencial carcinogénico (3), siendo el primer virus oncogénico animal identificado. En humanos, no fue hasta 1949 cuando se visualizaron partículas del virus del papiloma en verrugas, mediante microscopía electrónica (4).

En cuanto al cáncer de cérvix, primero se pensó que estaría asociado con el virus herpes simple 2 (VHS-2), hasta que Harald zur Hausen demostró que el VHS-2 no se encontraba en estas células cancerígenas y propuso al virus del papiloma humano (VPH) como agente causante. No solo logró demostrar esta teoría, sino que identificó los dos VP actualmente más frecuentes este tipo de cáncer (HPV16 y 18), descubrimientos que le llevaron a recibir el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 2008 (1).

## 1.2. Situación epidemiológica actual de la infección por VPH

La infección por VPH es la infección viral más común del aparato reproductor, estimándose que la mayoría de los hombres y mujeres sexualmente activos contraerán esta infección, al menos, una vez en su vida, y posiblemente en repetidas veces. Más del 90% de las personas infectadas eventualmente eliminan el virus, pero en aquellas en las que prevalece, y según diversos factores, el VPH puede dar lugar al desarrollo de verrugas cutáneas y anogenitales, y en los peores casos, distintos tipos de cáncer, como son el cáncer de cérvix, ano, vulva, vagina y pene, así como otros de cabeza y cuello (de boca, amígdalas, faringe y laringe) (5,6).

El cáncer de cérvix representa la patología más importante causada por este virus, pues es la cuarta neoplasia más frecuente en mujeres en el mundo, con aproximadamente 604.000 casos nuevos y 342.000 muertes atribuibles en 2020. Cabe destacar que, de dichos fallecimientos, un 90% ocurrieron en países de bajos y medianos ingresos (7). En España, se estimó en 2020, aproximadamente, unos 2000 nuevos casos diagnosticados (8).

Ante esta problemática, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2020 lanza una estrategia mundial para la eliminación del cáncer de cérvix. En esta se propone que se considerará eliminado en

un país cuando haya una tasa de incidencia menor a cuatro casos diagnosticados por 100.000 mujeres al año, y para ello se establecen unos objetivos denominados 90-70-90: vacunar al 90% de mujeres antes de los 15 años, realizar al menos dos pruebas de cribado en el 70%, y que llegue un adecuado tratamiento al 90% (5). A pesar de ello, entre 2019 y 2021, la cobertura de la primera dosis de la vacuna contra el VPH se redujo de un 25% a un 15% (9). Además, según un estudio realizado a nivel global en 2014, 118 millones de mujeres siguieron la pauta de vacunación, pero solo un 1% pertenecían a países de bajo y medianos ingresos (10), lo que demuestra que aún queda un largo camino por recorrer.

### 1.3. Clasificación del VPH

Los VP se clasifican en tipos fundamentalmente según el huésped al que infectan (p. ej.: humano = H, bovino = B, etc.) y las secuencias del genoma viral, en concreto, refiriéndose a la secuencia del gen L1 viral. Así, se denomina un nuevo tipo viral cuando la secuencia del gen L1 de este difiere en >10% de la secuencia del gen al tipo viral más cercano de referencia. Los géneros se denominan con letras griegas como prefijos y la terminación *papillomavirus* (ej: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, etc.), y se encuentran dentro del mismo género aquellos que tienen un 60% de similitud en el gen L1. Finalmente, las especies virales dentro de un mismo género se asignan por número, y pertenecen a la misma especie los virus que tienen entre un 71-89% de similitud en el gen L1 (11).

En la nomenclatura clásica, los tipos virales del VP se enumeraban a medida que se iban caracterizando, es por esto que el actualmente conocido como VPH16, pertenece a la especie *Alphapapillomavirus 9*, junto con otros como el VPH31, VPH33, VPH35, etc. Esto tiene relevancia clínica en tanto que se ha observado que una vacuna que protege frente a la infección por VPH16 y la patología asociada, por ejemplo, tiene cierta protección cruzada frente a otros VPH de la misma especie, como el VPH31 (12).

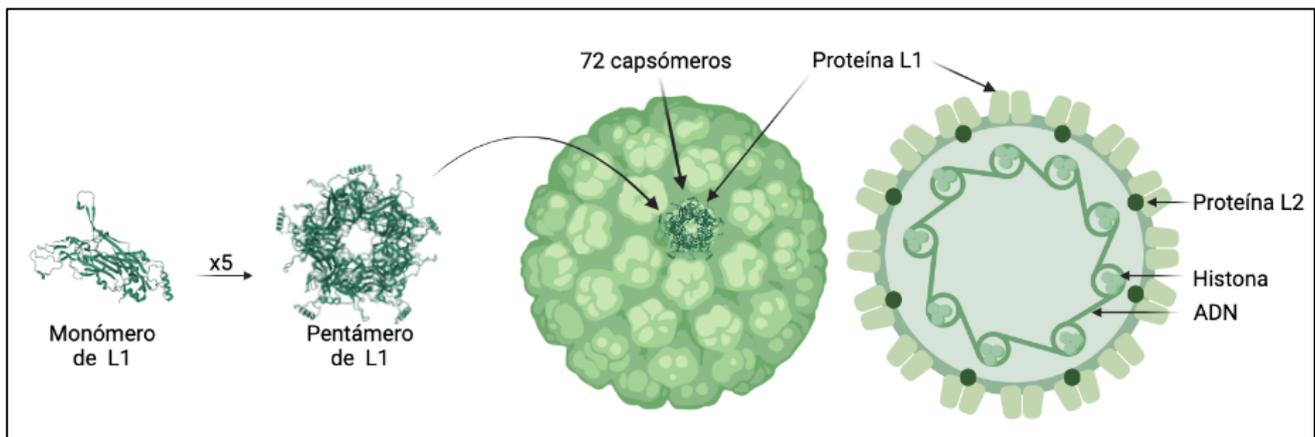
Resumiendo, actualmente los VPH pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, la cual contiene hasta el año 2023, 52 géneros, 132 especies y 229 tipos (13). Clínicamente, los VPH que infectan el tracto genital están dentro del género *Alphapapillomavirus*, y se dividen en alto riesgo y bajo riesgo según su potencial oncogénico (14).

### 1.4. Estructura y morfología del VPH

La familia de VPH comparte una estructura icosaédrica sin envoltura de entre 50 a 60 nm de diámetro. La cápside contiene 360 moléculas de la proteína L1, organizadas en pentámeros que forman en total 72 capsómeros (**Figura 1**). A estos capsómeros se les asocia internamente la proteína L2 del

virus, en relación 1/30 respecto a la proteína L1 (15). Es destacable que la proteína más abundante, L1, contiene en sus principales regiones expuestas bucles de aminoácidos hipervariables que han divergido entre los distintos tipos de VPH, dando como resultado que los anticuerpos que se generan contra un tipo de VPH se unan muy poco a otros tipos, lo cual explica la limitada protección cruzada de las vacunas profilácticas actuales (16).

Dentro de la cápside se ubica el genoma viral, que está constituido por ADN de doble cadena circularizado asociado a histonas (16).



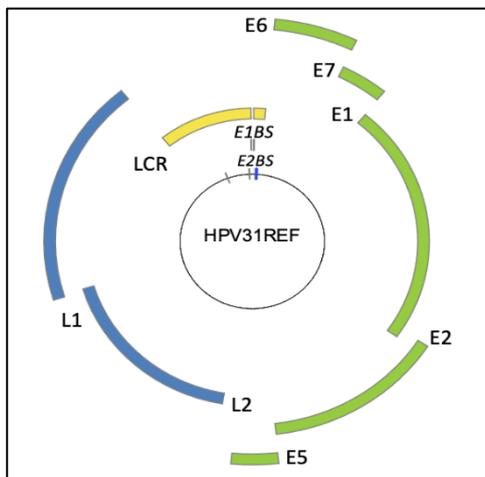
**Figura 1. Esquema de la estructura y morfología del virión VPH.** La proteína L1 se asocia formando 72 pentámeros, también llamados capsómeros, que forman la parte externa de la cápside. La proteína L2 se asocia internamente a L1, y en el interior de la proteína se encuentra el ADN de doble cadena asociado a histonas. Imágenes de la proteína obtenidas con el programa Mol\* (17), PBD ID: 1DZL. Esquema creado con BioRender.com.

## 1.5. Genoma y proteínas del VPH

El genoma de los papilomavirus está compuesto por aproximadamente 8.000 pares de bases, con entre ocho y nueve marcos de lectura abiertos (ORFs, *open reading frames*) y una región larga de control (LCR, *long control region*). Aunque el tamaño del genoma sea pequeño, el número de proteínas codificadas es mayor, debido a que la expresión génica implica el uso de múltiples promotores y patrones complejos de *splicing* alternativo (16).

Los marcos de lectura se agrupan en genes de expresión temprana (E, *early*) y genes de expresión tardía (L, *late*). Los genes E1 y E2, involucrados en la replicación y expresión del genoma viral, están conservados en todos los papilomavirus, así como los genes L1 y L2, que codifican las proteínas estructurales. En cambio, hay una mayor diversidad en el resto de los genes (E4, E5, E6, y E7), que tienen funciones como la evasión a la respuesta inmunitaria, la liberación de los viriones nacientes y la regulación del ciclo celular (16). Algunos papilomavirus contienen además ORF para las proteínas E3 y E8. En cuanto a la región LCR, se trata de una región no codificante que contiene elementos de respuesta para factores de transcripción celulares y para las proteínas virales E1 y E2 (18) (Figura 2).

Asimismo, dos promotores, uno temprano y otro tardío, regulan la expresión génica viral y se activan según la etapa del ciclo viral para la expresión de los distintos genes, como se explica en el siguiente apartado.



**Figura 2. Diagrama del genoma del VPH tipo 31.** En color azul se muestran las regiones que codifican para las proteínas estructurales (Late). En verde para las proteínas no estructurales (Early). En amarillo la región larga de control (LCR). E1BS y E2BS son sitios de unión para E1 y E2, respectivamente. Imagen extraída de la base de datos PaVE: The Papillomavirus Episteme (11).

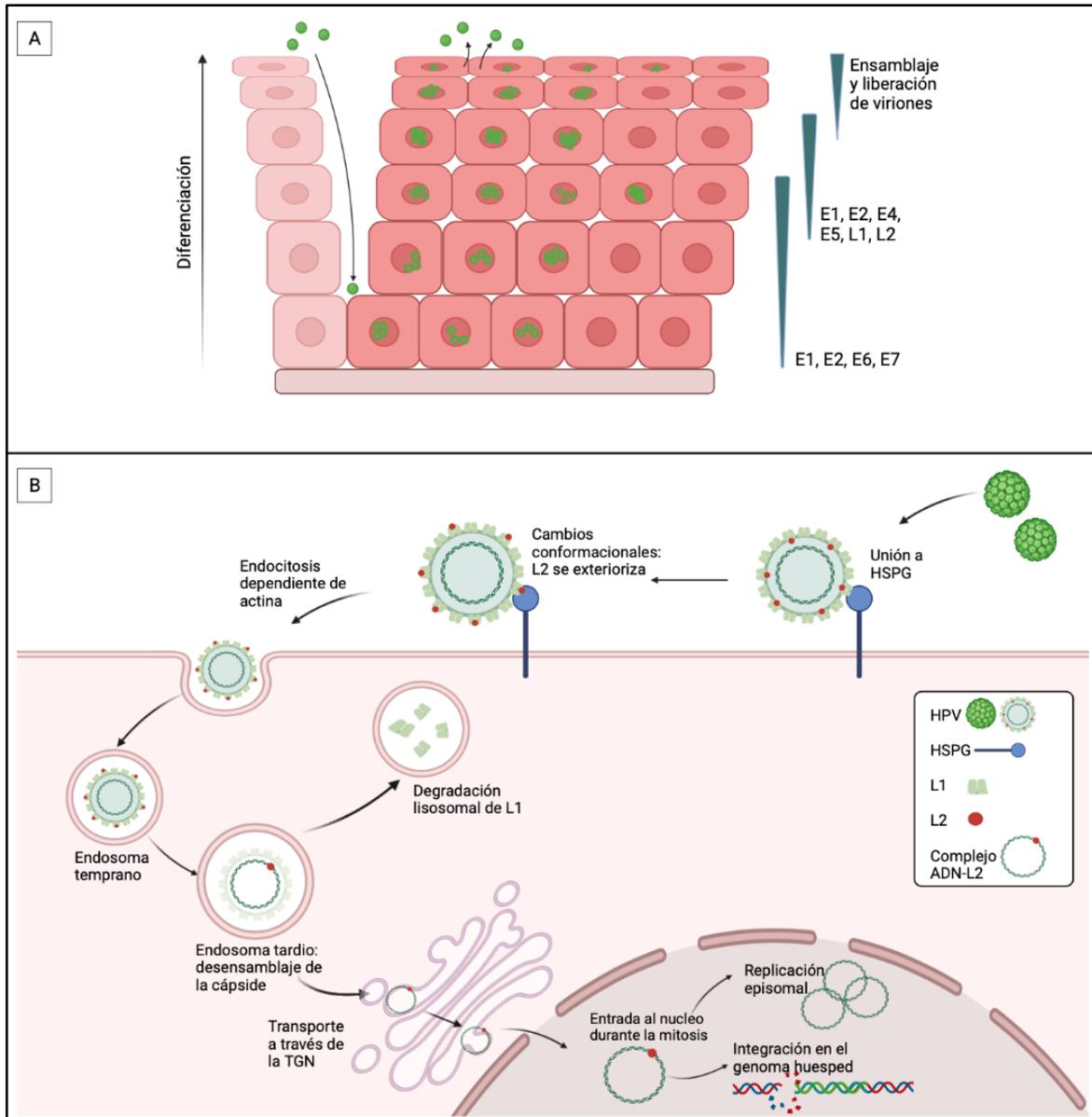
## 1.6. Ciclo viral del VPH

El VPH se transmite mediante el contacto de la piel o mucosas, siendo la vía principal de contagio la sexual, y el área genital con mayor riesgo de persistencia del virus el cuello del útero. Esto es así porque en el cérvix hay una zona llamada zona de transformación, formada por epitelio escamoso metaplásico, que es susceptible de evolucionar a epitelio displásico en presencia del virus, y ser infectado (19).

El ciclo de vida del VPH está relacionado con la diferenciación del epitelio escamoso infectado. El VPH infecta las células más basales, expuestas a través de microlesiones. En estas células, el VPH se establece de forma episomal, y la activación del promotor temprano da lugar a la expresión de genes tempranos (E1, E2, E6, E7) y al inicio de la replicación (20). A medida que las células basales infectadas se dividen, el ADN viral acompaña a las células hijas, que van a migrar y diferenciarse progresivamente. La diferenciación epitelial conlleva a la activación del promotor tardío, con la expresión de genes tardíos (E4, E5, L1, L2), así como altos niveles de E1 y E2 que impulsan la amplificación del genoma viral a miles de copias por célula. En las capas superiores y más diferenciadas es donde ocurre el ensamblaje y la liberación de los viriones (20) (**Figuras 3A y 3B**).

Las células epiteliales normales saldrían del ciclo celular tras la diferenciación (dejarían de dividirse), pero las proteínas E6 y E7 desregulan los puntos de control del ciclo celular. E7 promueve la degradación de la proteína de retinoblastoma (pRb), que provoca la reentrada de las células en la

fase S del ciclo celular, mientras que E6 degrada la proteína supresora de tumores p53, con lo cual tampoco ocurre la apoptosis, perpetuando la inmortalidad celular y dando lugar al inicio de un proceso neoplásico (21).



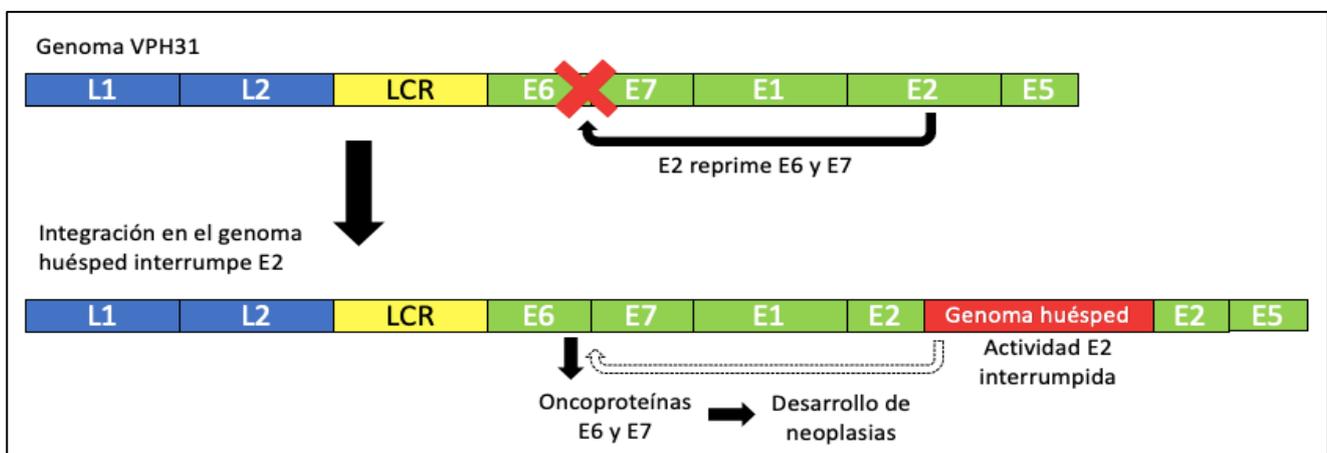
**Figura 3. (A). Relación entre la diferenciación epitelial y la expresión de las distintas proteínas accesorias del VPH.** El VPH infecta las células basales a través de microlesiones. Las primeras proteínas en expresarse son E1, E2, E6 y E7, involucradas en el inicio y mantenimiento de la replicación. Con la diferenciación de las células y activación del promotor tardío, se empiezan a expresar otras proteínas como E4 y E5, que también contribuyen a la replicación, y las proteínas de la cápside, L1 y L2, para el reensamblaje de los viriones que se liberarán en las capas superficiales con la descamación del epitelio. Basado en: Mac M, Moody CA. Epigenetic regulation of the human papillomavirus life cycle. Vol. 9, Pathogens. MDPI AG; 2020 (20). **(B) Ciclo de vida del VPH en célula.** La unión del HPV a la célula se produce por interacción de L1 y HSPG, produciéndose cambios conformacionales en la cápside tras los que L2 se externaliza y se une a un receptor secundario facilitando la endocitosis, mediada por actina. En el endosoma tardío ocurre el desmontaje de la cápside, disociándose las proteínas L1 y L2. La proteína L2 se mantiene asociada al genoma viral, y este complejo viaja a la TGN y finalmente al núcleo durante la ruptura de la envoltura nuclear en la mitosis. El virus inicia la replicación de forma episomal, pudiendo integrarse en el genoma huésped tras la infección persistente. Basado en: Gheit T. Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. Vol. 9, Frontiers in Oncology. Frontiers Media S.A.; 2019. (22). HSPG: proteoglicanos de heparán sulfato. TGN: Trans-Golgi Network. Esquemas creados con BioRender.com.

### 1.7. Proteína viral E2: funciones y relevancia en la oncogénesis de la infección por VPH

La proteína E2 está formada por un dominio N-terminal de transactivación, y un dominio C-terminal de unión al ADN, ambos conectados por una secuencia bisagra o *hinge* cuya longitud y secuencia varía entre los distintos tipos de VPH (23).

En el apartado 1.5 se ha visto que, dentro de la región LCR, se encuentran sitios de unión para esta proteína E2. Esto es importante porque estos sitios de unión permiten a E2 activar o reprimir la transcripción, siendo la principal proteína reguladora de la transcripción viral en el VPH (23). En concreto, se sabe que E2 reprime la transcripción de E6 y E7, principales oncogenes responsables del desarrollo de neoplasias asociadas al VPH. Cuando el genoma viral se integra en el de las células huésped (proceso que se ha visto hasta en 83% de muestras de cáncer de cérvix según un estudio molecular (24)), esto lleva frecuentemente a la interrupción de la secuencia del gen E2, causando la pérdida de la represión sobre la transcripción de E6 y E7 (21) (Figura 4).

Otras funciones de E2 incluyen el inicio de la replicación junto con E1 y el mantenimiento del genoma viral a lo largo de las mitosis de las células huésped. Es decir, que E2 es indispensable para el mantenimiento de la infección persistente. Por otro lado, se ha observado que E2 inhibe el crecimiento en algunas líneas celulares VPH-negativas, aunque el mecanismo implicado aún no se conoce con exactitud, añadiéndole importancia a su estudio (23,25).



**Figura 4. Relación entre E2 y las oncoproteínas E6 y E7.** La proteína E2 regula la transcripción de las proteínas E6 y E7, reprimiéndola en condiciones normales. La integración del HPV en el genoma huésped generalmente interrumpe el gen E2, dando lugar a que la transcripción de E6 y E7 se vea activada y finalmente favorezca el desarrollo de neoplasias. Imagen basada en: Pal A, Kundu R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. Vol. 10, *Frontiers in Microbiology*. 2020 (21).

## 1.8. Estrategias terapéuticas actuales y prospectivas frente al VPH

### 1.8.1. Vacunas profilácticas: la proteína viral L1 como inmunógeno de elección

Actualmente, las vacunas profilácticas conforman un pilar fundamental en la prevención de la infección del VPH. Estas se desarrollan a base de “partículas similares a virus” (VLP, *Virus-like particle* en inglés) portando en su superficie la proteína recombinante L1 de la cápside viral. Existen tres vacunas con este diseño comercializadas y que se diferencian principalmente por los distintos tipos de VPH que cubren o que protegen frente a ellos (**Tabla 1**) (26). Entre sus limitaciones están que no actúan sobre las células infectadas con VPH, y que a nivel global tienen una cobertura deficiente.

**Tabla 1. Tipos de vacunas profilácticas recombinantes frente al VPH**

Nombre comercial	Protección <sup>a</sup>	Año de aprobación FDA <sup>b</sup>
Gardasil	VPH6, 11, 16 y 18	2006
Cervarix	VPH16 y 18	2009
Gardasil 9 <sup>c</sup>	VPH6, 11, 16 y 18, 31, 33, 45, 52, 58	2014

<sup>a</sup>Contienen combinaciones de proteínas recombinantes L1 de los tipos virales VPH indicados confiriendo protección frente a ellos y cruzada frente a otros tipos del VPH.

<sup>b</sup>FDA (“Food and Drug Administration”), siglas de la “Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos”.

<sup>c</sup>Gardasil 9 es una vacuna que está indicada para niños/as y adolescentes a partir de los 9 años de edad y adultos.

### 1.8.2. Vacunas terapéuticas: importancia de la proteína viral E como inmunógeno

Existe una corriente en la investigación del tratamiento de lesiones asociadas al VPH que son las vacunas terapéuticas, algunas de ellas en ensayos clínicos. A diferencia de las vacunas profilácticas, que llevan a la producción de anticuerpos, estas buscan estimular la inmunidad mediada por células, de forma que se pueda actuar sobre las células infectadas por el VPH. Así, en vez de desarrollarse contra L1, que desaparece durante la integración del genoma al huésped, estas se dirigen a las proteínas E (21,27). Algunos ejemplos de ellas que han presentado resultados prometedores son (28):

- GX-188E: una vacuna terapéutica basada en ADN diseñada para expresar las proteínas de fusión E6 y E7, con el fin de aumentar la presentación de estos antígenos del VPH por parte de las células dendríticas. En 2020, en fase II de ensayo clínico, se obtuvo un 67% de regresión de lesiones NIC 3 (neoplasia intraepitelial cervical escamosa 3; *esta lesión no cancerosa se identifica en una biopsia de cuello uterino. Si no se trata, a veces, se vuelve cancerosa y se disemina al tejido normal cercano*) a las 8 semanas de su inyección, con 77% de aclaramiento del VPH (29).

- MVA E2: es un vector *vaccinia Ankara* modificado (MVA) que codifica la proteína E2 del HPV16. Se administró localmente una vez por semana durante 6 semanas, en un ensayo clínico de fase III en mujeres con NIC 1-3, donde el 89,3% mostró una eliminación completa de la lesión y el ADN del VPH fue indetectable en el 83% (30).

### 1.8.3. Inhibidores moleculares pequeños (*small molecular inhibitors*): E2 como diana terapéutica

Debido a que E2 juega un papel importante en el mantenimiento episomal, en la transcripción y en la replicación viral, se están estudiando inhibidores moleculares para impedir la interacción entre E2 y otras proteínas de las células huésped. Esta aproximación podría ser una estrategia terapéutica eficaz para eliminar la infección persistente, aunque sólo útil cuando no se haya producido aun la integración en el genoma huésped (fases tempranas de la infección) (27).

## 1.9. *Saccharomyces cerevisiae*: organismo eucariota modelo para el estudio del VPH

La vacuna Gardasil, mencionada anteriormente, se produce en la levadura de cerveza *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), lo cual da una pista inicial sobre la potencialidad de esta levadura en la clínica (31). En la investigación, este organismo eucariota se ha utilizado durante años como un organismo modelo que ha permitido el estudio de procesos biológicos de eucariotas superiores (32).

*S. cerevisiae* es un organismo unicelular con aproximadamente 6.000 genes, de los cuales más del 40% comparten secuencias conservadas con genes humanos. Presenta un ciclo de vida tanto sexual como asexual, y puede mantenerse con material genético de forma haploide o diploide. En laboratorio, generalmente se mantienen de forma haploide a través de crecimiento asexual, pudiendo tener un genotipo MATa o MAT $\alpha$  (en este trabajo solo se usan cepas haploides con genotipo MATa, ver en material y métodos) (32).

Funciones celulares determinantes como son la proliferación celular y regulación del ciclo celular, transporte están conservados entre esta levadura y eucariotas superiores. El tener un genoma mucho más pequeño y aun así conservar secuencias y funciones, implica la ventaja de poder hacer aproximaciones de mecanismos moleculares evitando la complejidad de los sistemas eucarióticos de mayor nivel. Otras ventajas a nivel práctico son que presentan un tiempo de crecimiento rápido (tiempo de duplicación de 3-5h) y facilidad de cultivo en el laboratorio, así como de modificación genética (32,33).

En cuanto al estudio de virus y proteínas virales, el uso de levaduras también presenta beneficios: por un lado, las levaduras tienen sus propios virus, y, por otro lado, diversos virus ARN y ADN humanos se han demostrado capaces de replicarse en estos organismos (32), como es el caso del VPH (34). Esto supone una ventaja relevante en cuanto al VPH, pues es un virus que no se propaga en cultivos celulares convencionales ya que solo lo hace en células diferenciadas, que requieren un cultivo más complejo.

### 1.10. Clonaje molecular en *S. cerevisiae*: adaptación al método *Golden Gate*

El clonaje molecular consiste en un conjunto de métodos cuyo objetivo es introducir un gen de interés en un vector plasmídico, y este a su vez en un organismo receptor que sea capaz de replicarlo y de expresar la proteína codificada por dicho gen. Una vez expresada se puede estudiar sus mecanismos moleculares o proceder a la purificación de la proteína expresada como se comenta en el apartado 1.9.

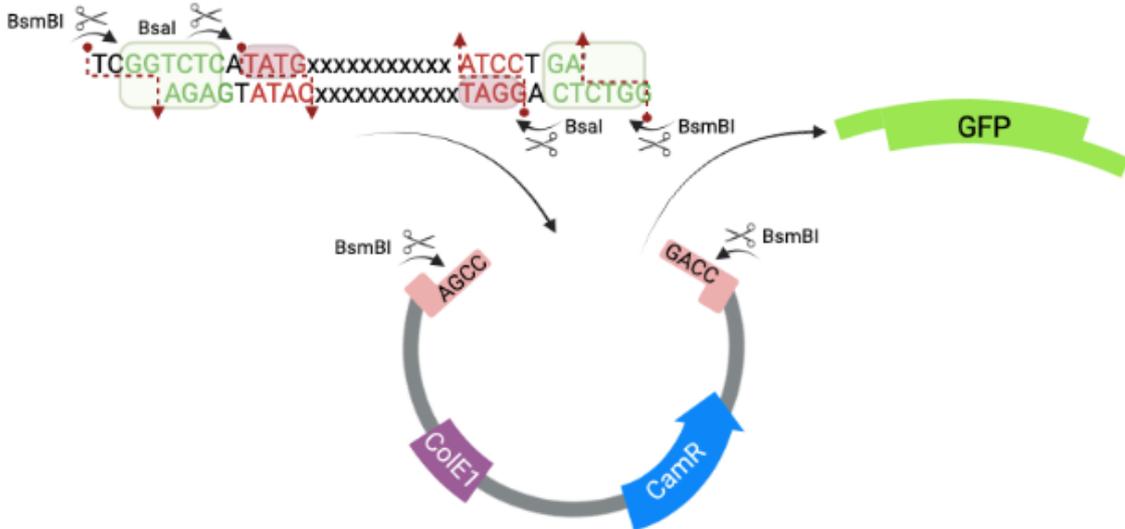
Existen diversos métodos para el clonaje de ADN, y entre ellos se encuentran los métodos basados en el ensamblaje *Golden Gate*, que se caracteriza por el uso de enzimas de restricción tipo IIS (35). Estas enzimas cortan por fuera de la secuencia que reconocen, y dan lugar a extremos cohesivos que facilitan el ensamblaje de múltiples fragmentos de ADN, simultáneamente, en un orden lineal definido. Basándose en este método, Weber *et al.* (36) crean un sistema de clonaje modular (*MoClo*), que consiste en que, a partir del uso de estas enzimas, se crean unas partes o módulos (parte promotor, parte terminador, etc.) que se caracterizan por tener secuencias de ADN con terminaciones (*overhangs*) específicas, de manera que puedan ser usadas intercambiabilmente para el diseño de plásmidos. Para poder usarlo en *S. cerevisiae*, Lee *et al.* (37) crearon una librería/kit de partes compatibles con su expresión en esta levadura, además de las indicaciones para crear nuevas que sean adaptables.

Este clonaje modular adaptado a *S. cerevisiae*, consiste en 8 tipos de partes, que incluyen principalmente: un promotor, secuencia codificante, terminador, un marcador de selección para la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) y otro marcador de selección para *S. cerevisiae*. Puede adaptarse para que este ADN recombinante se integre en el genoma de la levadura, se mantenga en forma de plásmido episomal centromérico o como plásmido episomal replicativo (basado en el plásmido de 2 micras de *S. cerevisiae*). Algunas de las partes se subdividen para añadir marcajes de fluorescencia (p. ej.: Venus, mCherry...). Las enzimas de restricción predeterminadas para este sistema son BsmBI para crear partes nuevas, y BsaI para el corte y ensamblaje del constructo final deseado (37). En la siguiente página se muestra este modelo de manera esquemática (**Figura 5**).

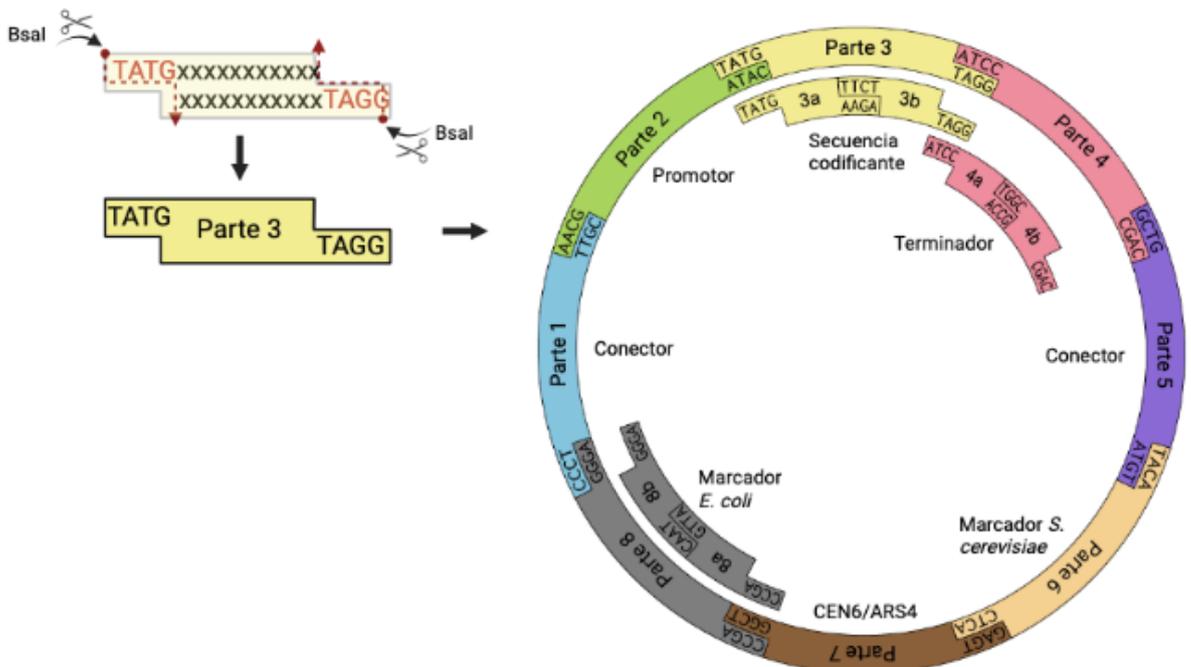
- 1 Adaptar la secuencia añadiendo extremos (overhangs) con sitios de reconocimiento para BsmBI, BsaI, y las terminaciones de la parte específica.



- 2 Cortes con BsmBI → Crear una parte: secuencia deseada + vector de entrada (ColE1, CamR, GFP)



- 3 Cortes con BsaI → Crear constructo: Ensamblaje de varias partes



**Figura 5. Clonaje modular basado en Golden Gate y adaptado a *S. Cerevisiae*.** Se resume el método en tres pasos: 1. Mediante PCR y el diseño de primers adecuados, amplificar la secuencia de ADN deseada con extremos adaptables al sistema. 2. Digestión y ligamiento del producto del primer paso para introducirlo en un vector de entrada y así crear una “parte”. 3. Digestión y ligamiento de las distintas partes en un solo constructo. Imagen creada con BioRender.com, basada en: Lee ME, DeLoache WC, Cervantes B, Dueber JE. A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. *ACS Synth Biol.* 2015 Sep 18;4(9):975–86. (37).

## 2. Hipótesis

---

El presente trabajo de fin de grado (TFG) plantea las siguientes hipótesis principales a demostrar:

- a. El clonaje y expresión de la proteína accesoria E2 del Virus del Papiloma Humano (VPH) en *S. cerevisiae* permite el desarrollo de un modelo de estudio de dianas conservadas, y crea un marco biológico controlado para analizar la función proviral de la proteína E2 y la patogenia asociada a su función en la infección por el VPH.
- b. Los sistemas de clonaje modular son una potencial herramienta, simple y versátil, para el estudio funcional y molecular de proteínas virales.

## 3. Objetivos

---

Las dos hipótesis principales de estudio se abordan mediante el desarrollo de los siguientes objetivos principales de trabajo:

- a. Optimizar un modelo de clonaje basado en el método de clonaje modular de *Golden Gate*, para la expresión de la proteína E2 del VPH en *S. cerevisiae*.
- b. Sobreexpresar la proteína E2 del VPH en *S. cerevisiae* para estudiar su efecto sobre el crecimiento y progresión del ciclo celular.
- c. Sobreexpresar la proteína E2 del VPH etiquetada con proteína fluorescente en *S. cerevisiae* para determinar si esta afecta a las funciones de E2, así como su sublocalización celular.



## 4. Material y métodos

### 4.1. Secuencia de ADN del gen viral E2

A continuación, se indica la secuencia de ADN del gen viral E2 del VPH que se ha utilizado para expresar la proteína viral E2, que pertenece al serotipo de alto riesgo VPH-31. Se han optimizado codones para favorecer su expresión en *S. cerevisiae*:

```
5'-ATGGAACTTTGTCTCAAAGATTGAATGTTTGTCAAGATAAAATTTTGGAACATTATGAAAATGATTCTA
AAAGATTGTGTGATCATATTGATTATTGGAAACATATTAGATTGGAATGTGTTTTGATGTATAAAGCTAGA
GAAATGGGTATTCACTTCTAATTAATCATCAAGTTGTTCCAGCTTTGTCTGTTTCTAAAGCTAAAGCTTTGCAA
GCTATTGAATTGCAAATGATGTTGGAACTTTGAATAATACTGAATATAAAAAATGAAGATTGGACTATGCA
ACAACTTCTTTGGAATTGTATTGACTGCTCCAAGTTGTTGAAAAACATGGTTATACTGTTGAAGT
TCAATTTGATGGTGATGTTTATAATACTATGCATTATACTAATTGGAAATTTATTTATTTGTGTATTGATGGT
CAATGACTGTTGTTGAAGGTCAAGTTAATTGTAAAGGTATTTATTATGTTTCATGAAGGTCATATTACTTAT
TTTGTTAATTTTACTGAAGAAGCTAAAAAATATGGTACTGGTAAAAAATGGGAAGTTCATGCTGGTGGTCA
AGTTATTGTTTTCCAGAATCTGTTTTTCTTCTGATGAAATTTCTTTTGCTGGTATTGTTACTAAATTGCCA
ACTGCTAATAATACTACTACTTCTAATTCTAAAAGTTGTGCTTTGGGTACTTCTGAAGGTGTTAGAAGAGCT
ACTACTTCTACTAAAAGACCAAGAAGTGAACCAGAACATAGAAATACTCATCATCAAATAAAATTGTTGAG
AGGTGATTCTGTTGATTCTGTTAATTGTGGTGTATTTCTGCTGCTGCTTGTACTAATCAAAGTACTGTT
TCTTGCTCCAGCTACTACTCCAATTATTCATTTGAAAGGTGATGCTAATATTTTGAAGTGTGAGATATAGA
TTGCTAAATATAACAATTGTATGAACAAGTTTCTTCTACTTGGCATTGGACTTGTACTGATGGTAAACAT
AAAAATGCTATTGTTACTTTGACTTATATTTCTACTTCTCAAAGAGATGATTTTTTGAATACTGTAAAATTC
CAAATACTGTTTCTGTTTCTACTGGTTATATGACTATTTAG - 3'
```

### 4.2. Diseño de cebadores para PCR

Los cebadores para las PCR se han diseñado con una herramienta en línea de diseño de cebadores (38) con los extremos correspondientes para hacer de E2 una parte 3 y otra parte 3B según el método de clonaje de Golden Gate (37), tal y como se exponen a continuación en la **Tabla 2**:

**Tabla 2. Cebadores para las PCR.**

<b>E2 Parte 3</b>	<b>Forward</b> 5'-GCATCGTCTCATCGGTCTCATATGGAACTTTGTCTCAAAGATT-3'
	<b>Reverse</b> 5'-ATGCCGTCTCAGGTCTCAGGATCCAATAGTCATATAACCAGTAGAAAC-3'
<b>E2 Parte 3b</b>	<b>Forward</b> 5'-GCATCGTCTCATCGGTCTCATTCTATGGAACTTTGTCTCAAAGATT-3'
	<b>Reverse</b> 5'-ATGCCGTCTCAGGTCTCAGGATCCAATAGTCATATAACCAGTAGAAAC-3'

Color azul: sitio de reconocimiento de BsmBI.

Color verde: sitio de reconocimiento de BsaI.

Color rojo: terminaciones específicas de las partes.

### 4.3. Construcciones de ADN viral

Para adaptar E2 al clonaje modular se diseñaron “plásmidos parte”, como se indican en la **Tabla 3**:

**Tabla 3. Plásmidos parte**

Nombre	Descripción
E2 – Parte 3	pYTK001* + E2 con extremos 5' y 3' de parte 3
E2 – Parte 3b	pYTK001* + E2 con extremos 5' y 3' de parte 3b

\*Plásmido vector de entrada del kit de clonaje modular (37).

Con estos plásmidos y el resto de las partes provistas por el kit de clonaje modular (37) se construyeron los ensamblajes que se transformarían en levadura, tal y como se muestra en la **Tabla 4**:

**Tabla 4. Ensamblajes**

Nombre	Descripción
pE2	CEN6/ARS4, Gal1-E2-tADH1, URA3, AmpR-ColE1
pE2-Venus	CEN6/ARS4, Gal1-E2-Venus-tADH1, URA3, AmpR-ColE1
pVenus-E2	CEN6/ARS4, Gal1-Venus-E2-tADH1, URA3, AmpR-ColE1

### 4.4. Cepas celulares empleadas en el estudio

- *Escherichia coli*:

**Tabla 5. Cepas de E. Coli**

Nombre	Origen	Genotipo
Stbl3	Invitrogen	F <sup>-</sup> <i>mcrB mrrhsdS20</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>xyl-5 λ leumtl-1</i>

- *Saccharomyces cerevisiae*:

**Tabla 6. Cepas de S. Cerevisiae**

Nombre	Origen	Genotipo
AS499	Laboratorio de Luis Aragón	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 bar1-Δ</i>
W303	Laboratorio de Luis Aragón	<i>MATa ade2-1 trp1Δ2 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52</i>
Gal1-E2 (1-6)*	Este trabajo	{AS499} + pE2
Gal1-E2-Venus (1-3)*	Este trabajo	{W303} + pE2-Venus
Gal1-Venus-E2 (1-3)*	Este trabajo	{W303} + pVenus-E2

\*Los números entre paréntesis representan las colonias independientes de *S. cerevisiae* que se seleccionaron tras los clonajes, que se reflejan en los resultados.

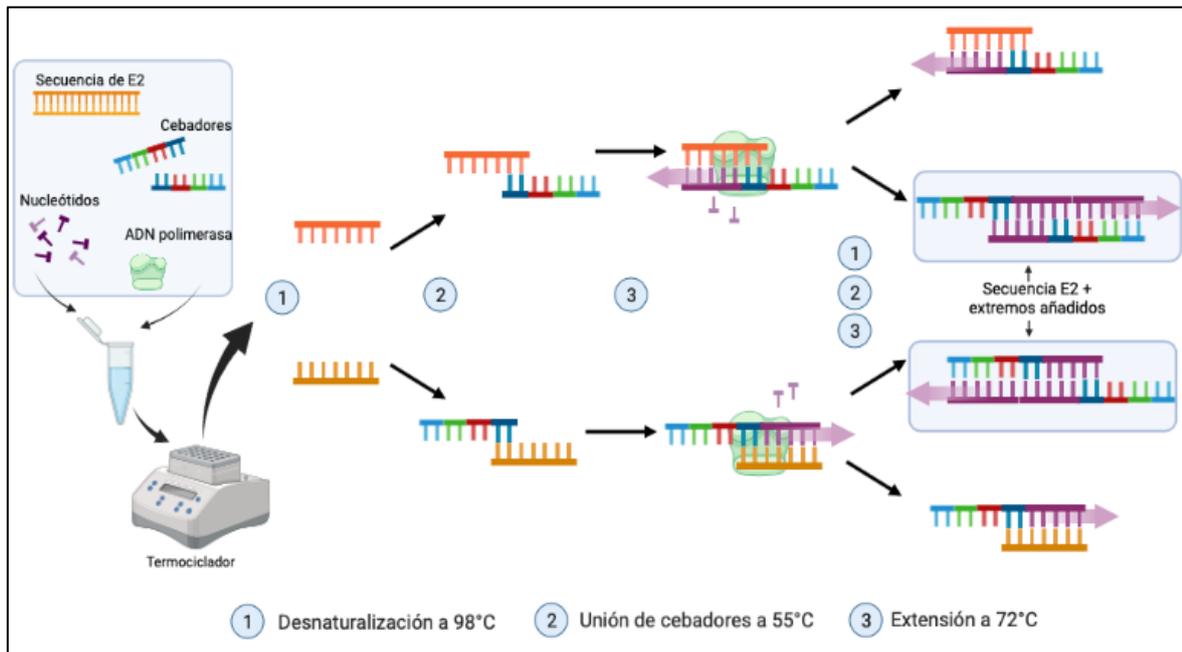
#### 4.5. Medios de cultivo

- Para bacterias:
  - Caldo de Lisogenia (LB): en un matraz estéril se mezclaron 10 g de triptona, 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 950 ml de agua. Para la preparación de placas de cultivo se añadió a la mezcla anterior 15 g/L de agar. Se ajustó el pH de la mezcla a 7.0 y se autoclavó 20 min a 1 atmósfera. Dependiendo de las resistencias de los constructos se añadieron los antibióticos pertinentes: ampicilina (100 µg/ml), cloranfenicol (20 µg/ml) o kanamicina (50 µg/ml).
- Para levaduras:
  - Medio mínimo sintético -URA: se preparó mezclando en un vaso de precipitado 6,7 g de base de nitrógeno de levadura (Sigma), 1,37 g de drop-out de aminoácidos (-Ade, -His, -Leu, -Trp, -Ura) (US Biological) y se completó con agua hasta 1 L. Para la preparación de placas de cultivo además se añadió a la mezcla anterior 20 g de agar. Se autoclavó 20 min a 1 atmósfera. Las fuentes de carbono usadas fueron glucosa, galactosa o rafinosa al 2%. Antes de usar el medio se terminó de suplementar con 0.02 mg/ml de adenina, 0.02 mg/ml de Histidina, 0.03 mg/ml de Leucina y 0.02 mg/ml de Triptófano.
  - Medio rico (YPD): se preparó mezclando en un vaso de precipitado 20 g de peptona, 10 g de extracto de levadura y se completó con agua hasta 1 L. Para la preparación de placas de cultivo se añadió a la mezcla anterior 15 g de agar. Se autoclavó 20 min a 1 atmósfera. Las fuentes de carbono usadas fueron glucosa, galactosa o rafinosa al 2%.

#### 4.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Mediante la PCR, se obtuvo la secuencia de E2 con los extremos deseados para adaptarla a los siguientes experimentos (**Figura 6**).

La PCR se ha realizado con el kit de ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion de Thermo Scientific. En un microtubo Eppendorf estéril para cada reacción se añadieron 10 µL de *buffer* HF 5X Phusion, 1 µL de dNTPs (nucleótidos dATP, dGTP, dCTP y dTTP a 10 mM cada uno), 2,5 µL de cada cebador (a 10 µM cada uno), 1 µL de la secuencia molde, 0,5 µL de la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion, y se completa con agua hasta llegar a los 50 µL. Posteriormente, se colocaron en el termociclador según el siguiente programa: un primer ciclo de desnaturalización inicial (98°C por 30 s), 25 ciclos de desnaturalización, unión del cebador y extensión (98°C por 10 s, 55°C por 30 s y 72°C por 30 s), una extensión final (72°C por 10 min) y se finaliza con +4°C.



**Figura 6. Reacción en cadena de polimerasa.** Esta técnica permite la obtención de un gran número de copias de una secuencia inicial (E2), además de modificarla, mediante el uso de cebadores con extremos sobresalientes, dando como resultado una secuencia final adaptable al método de clonaje Golden Gate. Imagen creada con BioRender.com.

## 4.7. Ensamblaje de los fragmentos genómicos virales mediante estrategia de Golden Gate

### 4.7.1. Introducción de secuencia E2 en vector plasmídico: creación parte 3 y 3B

Se preparó en un microtubo Eppendorf estéril para cada reacción: 1  $\mu\text{L}$  del vector de entrada, 1  $\mu\text{L}$  del producto de PCR, 1  $\mu\text{L}$  de ADN ligasa T4 (Takara), 2  $\mu\text{L}$  de *buffer* 10x de ADN ligasa T4 (Takara), 1  $\mu\text{L}$  de BsmBI (NEB)/BsmBI-v2 (NEB), y se completó con agua hasta los 20  $\mu\text{L}$ . Se colocaron en el termociclador según el siguiente programa: 25 ciclos de digestión y ligación (42°C por 1,30 min, 16°C por 3 min), seguidos de un paso de digestión final (50°C por 5 min) y un paso de inactivación por calor (80°C durante 10 min).

### 4.7.2. Ensamblaje de las distintas partes: creación del constructo final

Se preparó en un microtubo Eppendorf estéril para cada reacción: 1  $\mu\text{L}/10 \text{ fM}/100 \text{ fM}$  de ADN de cada una de las partes, 1  $\mu\text{L}$  de la enzima de restricción BsaI-HFv2 (NEB), 1  $\mu\text{L}$  de la ADN ligasa T4 (Takara), 2  $\mu\text{L}$  de *buffer* 10x de ADN ligasa T4 (Takara), y se completó con agua hasta llegar a 20  $\mu\text{L}$ . Se colocaron en el termociclador según el siguiente programa: 30 ciclos de digestión y ligación (37°C por 1,30 min, 16°C por 3 min), seguidos de un paso de digestión final (37°C por 5 min) y un paso de inactivación por calor (60°C durante 10 min).

Para normalizar las concentraciones equimolares en los casos que hizo falta, se utilizó un espectrofotómetro (NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer, ThermoScientific) para medir las concentraciones de las muestras de ADN.

#### **4.8. Transformación en *E. coli***

Se descongelaron las células de *E. coli* competentes en hielo, para luego mezclar 25 µL de estas con 2,5 µL del ADN correspondiente. Se incubaron en hielo (+4°C) 30 min, después se realizó un choque térmico en un baño a 42°C. Posteriormente se colocaron en hielo por 2 min, y se les añadieron 250 µL de medio SOC para su recuperación. Se incubaron en agitación por 1 h a 225 rpm y 37°C, y se sembraron en placas de agar con los antibióticos específicos para cada plásmido. Se dejaron toda la noche incubando a 37°C. Al día siguiente, se picaron colonias individuales de cada placa, para sembrarlas en tubos con 6 ml de medio LB, que se vuelven a dejar toda la noche en agitación a 37°C. Finalmente, se congeló a -80°C 1 ml en glicerol al 20% para proceder a guardarlo en la colección de plásmidos del laboratorio en caso de comprobar que el plásmido está correcto. El resto del volumen se utilizó para la purificación de los plásmidos y posterior comprobación por patrones de restricción.

#### **4.9. Purificación del ADN**

Se utilizaron dos kits de purificación en este trabajo: uno de *Intron Biotechnology (Fast DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit)*, y el otro de *QIAGEN (QIAprep Spin Miniprep Kit)*. Se siguieron las instrucciones provistas por cada uno de los proveedores.

#### **4.10. Verificación de los plásmidos generados**

En cada paso del trabajo donde se realizaron modificaciones en ADN (tras la PCR, la creación de partes, y el ensamblaje de distintas partes), se verificó si el material genético resultante era correcto mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en *buffer* TAE, previamente digiriéndolo en distintos fragmentos y observando si los pesos moleculares de estos coincidían con los estimados por aproximaciones *in silico*.

##### **4.10.1. Digestión enzimática para comprobación de los fragmentos ensamblados y su orden**

Para digerir los plásmidos, se mezclaron en tubos Eppendorf: 1 µL de las enzimas de restricción, 2 µL del *buffer* correspondiente (el *stock* está a 10X), 0,5 µL de la muestra de ADN y se completó con agua MilliQ hasta los 20 µL. Luego se colocaron en el termociclador a 37°C por 1 h.

Las enzimas de restricción tipo II utilizadas fueron Hind III y Spe I (Takara). Para ambas se utilizó el *buffer* M (Takara).

#### **4.10.2. Electroforesis de ADN en gel de agarosa**

Los geles para electroforesis se prepararon al 1% mezclando 0,5 g de agarosa, 50 ml de TAE 1X (Tris 40 mM, Ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM) y 0,5  $\mu$ L de GelRed en un matraz. Luego se vierte en la bandeja de electroforesis hasta que se solidifique con los peines y así se crean los pocillos.

#### **4.11. Preparación de células competentes de *S. cerevisiae***

Como paso previo a la transformación, se hicieron células de *S. cerevisiae* competentes, lo cual quiere decir que se vuelven más capaces de captar el material genético libre. Para ello se dejaron creciendo toda la noche levaduras de las cepas W303 y AS499, en 40 ml de medio rico YP a 30°C, hasta que tuviesen una OD<sub>660</sub> de entre 0,3 y 1. Al día siguiente se sembraron estas células centrifugándolas a 3000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. Luego se descartó el sobrenadante y se lavaron las células con 25 ml de agua estéril. Se volvió a centrifugar y descartar el sobrenadante como el paso anterior. El *pellet* se resuspendió en 1 ml de SORB (100 mM LiAc, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA y 1 mM de sorbitol) y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 s y se descartó el sobrenadante, para finalmente volver a resuspender el *pellet* en 350  $\mu$ L de SORB, y añadir 50  $\mu$ L de ADN de esperma de salmón (a 0°C). Finalmente se mezcla bien y las levaduras, que ya son competentes, se congelan a -80°C para cuando se quieran utilizar.

#### **4.12. Transformación en *S. cerevisiae***

Se descongelaron las células *S. cerevisiae* competentes en hielo, para luego mezclar 100  $\mu$ L de estas con 20  $\mu$ L del ADN de correspondiente. Se mezcló con 6 veces el volumen de PEG (polietilenglicol). Se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente se añadió un 10% de la concentración final de DMSO (dimetilsulfóxido), y se les dio un choque térmico en un baño de 42°C por 15 min. El resultante se centrifugó a 2000 rpm por 5 min para poder remover el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 100  $\mu$ L de medio mínimo. Se sembraron en placas de agar de medio mínimo sintético -URA, así como de medio rico YPD, con las distintas fuentes de carbono (glucosa o galactosa al 2%). Se incubaron a 30°C hasta ver el crecimiento de colonias (aproximadamente 5 días), para luego picar colonias individuales de cada placa, sembrarlas en tubos con 6 ml de medio mínimo sintético -URA, y volver a incubarlas toda la noche a 30°C a 200 rpm. Finalmente, de las levaduras que crecieron, se

congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  1 ml para la colección en glicerol al 20% y el resto se utilizó para los goteos y la microscopía.

#### **4.13. Análisis de crecimiento de colonias *S. cerevisiae* transformadas con genes virales por la técnica de goteo en placa.**

Previamente a realizar los goteos, se determinó la densidad óptica de los cultivos de *S. cerevisiae* a 660 nm utilizando un espectrofotómetro visible (Thermo Scientific™, GENESYS 20). Posteriormente, se diluyeron todas las muestras con el volumen de medio que fuese necesario para que tuviesen la misma densidad que la menor de ellas, con el objetivo de evitar sesgos en los goteos.

Utilizando placas de 96 pocillos, se realizaron diluciones seriadas de cada muestra en el siguiente orden: sin diluir, 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000. Finalmente, con un replicador se sembraron en las placas de agar correspondientes, con los distintos medios y fuentes de carbono.

#### **4.14. Microscopía de fluorescencia: estudio de la expresión de las proteínas virales**

Las células transformadas con plásmido episomal que contiene E2 marcado con fluorescencia (Gall-Venus-E2) y el control negativo conteniendo el vector plasmídico vacío, se dejaron creciendo toda la noche a 160 rpm y  $30^{\circ}\text{C}$  en medio sintético sin uracilo para mantener la presión selectiva, suplementado con adenina a 0.04 mg/ml para disminuir la autofluorescencia de las células. Las fuentes de carbono añadidas fueron rafinosa al 2% y glucosa al 0.1%, para que el promotor de galactosa se mantuviese ligeramente reprimido y las células pudiesen crecer.

El día siguiente se centrifugaron 5 min a 2000 rpm, se retiró el sobrenadante por decantación y se les añadió medio rico YP en presencia de rafinosa al 2% y adenina a 0,02 mg/ml. Tras 3 horas de incubación a 160 rpm y  $30^{\circ}\text{C}$  se añadió galactosa al 2% para finalmente inducir la expresión de Gall-Venus-E2. Tras 5 horas de sobreexpresión, se centrifugó 1 ml por 1 min a 4000 rpm para obtener un *pellet* de estas células y colocarlas en un porta. Se observaron al microscopio de epifluorescencia *Zeiss Axiovert 200*, usando un filtro específico para detectar proteína verde fluorescente, una cámara *Hamamatsu Image-EM* y 0.2 s de exposición con un objetivo *Plan-FLUAR 100X /1.45*. Se capturaron distintos planos en Z y se unificaron con el *software ImageJ*, haciendo proyección máxima con el algoritmo de suma de las señales de cada plano (39).

Después de sacar las primeras imágenes, las levaduras se trataron con etanol al 80% para permeabilizarlas y se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que se une específicamente al ADN, de forma que se pudiese correlacionar la localización de la proteína con el núcleo.



## 5. Resultados

---

### 5.1. Optimización de un modelo de clonaje fundamentado en el método de clonaje modular de *Golden Gate*, para la expresión de la proteína E2 del VPH en *S. cerevisiae*.

El primer objetivo de este trabajo consistió en la optimización de un clonaje que permitiese expresar la proteína E2 del VPH en *S. cerevisiae*. Para ello se siguió como modelo el clonaje modular explicado en el apartado 1.10 de la introducción (Clonaje molecular en *S. cerevisiae*: adaptación al método *Golden Gate*).

El trabajo se inició adaptando la secuencia de ADN de E2 a la abundancia de ARNt en *S. cerevisiae*, para asegurar la máxima producción de proteína en nuestras condiciones experimentales. A este proceso se le llama optimización de codones y da lugar a una secuencia de ADN óptima para su expresión en *S. cerevisiae*, dónde la secuencia polipeptídica sigue siendo exactamente la de E2 viral. Luego, se adaptó esta secuencia a este sistema modular; para ello se diseñaron *primers* con protuberancias (también llamados colas) para que, al realizar una PCR, nuestra secuencia resultante tuviese en cada extremo sitios de reconocimiento para las enzimas BsaI y BsmBI, así como una secuencia no codificante de 4 letras que componen la terminación específica de “parte 3” según el clonaje modular mencionado anteriormente (TATG y ATCC).

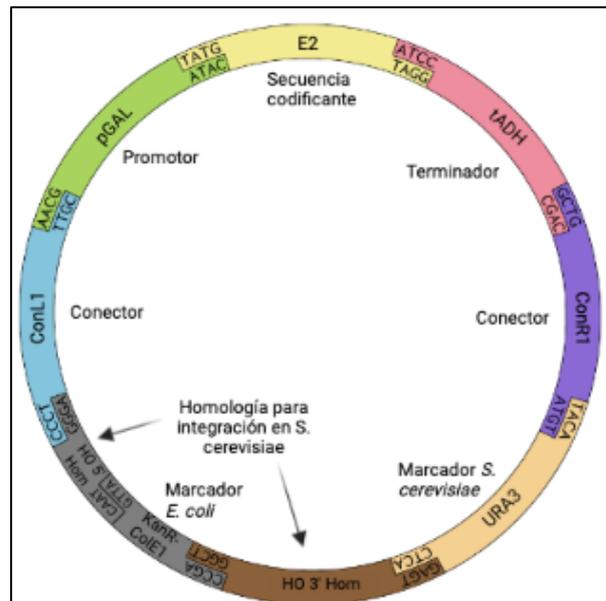
El siguiente paso consistió en introducir esta secuencia, el producto de PCR, en un vector plasmídico (ColE1, CamR, GFP) para tener un “plásmido parte 3”, manipulable en *E. coli* y que pudiera ensamblarse con el resto de las partes más adelante. Para este paso, la enzima necesaria es BsmBI (ver punto 4.7.2. de material y métodos: Introducción de secuencia E2 en vector plasmídico: crear parte 3 y 3B). Actualmente se comercializa una versión de esta enzima, llamada BsmBI-v2, que se dice que está optimizada para el clonaje basado en *Golden Gate*. Se decidió por lo tanto hacer este experimento probando la enzima antigua (BsmBI) y su versión mejorada (BsmBI-v2), obteniendo como resultado un mayor porcentaje de colonias de *E. coli* positivas cuando se utilizó BsmBI (**Tabla 7**). Estos plásmidos parte 3 creados se comprobaron mediante electroforesis en dos ocasiones independientes, y en la **Figura 8B** se muestra una de ellas.

**Tabla 7. Porcentajes de colonias de *E. coli* transformadas con plásmido parte 3 según la enzima utilizada.**

<b>BsmBI (NEB)</b>	<b>BsmBI-v2 (NEB)</b>
Plásmido parte 3: 30% +	Plásmido parte 3: 2% +
Plásmido parte 3b: 90% +	Plásmido parte 3b: 15% +

El resto de las partes se seleccionaron de entre las que eran dadas por el kit modelo (37), como se enumeran, a continuación (ver **Figura 7** asociada):

- Parte 1. ConL1
- Parte 2. pGAL1
- Parte 3. E2
- Parte 4. tADH1
- Parte 5. ConR1
- Parte 6. URA3
- Parte 7. HO 3' Hom
- Parte 8a. KanR-ColE1
- Parte 8b. HO 5' Hom



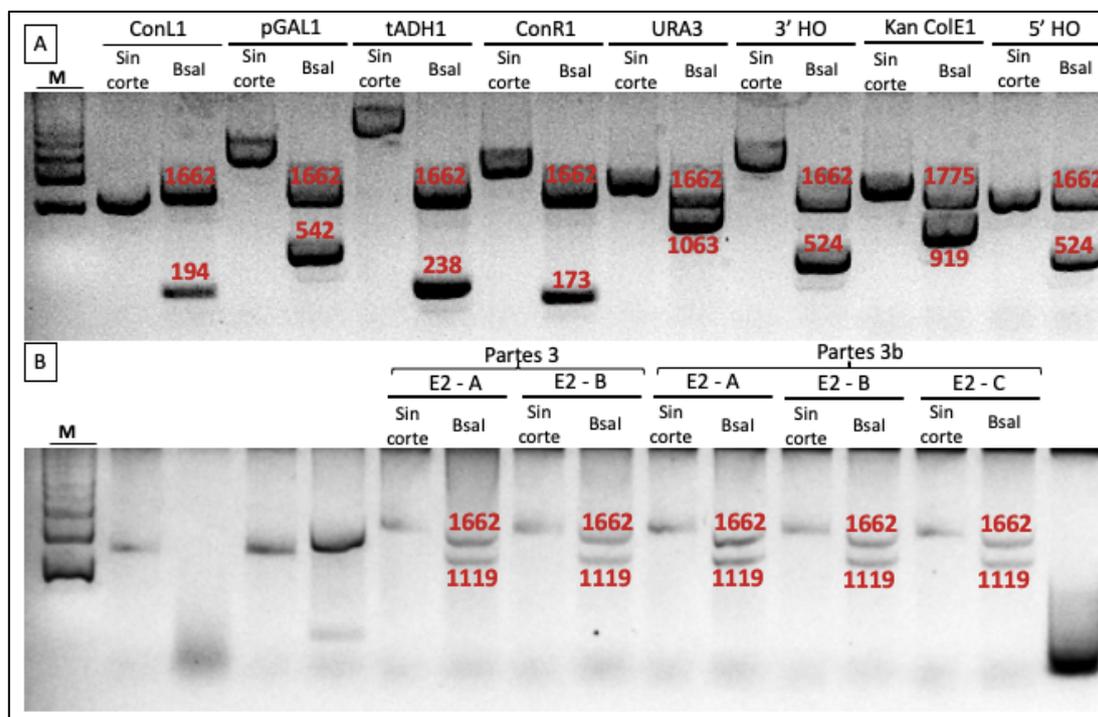
**Figura 7. Esquema del ensamblaje 1.** Creado con BioRender.com..

Se decidió usar el promotor de galactosa ya que es inducible y permitiría activar o reprimir la transcripción de E2. El terminador usado fue ADH1, un terminador constitutivo. La parte 8a contiene un marcador de resistencia antibiótica a kanamicina, para poder seleccionar con el antibiótico las colonias de *E. coli* que porten el gen y por tanto el plásmido construido. Para *S. cerevisiae*, en cambio, el marcador usado fue URA3, de prototofía de uracilo, que permite que en un medio sin uracilo crezcan solo aquellas colonias que expresen dicho gen. Las partes 1 y 5, llamadas aquí conectores, son secuencias no reguladoras y no codificantes que se utilizan para dirigir el ensamblaje de plásmidos multigénicos, que no es el caso de este proyecto, pero pueden servir de molde para proyectos futuros. Finalmente, las partes 7 y 8b contienen secuencias que tienen homología 3' y 5', respectivamente, del locus HO de levaduras donde se podrá integrar este constructo previamente linealizado en el genoma de la levadura al ser transformada con éste.

Con este primer diseño (que llamaremos ensamblaje 1) el plásmido resultante (**Figura 7**) se transformó en *E. coli*, y a pesar de que crecieron colonias en las placas conteniendo el antibiótico de selección kanamicina, al purificar el ADN de estos ensamblajes y digerirlos para verificarlos con los patrones de bandas en gel de agarosa, ninguna de las colonias dio un patrón positivo. Además, se intentó transformar en levadura no obteniendo ninguna colonia positiva. A partir de este punto se empezaron a probar distintas estrategias para obtener plásmidos ensamblados de manera correcta y transformaciones en levaduras más eficientes:

### 5.1.1. Comprobación de cada una de las partes

Si una sola de las partes usadas en el ensamblaje multiparte del sistema *Modular Cloning* fuese incorrecta, el constructo plasmídico no se ensamblaría, por eso primeramente se comprobó cada una con patrones de restricción en electroforesis. En la **Figura 8** se ve el resultado de esta comprobación, que sugiere que los plásmidos usados son correctos.



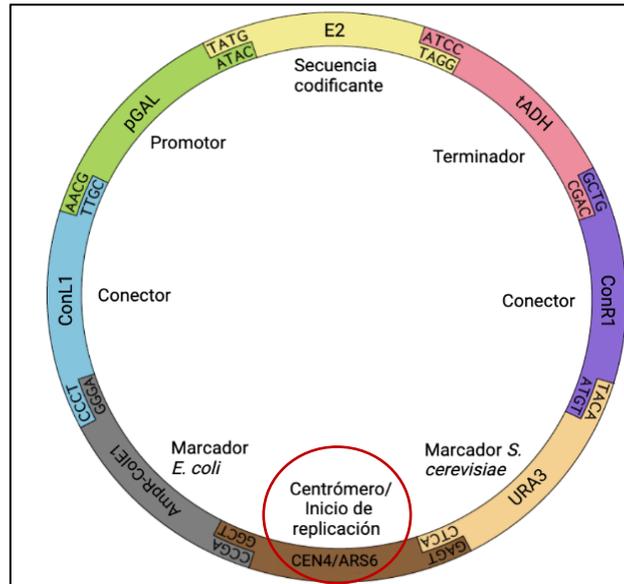
**Figura 8.** Digestión con *BsaI* de los “plásmidos parte” usados en ensamblaje 1. En (A) se muestran las partes obtenidas del kit, y en (B) las creadas en este trabajo como partes 3 y 3B. El primer carril (M) corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb de Promega (G5711). Los carriles no rotulados pertenecen a plásmidos de otro proyecto.

### 5.1.2. Rediseño del ensamblaje: de integrativo a episomal

Viendo que los plásmidos parte poseían los patrones de restricción correctos y por tanto no eran el problema, se intentó aumentar la eficiencia de las transformaciones en levaduras. Para ello se rediseñaron los ensamblajes para que contengan una secuencia centromérica de levaduras y se puedan mantener de forma episomal en *S. cerevisiae*. Las transformaciones de plásmidos episomales en levaduras son mucho más eficientes que las integrativas (40). Las partes usadas quedaron de esta forma (a llamar ensamblaje 2, **Figura 9**):

- Parte 1. ConL1
- Parte 2. pGAL1
- Parte 3. E2
- Parte 4. tADH1
- Parte 5. ConR1
- Parte 6. URA3
- Parte 7. CEN6/ARS4
- Parte 8. AmpR-ColE1

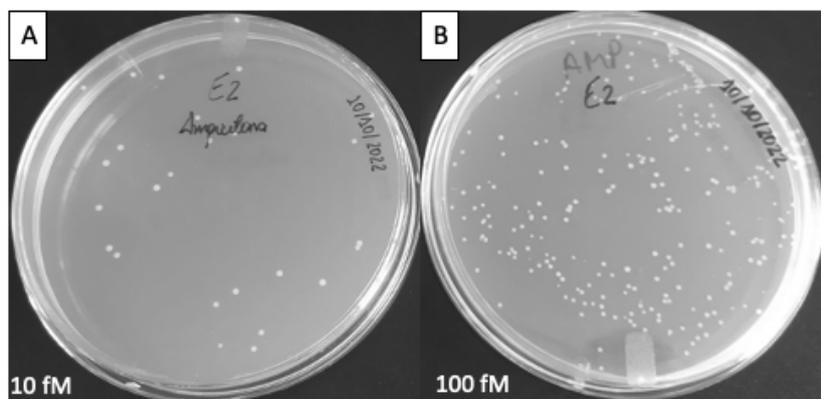
**Figura 9. Esquema del ensamblaje 2.**  
Creado con BioRender.com.



La variación supuso quitar las secuencias de homología 3' y 5', y en cambio añadir los genes CEN6 y ARS4, que permitirían la replicación en levadura como elementos episomales.

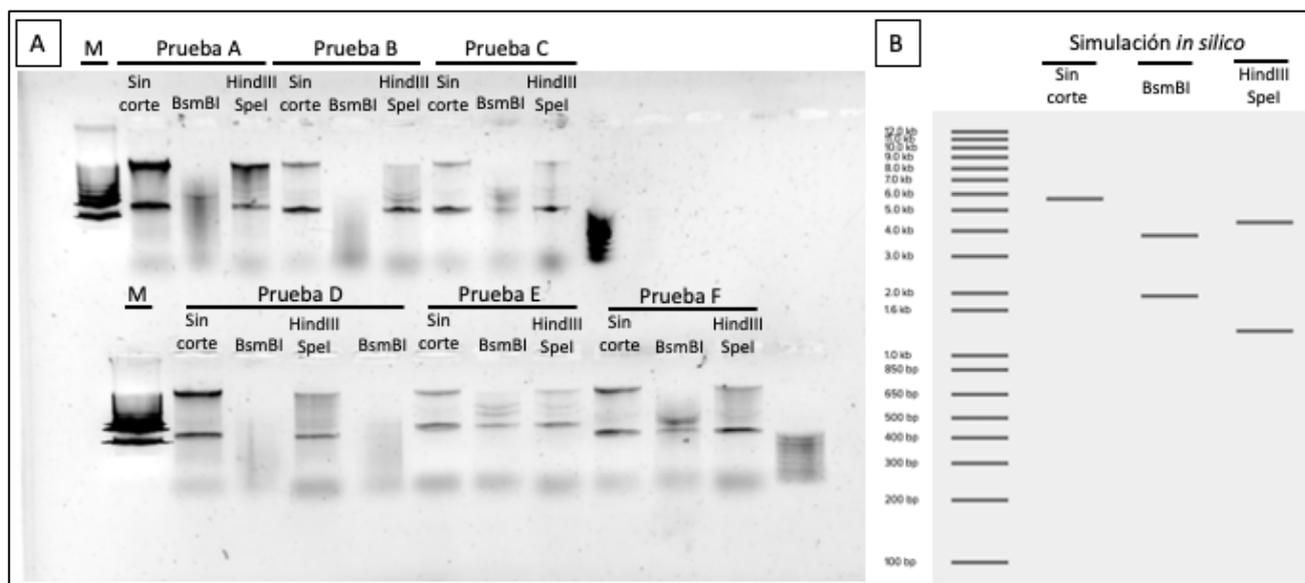
### 5.1.3. Control del empleo de concentraciones de ADN viral equivalentes

Para la construcción del ensamblaje 1 (ver punto 4.7.2. de material y métodos: Ensamblaje de las distintas partes: crear constructo final) se utilizó la cantidad fija de 1  $\mu$ L de ADN de cada una de las 8 partes. Sin embargo, como en 1  $\mu$ L puede haber distintas concentraciones, y teniendo en cuenta que todas las partes son necesarias para que funcione el ensamblaje, se midió la concentración de cada una de ellas y se igualaron para poner 10 fM de cada parte (**Figura 10A**) o 100 fM de cada parte (**Figura 10B**). Esto se hizo con el diseño de ensamblaje 2. En ambos casos, al sembrar las bacterias transformadas crecieron colonias, pero en el experimento usando 100 fM de cada parte creció un mayor porcentaje, quedando esta última cantidad fijada como la más adecuada para el resto de los ensamblajes.



**Figura 10. Placas de E. coli transformadas con el ensamblaje 2 sembradas en medio LB con ampicilina.** En la placa (A), el ensamblaje 2 se construyó con usando 10 fM de cada parte de ADN, mientras que en la placa (B) se usaron 100 fM de cada parte.

Sumando las condiciones mencionadas anteriormente (revisando las partes y haciendo nuevos ensamblajes, con cambio de partes y de concentraciones de ADN), los resultados de la electroforesis para la comprobación de los clonajes seguían sin ser muy claros, no pudiendo afirmar que un ensamblaje fuese positivo (**Figura 11**).

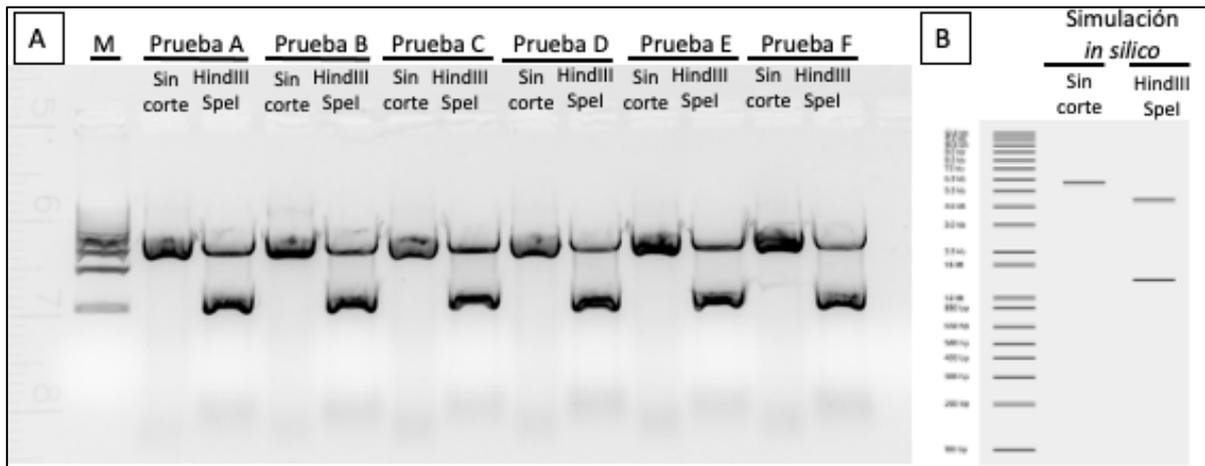


**Figura 11.** (A). Digestión con *BsmBI*, y *HindIII-SpeI*, siendo las pruebas de A hasta la F diferentes colonias de *E. coli* seleccionadas, transformadas con los mismos ensamblajes. (B). Patrones de digestión esperados según simulación *in silico* con *BsmBI* y *HindIII-SpeI*. El primer carril (M) corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb de Promega (G5711).

#### 5.1.4. Purificación del ADN plasmídico

La cepa de *E. coli* usada para nuestros clonajes (Stbl3) tiene endonucleasa I (abreviada endA), enzima que, en caso de permanecer tras la purificación de ADN, puede degradar el mismo. Por esto, se decidió cambiar el kit de purificación de ADN que se estaba usando hasta el momento (de Intron Biotechnology), a uno que tuviese un paso específico de eliminación de endonucleasas (de QIAGEN).

Se realizó así un nuevo experimento donde a las condiciones anteriores, se añadía purificar cada uno de los plásmidos parte con el nuevo protocolo antes de proceder al ensamblaje de estos. El resultado, al digerir los nuevos ensamblajes con *HindIII-SpeI* para verificar sus patrones, fue la obtención de un gel de electroforesis que mostraba los patrones bandas esperados (**Figura 12**). Ahora, con el sistema de *Modular Cloning* optimizado para la obtención de ensamblaje de la proteína viral E2 del VPH y con los constructos positivos obtenidos se transformó en levadura para los siguientes objetivos.



**Figura 12.** (A). Digestión con *HindIII-SpeI*, siendo las pruebas de A hasta la F diferentes colonias de *E. coli* seleccionadas, transformadas con los mismos ensamblajes. (B). Patrones de digestión esperados según simulación *in silico* con *HindIII-SpeI*. El primer carril (M) corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb de *Promega (G5711)*.

## 5.2. Sobreexpresión de la proteína E2 del VPH en *S. cerevisiae* para estudiar su efecto sobre el crecimiento y progresión del ciclo celular.

El ADN obtenido de los experimentos anteriores se transformó en *S. cerevisiae* persiguiendo el segundo objetivo del trabajo: estudiar el efecto de la proteína E2 del VPH en el crecimiento de la levadura.

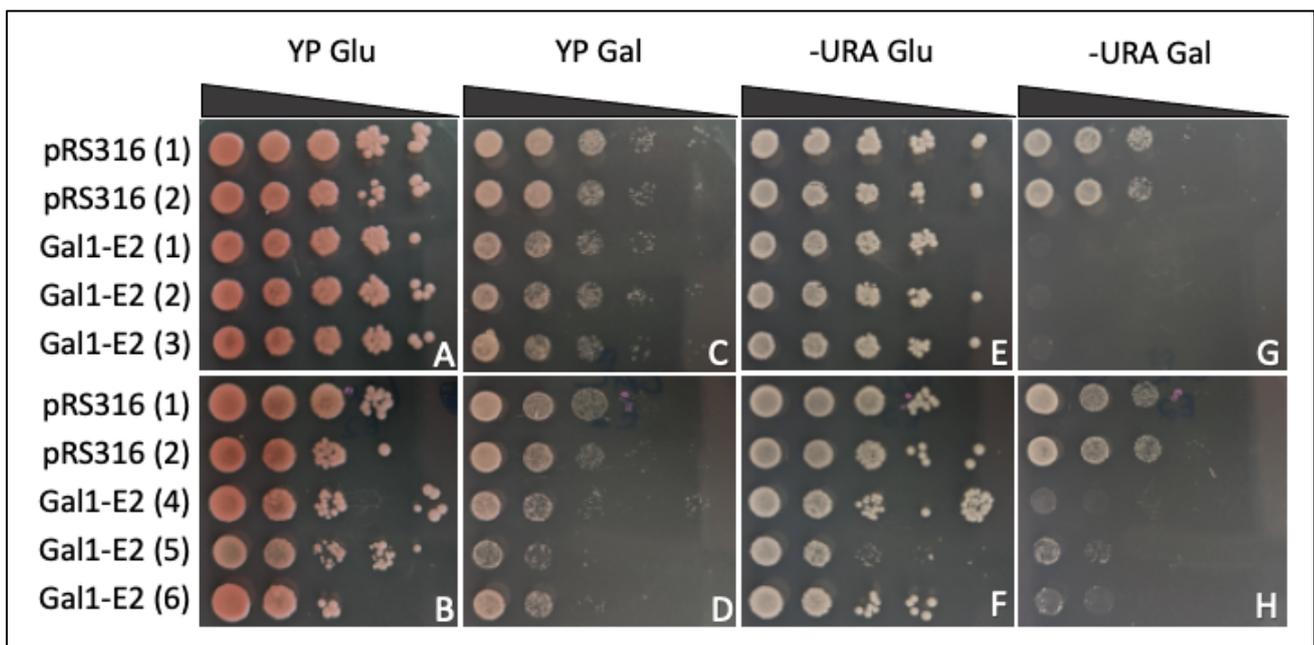
De las levaduras transformadas, pertenecientes a la cepa AS499, se aislaron 6 colonias independientes, llamadas Gal1-E2 (1-6). Se utilizaron dos controles transformados con el plásmido “vacío”, esto es un plásmido que codifica para el gen URA3 (llamado pRS316) al igual que nuestros constructos, permitiéndoles crecer en medio sin uracilo, pero que no codifica secuencia alguna perteneciente a E2. Se sembraron mediante goteos con diluciones ascendentes en placas con distintos medios (medio rico YP y medio mínimo -URA) y con distintas fuentes de carbono (glucosa y galactosa). Hay que recordar que en medio rico YP no hay presión selectiva, y podrán crecer aquellas células que contengan el plásmido que codifica para URA3 o si lo perdiesen durante el crecimiento, podrían seguir creciendo igualmente. Por otro lado, en medio sin uracilo solo crecerían las colonias que estén expresando el ensamblaje que se diseñó (con URA3) o el control pRS316. Además, en medio con glucosa la expresión de E2 estaría inhibida mientras que en galactosa estará sobreexpresada.

Observando las placas obtenidas (**Figura 13**), se aprecia que:

- En las placas en medio mínimo (recuadros E, F, G, y H) se ve que en glucosa (recuadros E y F) en dónde la expresión de E2 está inhibida, hay crecimiento de levaduras hasta en el pocillo más diluido tanto de los controles (pRS316) como los diferentes clones de Gal-E2. Esto es de esperar, ya que en estas condiciones E2 no se está expresando y por tanto el

crecimiento de las diferentes diluciones en todas las cepas debe ser comparable. Sin embargo, en galactosa (recuadros G y H) se ve que aquellas cepas que contienen el constructo Gal-E2 y que por tanto están sobreexpresando E2 ven totalmente inhibido el crecimiento celular. Esto indica que E2 inhibe de manera muy potente el crecimiento de las células de *Saccharomyces cerevisiae*.

- En las placas que contienen medio rico YP (recuadros A, B, C y D), hay un mayor crecimiento de levaduras en general tanto en glucosa como en galactosa. En glucosa (recuadros A y B), en medio rico, al igual que ocurre en medio -URA, es de esperar que no se observen diferencias entre los diferentes clones testados y los controles. En galactosa (recuadros C y D) se observa que aquellas células que contienen el constructo Gal-E2 crecen ligeramente menos que los controles pRS31. Esto es debido a que algunas células estocásticamente perderán el plásmido codificando para Gal-E2. Como se ha mostrado más arriba, el producto de Gal-E2 resulta tóxico para la células. De esta manera aquellas células que pierdan el plásmido aleatoriamente verán favorecido su crecimiento y evidentemente no sobreexpresarán E2 no mostrando por tanto su efecto inhibitor sobre el crecimiento. La coloración rojiza se debe a que estas células son auxótrofas para la adenina, y que a pesar de que se encuentra presente en el medio rico, las células terminan agotándolo e intentan sintetizarla produciendo intermediarios metabólicos de color rojizo.



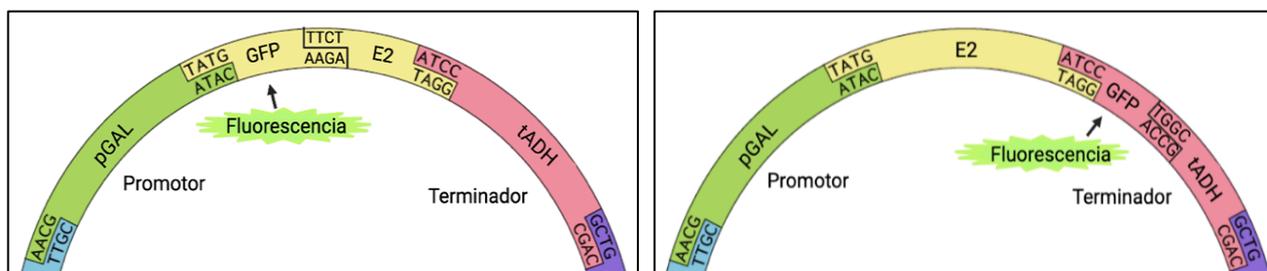
**Figura 13. Placas de *S. cerevisiae* a concentraciones descendentes para analizar efecto de E2 sobre el crecimiento.** YP: medio rico. -URA: medio mínimo sin uracilo. Glu: glucosa. Gal: galactosa. Gal1-E2 (1-6) colonias independientes de la cepa AS499 col el plásmido del ensamblaje 2.

### 5.3. Sobreexpresión de la proteína E2 del VPH etiquetada con proteína fluorescente en *S. cerevisiae* para determinar si esta afecta a las funciones de E2, así como su sublocalización celular.

#### 5.3.1. Determinar si el etiquetado de E2 con proteína fluorescente afecta a su función

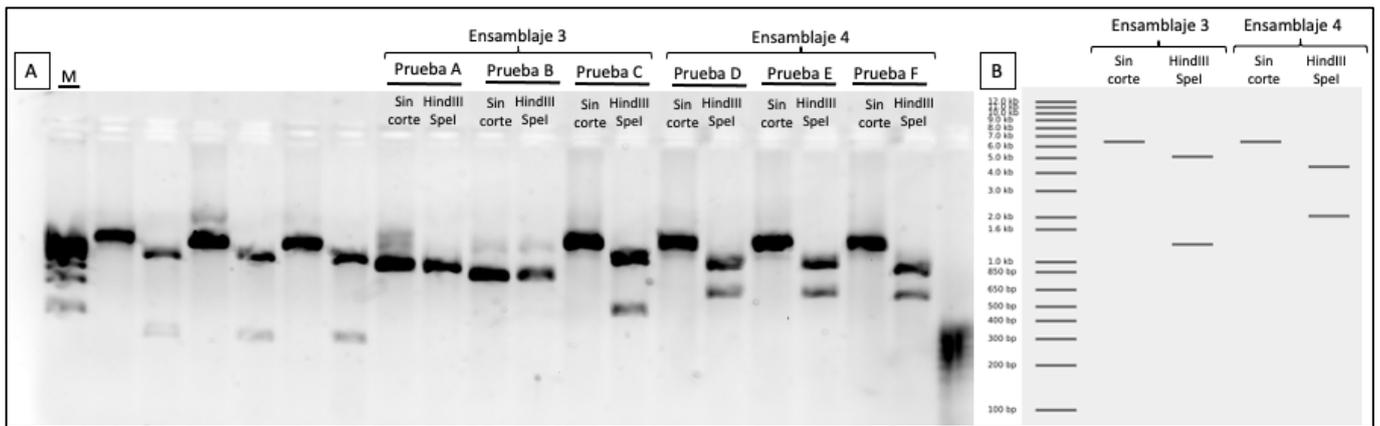
Para poder estudiar proteínas a nivel celular es muy común acudir a la estrategia del etiquetados con diferentes epítotos o proteínas fluorescentes. En este caso es de interés etiquetar la proteína E2 con proteína fluorescente para poder determinar su localización. Sin embargo, se sabe que algunas proteínas pueden perder funcionalidad al añadirles estas etiquetas en sus extremos amino o carboxilo terminal. Con el objetivo de conocer si la proteína E2 es funcional cuando está etiquetada en su extremo amino o carboxilo terminal con la proteína fluorescente Venus, se diseñaron dos nuevos ensamblajes (3 y 4) utilizando las condiciones optimizadas en el apartado 5.1.

Para etiquetar a E2 en su extremo N-terminal, según el clonaje modular que se ha seguido, se tuvo que adaptar la secuencia de E2 para que fuese una parte 3b y así colocar la etiqueta fluorescente Venus como una parte 3a que le preceda (**Figura 14A**). La comprobación con gel de electroforesis de esta parte creada se puede ver en la **Figura 8B**. Por otro lado, para que el marcaje quedase en el extremo C-terminal, la parte 4 se dividió en a y b, de manera que la parte 4a es la etiqueta fluorescente Venus, y la parte 4b es el terminador de ADH (**Figura 14B**).



**Figura 14. Esquema de los ensamblajes 3 y 4:** (A). **Ensamblaje 3:** la etiqueta fluorescente Venus se coloca para que se traduzca en el extremo N-terminal de la proteína E2. (B). **Ensamblaje 4:** la etiqueta fluorescente Venus se coloca para que se traduzca en el extremo C-terminal de la proteína E2. Imágenes creadas con BioRender.com.

Una vez realizados estos clonajes, se verificaron al igual que los anteriores, digiriéndolos con las enzimas HindIII-SpeI para verificar sus patrones de banda en un gel de electroforesis. Del ensamblaje 3 solo se obtuvo un constructo positivo (prueba C), y del ensamblaje 4 todos lo fueron, como se puede comprobar en la **Figura 15**.

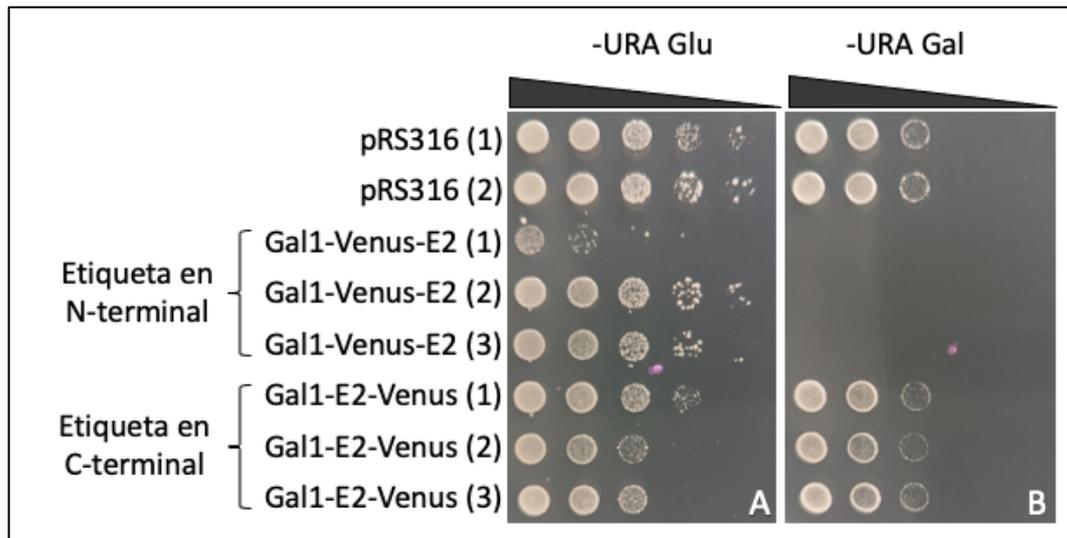


**Figura 15.** (A). Digestión con *HindIII-SpeI*, siendo las pruebas de A hasta la C diferentes colonias de *E. coli* seleccionadas con el ensamblaje 3, y de la D a la F con el ensamblaje 4. (B). Patrones de digestión esperados según simulación *in silico* con *HindIII-SpeI*. Los carriles no rotulados pertenecen a otro proyecto. El primer carril (M) corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb de Promega (G5711).

Los constructos episomales comprobados se transformaron en la cepa W303, y se seleccionaron 3 colonias de cada uno, llamados Gal1-Venus-E2 (1-3) en el caso de que la etiqueta fluorescente Venus se colocara en N-terminal, y Gal1-E2-Venus (1-3) en aquellos con Venus en C-terminal. Cada una de estas colonias se sembraron mediante goteos con concentraciones descendentes, en dos placas, una con glucosa y otra con galactosa, y ambas en medio mínimo sin uracilo. Se plaquearon también dos controles de pRS316.

El resultado (**Figura 16**) fue:

- Las levaduras con E2 etiquetado en N-terminal conservaron su función de inhibición del crecimiento, viéndose cómo en la placa de galactosa (E2 sobrexpresado, recuadro B) no crecieron colonias de *S. cerevisiae* en comparación de los controles.
- Aquellas con E2 marcado en C-terminal perdieron esta función. Se observa cómo crecen igual tanto en glucosa (E2 inhibido, recuadro A) como en galactosa (E2 sobrexpresado, recuadro B).
- Este resultado nos indica que para estudiar las funciones de E2 sólo son válidos los etiquetados de E2 en N terminal, ya que aquellos realizados en C-terminal hacen a la proteína no funcional.



**Figura 16.** Placas con *S. cerevisiae* a concentraciones descendentes para analizar efecto del etiquetado con Venus sobre la función de E2. -URA: medio mínimo sin uracilo. Glu: glucosa. Gal: galactosa.

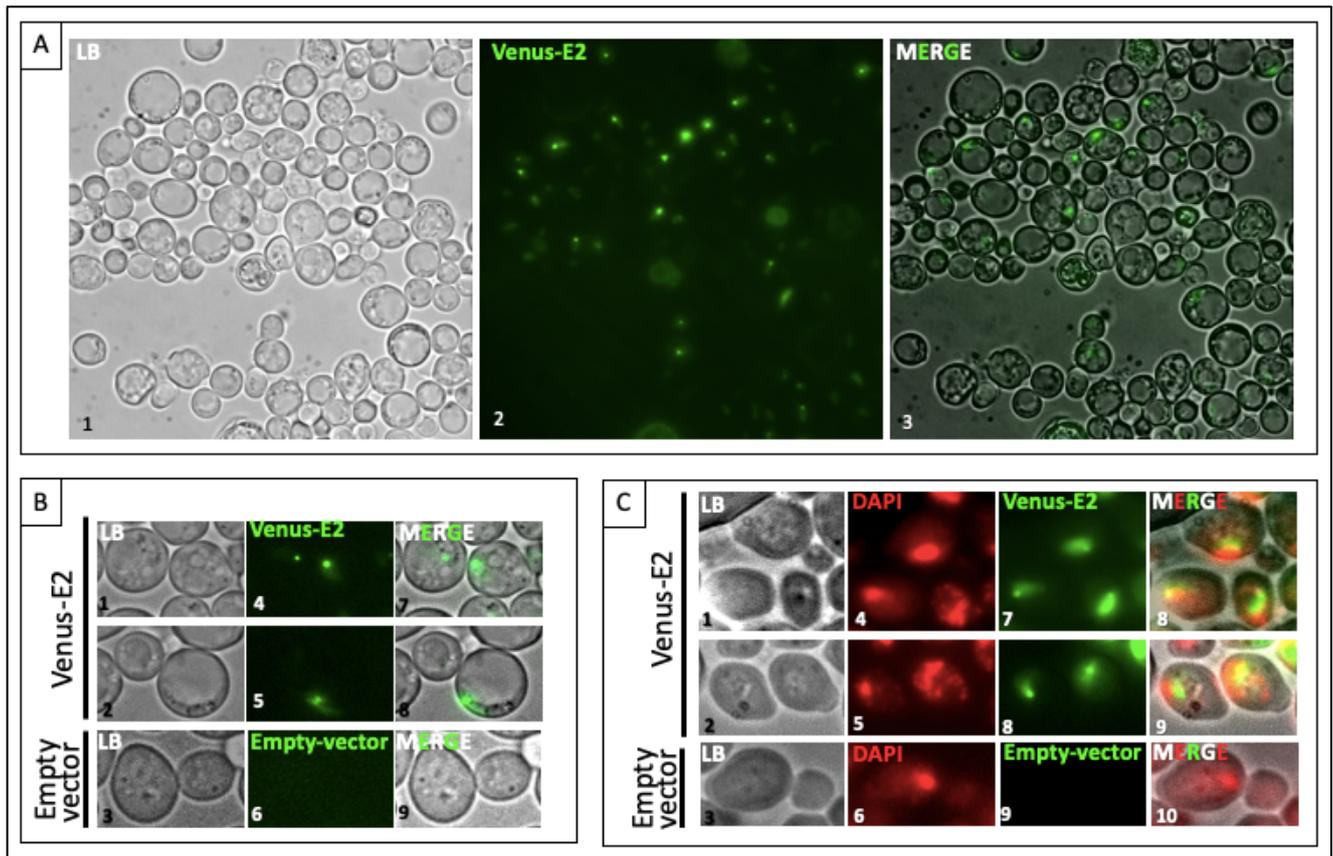
### 5.3.2. Determinar su sublocalización celular

Con el microscopio de epifluorescencia se visualizaron las levaduras que expresaban E2 marcado en N-terminal con la proteína fluorescente Venus, con la finalidad de determinar la sublocalización celular de E2. Primero se observaron con luz blanca para ver la distribución y aspecto general de las células, luego con el filtro de fluorescencia para Venus y finalmente con un filtro que permitiese ver la tinción del núcleo mediante DAPI.

Al comparar las células que sobreexpresan E2 con las células control que sólo expresan URA3 (pRS316), se puede ver que tienen citoplasmas vacuolizados (**Figura 17 A1 y 17B**), probablemente por el efecto perjudicial de E2. Esto hace que estructuras como el núcleo se desplacen a la periferia. Al aplicar el filtro de fluorescencia (**Figura 17 A2**) se observan zonas de fluorescencia focalizada en acúmulos, que se corresponden con la proteína E2, y algunas zonas con fluorescencia más difusa que, probablemente, se deben a la autofluorescencia de algunos componentes celulares a estas longitudes de onda de excitación y que no representan la localización de E2. Al sobreponer ambas imágenes (**Figura 17 A3**), parece que la expresión de E2 coincide con el núcleo celular.

En la **Figura 17B**, se muestran células individuales expresando E2 de dos colonias diferentes, y otras con un plásmido vacío de control (pRS316). En estas imágenes se puede ver que la localización de E2 parece no solo coincidir con el núcleo, sino además encontrarse en un subcompartimento del mismo. Las células control, como es de esperar, no mostraron fluorescencia.

Finalmente, para comprobar que la localización de E2 es nuclear, las células se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), un colorante que se une específicamente al ADN haciéndolo fluorescente (**Figura 17C**). Con este último paso se pudo ver que la localización de E2 coincidía con el núcleo. Además, es muy llamativo que su distribución no es homogénea, sino que se encuentra focalizada en un región concreta del núcleo, algo que está escasamente caracterizado en la bibliografía científica.



**Figura 17.** Imágenes mediante microscopía de epifluorescencia de *S. cerevisiae* expresando proteína E2 (Venus-E2) o un vector vacío de control (pRS316), con objetivo 100X y distintos filtros de luz: (A) (1) Luz blanca, (2) filtro de fluorescencia específico para la proteína fluorescente Venus y (3) superposición de ambas. (B) (1,2,3) luz blanca, (4,5,6) filtro de fluorescencia específico para la proteína fluorescente Venus y (7,8,9) superposición de ambas. (C) Células teñidas con DAPI vistas bajo (1,2,3) luz blanca, (4,5,6) filtro para DAPI, (7,8,9) filtro de fluorescencia específico para la proteína fluorescente Venus y (8,9,10) superposición de las tres.



## 6. Discusión

---

El estudio *in vitro* del VPH ha supuesto retos desde sus inicios. Su ciclo reproductivo depende de la diferenciación epitelial y no se propaga en cultivos celulares convencionales, requiriendo de cultivos organotípicos que, entre otras limitaciones, tienen una duración de crecimiento del tejido de al menos 14 días (41). Incluso, modelos de estudio simplificados para la investigación de la proteína E2 de VPH tienen ciertas restricciones. La expresión de la proteína E2 de manera estable inhibe la proliferación celular, incluso a bajos niveles de expresión (23), hecho que se ha confirmado en este TFG. Por todo esto, conseguir expresar la proteína E2 en un sistema eucariótico más simple como es *S. cerevisiae* pero que mantiene mecanismos moleculares básicos conservados, es ideal. Este sistema permite la regulación de la represión o expresión de E2 de manera precisa y efectiva. Además, permite la adaptación y estudio de nuevas variantes génicas de manera rápida y versátil gracias al método de clonaje modular utilizado en este trabajo, basado en *Golden Gate*, facilitando la caracterización molecular de E2.

En este TFG, la realización de este clonaje ha permitido observar que la proteína E2 en *S. cerevisiae* se ubica en un subcompartimento nuclear, el cual por sus características podría tratarse del nucleolo o del centro organizador de los microtúbulos (MTOC, del inglés *microtubule organizing centre*) o SPB en levaduras (del inglés *spindle pole body*), pues son estructuras que, en esta levadura, se observan en el interior o periferia nuclear de manera focalizada (42), del mismo modo que lo hace la proteína E2 en las imágenes obtenidas en este trabajo (**Figura 17**). Esto es interesante puesto que, en algunos estudios realizados en células eucariotas superiores, se ha determinado la localización de la proteína E2 de distintos VPH de alto riesgo en los husos mitóticos y MTOC (43), que serían equivalentes al SPB de *S. cerevisiae*. Por lo tanto, si se confirmase que el subcompartimento visto en este estudio se trata del SPB sería indicativo de que estos mecanismos moleculares de E2 están conservados entre levaduras y organismos de complejidad superior. La observación de que E2 es capaz de inhibir el crecimiento celular en *S. cerevisiae* (**Figura 13**) junto con que posee una localización focalizada en el interior nuclear tiene relevancia por tres razones: 1) Permite que sea usado como modelo para estudiar los mecanismos de E2 para inhibir el crecimiento celular, de los cuales se conoce muy poco, 2) Determinar la importancia de la localización focalizada nuclear para llevar a cabo las diferentes funciones de E2 y 3) Nos permite conocer las interacciones o relación entre la capacidad de inhibición del ciclo celular con la localización focalizada en el núcleo. Dicha localización nuclear, en caso de confirmarse su colocalización con los SPB, adquiriría una relevancia mayor al asemejarse a los mecanismos ya descritos en eucariotas superiores.

En este estudio se ha mostrado que la proteína E2 del HPV31 etiquetada en fase con la proteína Venus en su extremo N-terminal, ha conservado su función, y esto es coherente con otros estudios donde E2 de HPV16 y 18, ambos genotipos de alto riesgo, se habían unido en fase a proteínas fluorescentes, de la misma manera, y habían conservado su funcionalidad (43–45). Sin embargo, el etiquetado en C-terminal de E2 hace que esta deje de ser funcional en su capacidad de inhibir el ciclo celular (**Figura 16**). Sorprendentemente, hay estudios que etiquetan E2 en su extremo C-terminal (46) y han llevado a cabo estudios funcionales de esta proteína así etiquetada. Es posible que diferentes formas de etiquetado en C-terminal impacten de manera variable a la función de E2, por ejemplo, variando la longitud y extensión del polipéptido de unión entre E2 y la proteína fluorescente. Otra posibilidad es que estas formas etiquetadas en C-terminal pierdan su capacidad de inhibir el crecimiento celular, pero mantengan sus otras funciones celulares, o simplemente que diferentes E2 de diferentes virus se comportan de diferente manera. En cualquier caso, el presente estudio pone de manifiesto la importancia de comprobar la actividad de E2 tras el etiquetado para verificar que sigue conservando las mismas funciones moleculares que sus versiones sin etiquetar.

Existen varias líneas de investigación que exploran el potencial de la proteína E2 como diana o fundamento de una estrategia terapéutica anti-VPH, pudiendo destacar fundamentalmente dos aproximaciones experimentales: en la primera, se aprovecha el papel que tiene E2 de inhibir el crecimiento de las células, e integra estudios donde se intenta usar esta proteína viral para controlar o inducir la regresión tumoral (30). En este sentido, los cánceres avanzados pierden esta proteína reguladora viral. En la otra línea a destacar, se busca, precisamente, lo contrario: bloquear las interacciones de E2 con otras proteínas de la célula huésped, justo en las primeras etapas de la infección por el HPV, con el fin de evitar la progresión hacia la infección persistente, que, generalmente es necesaria para el desarrollo neoplásico (27). Es en esta última línea donde este TFG pueda tener mayores aportaciones, en particular, en la búsqueda y caracterización de dianas moleculares que puedan bloquearse y que impidan que la proteína E2 lleve a cabo sus funciones de mantener el VPH en los tejidos que infecta.

Por todos estos motivos anteriormente mencionados, una caracterización en mayor profundidad del presente modelo celular sería de gran interés para indagar los mecanismos usados por E2 para inhibir el crecimiento celular, las estrategias usadas por el VPH para segregarse su genoma y persistir en el tejido a través de su anclaje a los microtúbulos y MTOC celulares y en general conocer las interacciones de E2 con distintas proteínas, con el objetivo de contribuir al diseño de nuevas estrategias terapéuticas anti-VPH.

## 7. Conclusiones

---

La realización de este trabajo de fin de grado ha dado lugar a tres conclusiones principales:

- a. El clonaje modular basado en Golden Gate es una herramienta simple y versátil que permite la expresión y estudio de proteínas virales en *S. cerevisiae*, como es el caso de la proteína E2 del VPH.
- b. La expresión de la proteína E2 del VPH en *S. cerevisiae* da lugar a la inhibición del crecimiento de esta levadura.
- c. La proteína E2 del VPH conserva su función de inhibición del crecimiento si es etiquetada con una proteína fluorescente en su extremo N-terminal, al contrario que en el C-terminal donde pierde esta función.
- d. La proteína E2 del VPH en *S. cerevisiae* se encuentra localizada en un subcompartimento nuclear.

## 8. ¿Qué he aprendido de este Trabajo de fin de grado?

---

Con la realización de este TFG he adquirido conocimientos sobre el Virus del Papiloma Humano y su patología, así como aspectos básicos de biología molecular que me han permitido entender los experimentos realizados. He aprendido a realizar diversas técnicas de trabajo en el laboratorio, desde cómo preparar medio de cultivo celular, para el crecimiento de bacterias y levaduras, así como a cultivar estos tipos de células procariota y eucariota, respectivamente, a transformar plásmidos bacterianos en ambos tipos de células, a purificar ADN, preparar y trabajar con geles de electroforesis de ADN, a saber interpretar los resultados que se obtienen, y, por supuesto, he adquirido toda la teoría y la metodología práctica para llevar a cabo el clonaje basado en Golden Gate.

Por otro lado, aprendí a usar programas informáticos, necesarios para la realización del trabajo, tales como *Serial Cloner* (para la optimización de codones y simular una PCR), el software de *Benchling* (para diseñar y verificar clonajes) y el *ImageJ* (para editar y procesar las imágenes de los geles y de la microscopía). Asimismo, mi TFG me ha permitido aprender a realizar cálculos para los experimentos, mediante el uso de Excel.

Por último, pero no menos importante, he aprendido lo que conlleva hacer un proyecto de investigación básica, y entre ello se incluye la organización, paciencia y perseverancia. Gracias a este TFG, he aprendido a apreciar la importancia de la ciencia para el avance de la medicina y la biomedicina.



## 9. Bibliografía

---

1. Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - A brief historical account. Vol. 384, Virology. 2009. p. 260-5.
2. Shope RE, Weston Hurst BE. Infectious Papillomatosis of Rabbits. Journal of Experimental Medicine. 1933;58,5:607-24.
3. Rous P, Beard JW. The Progression To Carcinoma of Virus-Induce Rabbit Papillomas. J Exp Med. 1935;62,4:523-48.
4. Strauss MJ, Bunting H, Melnick JL. Virus-like particles and inclusion bodies in skin papillomas. The Journal of Investigative Dermatology . 1949;46-50.
5. World Health Organization. Cervical cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>. 2022.
6. Kombe Kombe AJ, Li B, Zahid A, Mengist HM, Bounda GA, Zhou Y, et al. Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation. Vol. 8, Frontiers in Public Health. Frontiers Media S.A.; 2021.
7. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. mayo de 2021;71(3):209-49.
8. Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Collado JJ, Gómez D, et al. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report. [Internet]. 2021 oct. Disponible en: [www.hpvcentre.net](http://www.hpvcentre.net)
9. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper [Internet]. 2022 dic [citado 23 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9750>
10. Bruni L, Diaz M, Barrionuevo-Rosas L, Herrero R, Bray F, Bosch FX, et al. Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: A pooled analysis. Lancet Glob Health. 1 de julio de 2016;4(7):e453-63.
11. van Doorslaer K, Li Z, Xirasagar S, Maes P, Kaminsky D, Liou D, et al. The Papillomavirus Episteme: A major update to the papillomavirus sequence database. Nucleic Acids Res [Internet]. 1 de enero de 2017 [citado 21 de enero de 2023];45(D1):D499-506. Disponible en: <https://pave.niaid.nih.gov/index>
12. Kavanagh K, Pollock KG, Cuschieri K, Palmer T, Cameron RL, Watt C, et al. Changes in the prevalence of human papillomavirus following a national bivalent human papillomavirus vaccination programme in Scotland: a 7-year cross-sectional study. Lancet Infect Dis. 1 de diciembre de 2017;17(12):1293-302.
13. Walker PJ, Siddell SG, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Adriaenssens EM, Alfenas-Zerbini P, et al. Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). Arch Virol [Internet]. 1 de noviembre de 2022 [citado 26 de enero de 2023];167(11):2429-40. Disponible en: <https://ictv.global/taxonomy>
14. Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K V, et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. N Engl J Med. 2003;348:518-45.
15. Xiaojiang S. Chen, Robert L. Garcea, Ilya Goldberg, Gregory Casini, Stephen C. Harrison. Structure of Small Virus-like Particles Assembled from the L1 Protein of Human Papillomavirus 16. 1 de marzo de 2000;557-67.
16. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. Vol. 25, Reviews in Medical Virology. John Wiley and Sons Ltd; 2015. p. 2-23.
17. Sehnal D, Bittrich S, Deshpande M, Svobodová R, Berka K, Bazgier V, et al. Mol\*Viewer: Modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. Nucleic Acids Res. 2 de julio de 2021;49(W1):W431-7.
18. Santos-López G, Márquez-Domínguez L, Reyes-Leyva J, et al. Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2015;53(Suppl: 2):166-171.
19. AEPC. Infección por el VPH [Internet]. [citado 1 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.aepcc.org/infeccion-por-el-vph/>
20. Mac M, Moody CA. Epigenetic regulation of the human papillomavirus life cycle. Vol. 9, Pathogens. MDPI AG; 2020. p. 1-18.

21. Pal A, Kundu R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. Vol. 10, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
22. Gheit T. Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. Vol. 9, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
23. McBride AA. The Papillomavirus E2 proteins. *Virology*. octubre de 2013;445(1-2):57-79.
24. Burk RD, Chen Z, Saller C, Tarvin K, Carvalho AL, Scapulatempo-Neto C, et al. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature*. 16 de marzo de 2017;543(7645):378-84.
25. Kurg R. The Role of E2 Proteins in Papillomavirus DNA Replication [Internet]. *DNA Replication-Current Advances*. InTech; 2011. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5772/19609>
26. Cheng L, Wang Y, Du J. Human papillomavirus vaccines: An updated review. Vol. 8, *Vaccines*. MDPI AG; 2020. p. 1-15.
27. Shanmugasundaram S, You J. Targeting persistent human papillomavirus infection. Vol. 9, *Viruses*. MDPI AG; 2017.
28. Tang J, Li M, Zhao C, Shen D, Liu L, Zhang X, et al. Therapeutic DNA Vaccines against HPV-Related Malignancies: Promising Leads from Clinical Trials. Vol. 14, *Viruses*. MDPI; 2022.
29. Choi YJ, Hur SY, Kim TJ, Hong SR, Lee JK, Cho CH, et al. A phase II, prospective, randomized, multicenter, open-label study of GX-188E, an HPV DNA vaccine, in patients with cervical intraepithelial neoplasia 3. *Clinical Cancer Research*. 1 de abril de 2020;26(7):1616-23.
30. Rosales R, López-Contreras M, Rosales C, Magallanes-Molina JR, Gonzalez-Vergara R, Arroyo-Cazarez JM, et al. Regression of human papillomavirus intraepithelial lesions is induced by MVA E2 therapeutic vaccine. *Hum Gene Ther*. 1 de diciembre de 2014;25(12):1035-49.
31. Martín W, Echeverría A. Vacunación contra el virus del papiloma humano. 2013;40(2):167-74.
32. Zhao RY. Yeast for virus research. Vol. 4, *Microbial Cell*. Shared Science Publishers OG; 2017. p. 311-30.
33. Galao RP, Scheller N, Alves-Rodrigues I, Breinig T, Meyerhans A, Díez J. *Saccharomyces cerevisiae*: A versatile eukaryotic system in virology. Vol. 6, *Microbial Cell Factories*. 2007.
34. Angeletti PC, Kim K, Fernandes FJ, Lambert PF. Stable Replication of Papillomavirus Genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol*. abril de 2002;76(7):3350-8.
35. Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One*. 5 de noviembre de 2008;3(11).
36. Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One*. 2011;6(2).
37. Lee ME, DeLoache WC, Cervantes B, Dueber JE. A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. *ACS Synth Biol*. 18 de septiembre de 2015;4(9):975-86.
38. Yeast Toolkit Primer Design Tool. [https://ytkprimerdesign.shinyapps.io/ytk\\_primer\\_design/](https://ytkprimerdesign.shinyapps.io/ytk_primer_design/).
39. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Vol. 9, *Nature Methods*. 2012. p. 671-5.
40. Struhl K, Stinchcomb DT, Scherer S, Davis RW. High-frequency transformation of yeast: Autonomous replication of hybrid DNA molecules (recombinant DNA/cloning vector/yeast plasmid/eukaryotic genetics/minichromosome). Vol. 76, *Biochemistry*. 1979.
41. Anacker D, Moody C. Generation of organotypic raft cultures from primary human keratinocytes. *Journal of Visualized Experiments*. 22 de febrero de 2012;(60).
42. Taddei A, Gasser SM. Structure and function in the budding yeast nucleus. Vol. 192, *Genetics*. 2012. p. 107-29.
43. Van Tine BA, Dao LD, Wu SY, Sonbuchner TM, Lin BY, Zou N, et al. Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. 2004;101(12):4030-5.
44. Parish JL, Kowalczyk A, Chen HT, Roeder GE, Sessions R, Buckle M, et al. E2 Proteins from High- and Low-Risk Human Papillomavirus Types Differ in Their Ability To Bind p53 and Induce Apoptotic Cell Death. *J Virol*. mayo de 2006;80(9):4580-90.
45. Bellanger S, Demeret C, Goyat S, Thierry F. Stability of the Human Papillomavirus Type 18 E2 Protein Is Regulated by a Proteasome Degradation Pathway through Its Amino-Terminal Transactivation Domain. *J Virol*. 15 de agosto de 2001;75(16):7244-51.
46. Feeney KM, Saade A, Okrasa K, Parish JL. In vivo analysis of the cell cycle dependent association of the bovine papillomavirus E2 protein and ChlR1. *Virology*. 25 de mayo de 2011;414(1):1-9.