



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

**LVM**

Laboratorio de Virología Molecular  
Centro de Investigaciones Nucleares  
Facultad de Ciencias  
UdelaR, Uruguay



**FACULTAD DE  
CIENCIAS**

UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

**TESINA DE GRADO**

**LICENCIATURA EN BIOQUIMICA**

# **Expresión de retrovirus endógenos HERV-K (HML-2) en diferentes ambientes celulares**

**RODRIGO ARCE RAMA**

**Orientadora: Dra. Natalia Echeverría**

**Co-orientadora: Dra. Pilar Moreno**

**Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones  
Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República**

**Montevideo, Uruguay**

**2020**

## Resumen

Los retrovirus endógenos son remanentes genéticos de infecciones retrovirales ancestrales de la línea germinal que han sido transmitidos de generación en generación hasta nuestros días.

Hoy en día sabemos que aproximadamente un 8% de nuestro genoma está formado por secuencias derivadas de estas infecciones retrovirales ancestrales, algunos de los cuales continúan expresándose y generan proteínas que poseen marcos de lectura abiertos. Muchas de estas proteínas están asociadas a enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas así como a diversos tipos de cáncer. También se han encontrado sobre-expresadas ante la infección con otros tipos de virus, como por ejemplo VIH.

En este estudio se buscó analizar la expresión génica de los HERV-K, específicamente determinando la expresión relativa de los oncogenes *rec* y *np9* mediante cuantificación relativa por PCR a tiempo real. Estos genes producen proteínas que se encuentran asociadas a la pérdida de la regulación del ciclo celular. Con el fin de determinar si se sobre-expresan en ambientes celulares transformados, se analizó su expresión en diversas líneas celulares tumorales y se comparó con la expresión en glóbulos blancos provenientes de donantes sanos. Además se analizó la expresión en una línea celular derivada de hepatocarcinoma que fue transfectada con el ARN del virus de la Hepatitis C con el fin de determinar si la infección con este virus activa la expresión de estos genes.

Los resultados indican que estos genes se expresan a niveles similares tanto en las líneas celulares tumorales analizadas como en donantes sanos. Asimismo no se observan cambios significativos en la expresión frente a una transfección con el virus de la Hepatitis C.

Finalmente, mediante clonación se generó un vector de expresión para el gen *np9* con la perspectiva a futuro de producir la proteína Np9 de manera recombinante o bien realizar ensayos de funcionalidad en cultivo celular.

## Agradecimientos

Me gustaría agradecerles a Naty y Pili por haberme abierto las puertas del laboratorio y dejarme acercar a la virología, la principal razón por la que seguí estudiando esta carrera. A Naty por la paciencia, por estar siempre aconsejándome, enseñándome cosas nuevas, formándome como científico, apoyando en todo frente a cualquier adversidad. A Pili por el aliento e impulsarme para que no me dé por vencido con los exámenes.

A ... por la buena disposición a corregirme la tesina.

A Fabi, Varo, Noel, Pau, Gonza, Lompa y Juan que, más allá de ayudarme en el día a día con dudas que me surgen, son un gran grupo humano y es un gustazo trabajar y aprender de y con ustedes.

A los tortus; Gonza, Tincho y el Garra que fueron un motor en gran parte de la carrera y con quienes me llevo grandes recuerdos. También a Ana, Caro y muchos otros compañeros que hicieron más divertida y amena esta etapa.

A Chevi, Juanito, Coni, Andu, Mate, Fran, Creche, Gare; Malaca y muchos otros amigos que me hacen siempre el aguante. Especialmente a Chevi por todas las birras que hicimos y por ser el que incitó a que elija esta profesión.

A Lololo, Toto, Eli y Lars por ser parte de un año muy importante en mi vida.

A Ana, Marc y papá y toda mi familia catalana por el aguante, la buena onda y el cariño que me hacen llegar a la distancia.

A mi familia de acá, los primillos, la marrina, los tíos y toda la familia por el aguante a pesar de que no entiendan lo que hago. Por el cariño y ser familia. A los abuelos por el aliento y que gracias a ellos tengo las posibilidades que tuve y a Lucía, que por más que a veces seamos como perro y gato tenemos una gran hermandad.

A mamá, gracias por TODO y más má. Este logro no es solo mío.

## Tabla de contenido

1) Introducción .....	1
1.1) Retrovirus endógenos.....	1
1.2) Familia HERV-K.....	4
1.3) HERV-K (HML-2) y cáncer.....	6
1.4) Infecciones virales y HERVs.....	8
1.5) Virus de la Hepatitis C y HERVs.....	8
2) Objetivos.....	10
2.1) Objetivo general.....	10
2.2) Objetivos específicos .....	10
3) Materiales y métodos.....	11
3.1) Líneas celulares humanas tumorales .....	11
3.1.1) Línea celular HeLa de cáncer cérvico-uterino .....	11
3.1.2) Línea celular Jurkat de leucemia linfoide aguda.....	11
3.1.3) Líneas celulares PC-3 y LNCaP de cáncer de próstata.....	11
3.1.4) Líneas celulares HepG2 y Huh7.5 derivadas de HCC.....	11
3.2) Línea celular Huh7.5 transfectada con ARN viral .....	12
3.3) Líneas celulares no humanas derivadas de tejidos normales.....	12
3.3.1) Línea celular VERO de riñón de <i>Cercopithecus aethiops</i> .....	12
3.3.2) Línea celular MDCK de riñón de <i>Canis familiaris</i> .....	12
3.4) Cultivo y manipulación de líneas celulares .....	12
3.5) Glóbulos blancos provenientes de donantes sanos.....	13
3.6) Extracción de ARN.....	13
3.7) Repurificación de ARN contaminado con fenoles.....	14
3.8) Tratamiento con ADNasa.....	14
3.9) Retrotranscripción (RT).....	15
3.10) Diseño de <i>primers</i> para <i>np9</i> .....	15
3.11) Puesta a punto de PCRs de los genes $\beta$ -actina y <i>np9</i> .....	18
3.12) Cuantificación relativa de la expresión de HERV-K mediante PCR a tiempo real .....	19

3.13)	RT-PCR a tiempo final para detectar VHC en células transfectadas.....	20
3.14)	Generación de un vector de expresión de Np9 .....	21
3.14.1)	Amplificación, purificación y digestión del gen <i>np9</i> .....	21
3.14.2)	Digestión del vector de expresión p3x-FLAG-CMV-14 .....	22
3.14.3)	Ligación .....	22
3.14.4)	Transformación y plaqueo, selección y crecimiento de colonias, y purificación de plásmidos.....	23
3.14.5)	Verificación de inserto y secuenciación de plásmidos .....	23
4)	Resultados y discusión .....	24
4.1)	Procesamiento de muestras.....	24
4.2)	Detección de <i>np9</i> con <i>primers</i> diseñados en el marco de esta tesina.....	27
4.2.1)	Reconstrucción del ARNm de <i>np9</i> .....	27
4.2.2)	Búsqueda y evaluación de <i>primers</i> específicos de <i>np9</i> en la literatura.....	27
4.2.3)	Diseño de <i>primers</i> <i>np9</i> -1 y puesta a punto de amplificación por PCR a tiempo final y a tiempo real .....	29
4.2.4)	Diseño y puesta a punto de amplificación por PCR a tiempo final y a tiempo real con juego de <i>primers</i> <i>np9</i> -3 .....	32
4.2.5)	Puesta a punto de la PCR a tiempo final para amplificar el ORF completo para clonado.....	33
4.2.6)	Análisis de secuencias de productos amplificados .....	34
4.2.7)	Puesta a punto de los <i>primers</i> extraídos de la literatura.....	35
4.3)	Expresión relativa de retrovirus endógenos en distintas líneas celulares.....	37
4.4)	Expresión relativa de retrovirus endógenos en líneas transfectadas con VHC.....	40
4.5)	Generación del vector de expresión de <i>np9</i> .....	44
5)	Conclusiones .....	51
6)	Perspectivas .....	52
7)	Referencias bibliográficas.....	53
8)	Apéndices .....	61

8.1) Apéndice 1 - Análisis de expresión relativa en líneas celulares no humanas.....	61
8.2) Apéndice 2 - Control de digestión: Digestión del vector DL-HCV-1b-F .....	63
9) Anexos.....	64
9.1) Anexo 1 – Pasaje de líneas celulares .....	64
9.2) Anexo 2 – Congelamiento de líneas celulares para stock.....	65
9.3) Anexo 3 – Conteo de células en cámara de Neubauer .....	66
9.4) Anexo 4 – Extracción de ARN con TRIzol.....	67
9.5) Anexo 5 – Vector de expresión DL-HCV-1b-F .....	69
9.6) Anexo 6 – Vector de expresión eucariota p3x-FLAG-CMV-14 .....	70

# 1) Introducción

## 1.1) Retrovirus endógenos

Los retrovirus constituyen un diverso grupo de virus animales cuyo genoma está compuesto por ácido ribonucleico (ARN). Estos virus comparten dos características fundamentales:

- 1) invierten el orden en el que naturalmente fluye la información genética en los sistemas biológicos, ya que son virus de ARN que necesitan de una transcriptasa reversa para convertir este ARN en ácido desoxirribonucleico (ADN).
- 2) integran su genoma en el genoma del hospedero.

Los retrovirus que integran su genoma a células somáticas se denominan retrovirus exógenos y son transmitidos solamente de manera horizontal. Por el contrario, los retrovirus endógenos (ERVs por su sigla en inglés) son remanentes genéticos de infecciones retrovirales ancestrales de la línea germinal que han sido transmitidos de generación en generación (verticalmente) hasta nuestros días (Varmus & June, 1988).

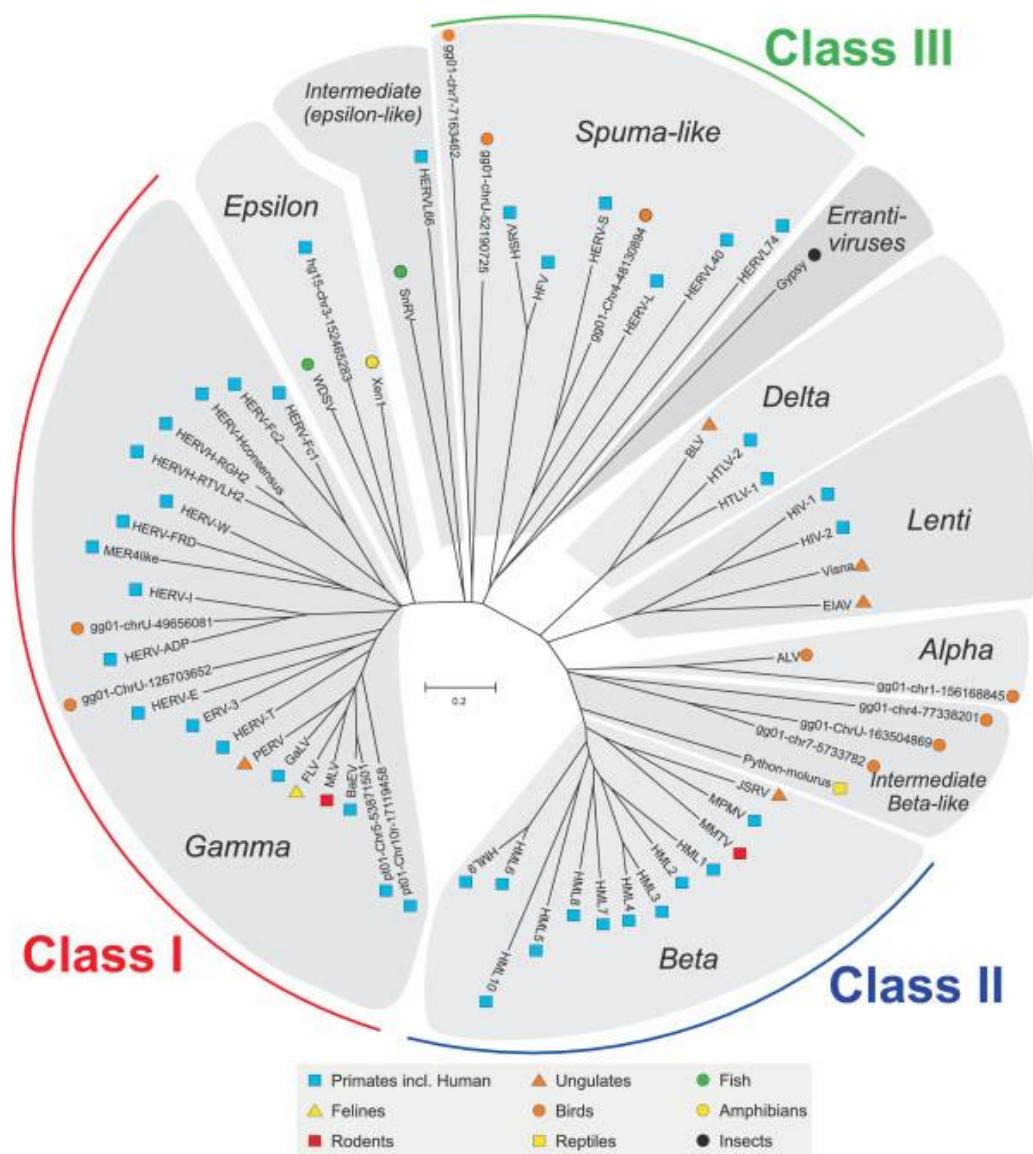
Hoy en día sabemos que aproximadamente un 8% de nuestro genoma está formado por secuencias derivadas de estas infecciones retrovirales ancestrales (Lander et al., 2001), y, si bien la mayoría de estas secuencias son defectivas por acumulación de mutaciones deletéreas que impiden su transcripción, algunos continúan teniendo marcos de lectura abiertos y pueden expresar y generar proteínas (Ehlhardt et al., 2006). Un ejemplo es la sincitina, una proteína que juega un papel fundamental en el desarrollo de la placenta humana (Blond et al., 2000; Mi et al., 2000).

Estructuralmente, los ERVs humanos (HERVs) existen en el genoma en formas provirales (genomas de ADN viral integrados en el genoma de ADN celular) y comparten la estructura genómica universal de todos los retrovirus: 5'LTR- *gag*- *pro*- *pol*- *env*- 3'LTR aunque su estructura completa es difícil de encontrar debido a que, con el paso del tiempo, muchas secuencias han sido eliminadas o mutadas. El gen *gag* codifica para las proteínas estructurales de la matriz, la cápside y la nucleocápside; *pro* codifica para la proteasa; *pol* para la transcriptasa reversa y la integrasa; y *env* para las proteínas de la envoltura. Los LTRs (repetición terminal larga, por sus siglas en inglés) flanquean los extremos 5' y 3' del provirus, poseen elementos promotores y potenciadores por lo que cumplen importantes funciones reguladoras para la transcripción y

poliadenilación del ARN transcripto (Bannert & Kurth, 2004; Downey et al., 2015; Kovalskaya et al., 2006).

Los retrovirus endógenos se clasifican en 3 clases basándose en su similitud de secuencia con los géneros en que se han clasificado los retrovirus exógenos, aunque la mayoría de estos virus son muy diferentes al género retroviral asignado (Griffiths, 2001). Los HERVs que se agrupan filogenéticamente junto con el grupo de los Gammaretrovirus son los denominados de clase I (incluye HERV-E y HERV-H, entre otros subgrupos). Los que se agrupan junto con los Betaretrovirus son los denominados de clase II (incluye HERV-K) y los que se agrupan con los Spumavirus son los denominados de clase III (incluye HERV-L y HERV-S) (Figura 1).





**Figura 1. Dendrograma sin raíz representativo de los siete géneros de retrovirus exógenos y las tres clases de retrovirus endógenos.** Análisis filogenético sin raíz del gen *pol* por el método Neighbor Joining (NJ) (500 *bootstrap*) de los siete géneros retrovirales: alfa, beta, gamma, delta, epsilon, lenti y spuma-virus. En la periferia se indica a qué clase pertenecen los HERVs agrupados con los diferentes géneros de retrovirus Figura extraída de Jern et al., 2005.

La nomenclatura para nombrar a los HERVs deriva del ARN de transferencia (ARNt) que se une al sitio de unión al cebador de la transcriptasa reversa (Cohen & Larsson, 1988). Así es que, si el primer ARNt que se une al ribosoma para comenzar la síntesis proteica codifica

para una lisina, cuyo código aminoacídico de una letra es K, ese HERV se nombrará HERV-K.

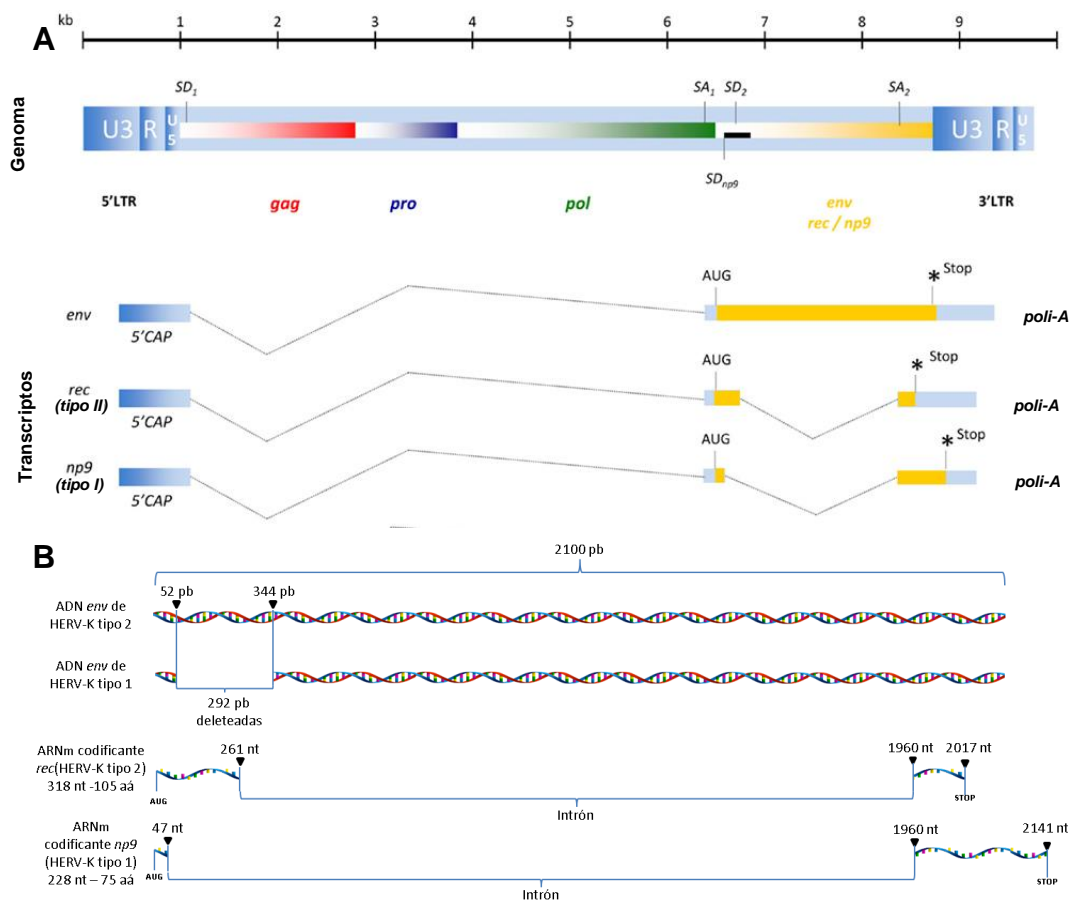
## 1.2) Familia HERV-K

Los HERVs de tipo K (HERV-K) pertenecen filogenéticamente a la Clase II de retrovirus endógenos o supergrupo *Betaretrovirus-like*. Es la familia de retrovirus endógenos más jóvenes incluyendo miembros que se encuentran únicamente en humanos y simios (Barbulescu et al., 1999).

Esta familia se clasifica en 10 grupos denominados HML-1 al 10 basándose en la secuencia del gen de la transcriptasa reversa (*rt*) (García-Montojo et al 2018); asimismo se ha descrito un grupo filogenéticamente emparentado pero distante al clado HML-2, el que ha sido propuesto como un nuevo grupo denominado HML-11 (Subramanian et al., 2011). HML se debe a “*human MMTV-like*” debido a su parecido con el virus del tumor mamario murino (MMTV, por sus siglas en inglés). El grupo HML-2 es el que se encuentra más activo por encontrarse más preservado genéticamente dado que mantiene marcos abiertos de lectura que codifican proteínas funcionales a partir de sus genes *gag* (matriz y proteínas del núcleo), *pro* (proteasa), *pol* (polimerasa) y *env* (envoltura) (Vargiu et al., 2016). A su vez, el grupo HML-2 se clasifica en dos tipos: 1 y 2, los cuales se diferencian en una delección de 292 pares de bases (pb) en la unión de los genes *pol-env*.

Se han descrito 4 transcriptos como productos de transcripción de los HERV-K (HML-2) (Hohn et al., 2013). El primer transcripto contiene 3 marcos de lectura y codifica para las poliproteínas de Gag, Pro y Pol. *Gag* es el primer ORF en traducirse y es el único que posee un codón de inicio, dado que *pro* y *pol* se traducen mediante un desplazamiento del marco de lectura. Por otra parte, *Env* es codificada por otro transcripto y por *splicing* alternativo de este ARN mensajero (ARNm) se pueden generar dos transcriptos diferentes dependiendo de si el HERV-K (HML-2) es de tipo 1 o 2. Como se muestra en la Figura 2, si el *splicing* ocurre en un *env* de un HERV-K (HML-2) de tipo 2, se produce un ARNm que codifica para una proteína llamada Rec, cuya función es unirse al transcripto viral inmaduro para facilitar su transporte núcleo-citoplasma (Wodrich & Kräusslich, 2001), una función análoga a la proteína Rev del Virus de Inmunodeficiencia Humano (VIH) y de la proteína Rex del Virus de la Leucemia de células T humanas (HTLV) (Lower et al., 1995). Mientras que a partir del *splicing* de los HML-2 de tipo 1 se produce un ARNm que codificará para una proteína de aproximadamente 9 kDa llamada Np9

(*nuclear protein of 9 kDa*), cuya función viral se desconoce, aunque se sabe que es capaz de translocarse al núcleo donde activa diversas vías oncogénicas (Armbreuster et al., 2002). Np9 comparte los primeros 14 aminoácidos (aa) con Env y Rec. A pesar de que estas oncoproteínas se asocian a enfermedades, se ha encontrado que los transcritos (*rec* y *np9*) también están presentes en diversos tejidos humanos normales (Schmitt et al., 2015).



**Figura 2. Secuencias de los HERV-K (HML-2) a nivel genómico y transcripcional. (A) Estructura proviral de los HERV-K y los ARNm provenientes de *env*.** Adaptada de Hohn et al., 2013. **(B) Comparación de *env* de HERV-K (HML-2) de tipo 1 y tipo 2 a nivel de ADN y de los ARNm codificantes (*np9* y *rec*).** Los números sobre las flechas negras indican la distancia en pares de bases (pb) o nucleótidos (nt) de la que se encuentra el codón de inicio de la región codificante en el ADN. Esta imagen fue diseñada en el marco de esta tesina de grado.

### **1.3) HERV-K (HML-2) y cáncer**

Desde su descubrimiento los HERVs se han asociado al cáncer tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional y con el paso de los años la asociación de los HERV-K (HML-2) se ha evidenciado en diferentes tipos de cáncer. A la fecha hay evidencia de una activación en cáncer de mama (Davari Ejthadi et al., 2005; Wang-Johanning et al., 2003; Zhao et al., 2011), de ovario (Heidmann et al., 2017; Wang-Johanning et al., 2007), de próstata (Goering et al., 2011), tumores de la línea germinal (Kleiman et al., 2004), melanomas (Singh et al., 2009), leucemias (Depil et al., 2002; Fischer et al., 2014; Iwabuchi et al., 2004) y linfomas (Fava et al., 2016; Gitlin et al., 2008).

La expresión de los genes de retrovirus endógenos está bajo el control de sus LTRs. Los LTRs que se encuentran en una zona del genoma con mayor densidad génica son significativamente más activos que los que se encuentran en una zona con baja densidad génica (Buzdin et al., 2006). En consecuencia se pueden concluir dos cosas: la actividad de los HERV, en procesos patológicos, es promovida como un efecto secundario de su localización en regiones cromosómicas con alta actividad transcripcional o bien, los LTRs virales activos contribuyen funcionalmente a la regulación de genes humanos de una manera beneficiosa (Pérot et al., 2012). Los LTRs presentan una alta identidad de secuencia por lo que existe la posibilidad de que estas secuencias recombinen generando rearrreglos cromosómicos que podrían llevar a la translocación del LTR a una zona genómica indebida y actuar como promotor de genes que normalmente se encuentran muy regulados (Chaffanet et al., 1998; Tomlins et al., 2007). La expresión de HERVs también puede ser estimulada por esteroides (Hanke et al., 2013; Ono et al., 1987) y citoquinas (P. M. Schneider et al., 2001). Adicionalmente se ha visto que las regiones de ADN de HML-2 de diversas líneas celulares se encuentran hipometiladas, por ejemplo en líneas celulares de melanoma (Stengel et al., 2010), tumores de próstata (Goering et al., 2011), y tumores de ovario (Iramaneerat et al., 2011), por lo que el aumento de la transcripción de HERVs podría deberse a eso.

Es importante destacar que los HERV-K (HML-2) codifican para diversas proteínas que han sido reportadas como oncoproteínas virales debido a que se ha encontrado una asociación entre la expresión o sobre-expresión de estos genes virales y/o sus proteínas y la alteración de diversas vías de señalización del ciclo celular, lo cual puede llevar al desarrollo de cáncer (Armbruester et al., 2002; Chen et al., 2013; Lemaître et al., 2017).

Las oncoproteínas más estudiadas son Np9, Rec y Env cuya expresión se ha observado en diversos tipos de tumores, como cáncer de mama, de próstata, de piel o leucemias (Armbruester et al., 2002; Depil et al., 2002; Goering et al., 2015; Patzke et al., 2002).

Específicamente, se ha detectado la expresión de Np9 en diversos tejidos tumorales como cáncer de mama, cáncer de ovario y leucemia linfocítica crónica (Armbruester et al., 2002; Chen et al., 2013; Depil et al., 2002; Fischer et al., 2014; Singh et al., 2009).

En células mieloides y linfoblásticas de leucemia, la expresión de Np9 es fundamental para la supervivencia y el crecimiento de las mismas. Además, en estas células activa diversas vías de señalización como Wnt/ $\beta$ -catenina, c-myc/AKT, ras-ERK y Notch1 (Chen et al., 2013), vías que al activarse contribuyen a la proliferación celular y a la inmunosupresión (García-Montojo et al., 2018). Sumado a lo anterior, Np9 se une y regula la ubiquitina ligasa MDM2, cuya función en las células normales es mantenerse unida a la proteína p53. La unión a Np9 induce la ubiquitinación de MDM2, lo cual deriva en su degradación por el proteosoma. Dado que p53 es una proteína supresora de tumores, al liberarse de MDM2 actúa como factor de transcripción actuando sobre diversas vías regulatorias del ciclo celular, alterándolo (Heyne et al., 2015).

Asimismo, Np9 interacciona con la proteína en dedos de zinc de la leucemia promielocítica (PLZF de su sigla en inglés) y produce un aumento transcripcional de *c-myc* (factor de transcripción) que resulta en la inducción del crecimiento celular y la reducción de la apoptosis (Denne et al., 2007). La interacción, tanto de Np9 como de Rec con PLZF, se ha asociado al cáncer de próstata (Robinson et al., 2015). Rec también contribuye al cáncer de próstata al unirse a hSGT (*human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein*), un regulador del receptor de andrógenos. Esta unión promueve un aumento en la actividad de los receptores, lo cual se ha vinculado a la activación de los LTRs de HERV-K (HML-2). Todo lo expresado anteriormente podría promover la proliferación celular y la tumorigénesis (Hanke et al., 2013).

La expresión de *env* provenientes de HERV-K (HML-2) se ha asociado fuertemente al cáncer de seno (Wang-Johanning et al., 2001, 2003), no solo a nivel de ARN mensajero sino a nivel proteico también (Chen et al., 2013; Geng et al., 2010; Zhou et al., 2016)

Como hemos visto, ha sido reportada una fuerte asociación entre HERV-K y cáncer desde un punto de vista de desarrollo tumoral pero algunos autores evidencian que la expresión de HERV puede tener actividad antitumoral al activar respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas. Asociado a la respuesta inmune adaptativa las proteínas provenientes de retrovirus endógenos pueden funcionar como antígenos asociados a tumores dado que son capaces de activar una respuesta fuerte de los linfocitos T citotóxicos (Schiavetti et al., 2002) por lo que podrían ser utilizadas como blancos terapéuticos (Rycaj et al., 2015; Wang-Johanning et al., 2012). Por otra parte la expresión de retrovirus endógenos en ratones activa varios receptores de tipo *Toll* como el TLR-3, TLR-7 y TLR-9 que son receptores que reconocen ácidos nucleicos de origen exógeno (Yu et al., 2012), por lo que se activa una respuesta inmune innata.

#### **1.4) Infecciones virales y HERVs**

Las infecciones virales producen la desregularización del ciclo celular al activar y desactivar diversas vías de señalización. Se ha visto que las infecciones por virus como el virus linfotrópico de células T humanas (Toufaily et al., 2011), virus de la inmunodeficiencia humana (Contreras-Galindo et al., 2007), virus del sarcoma de Kaposi (Dai et al., 2018) o virus de Epstein-Barr (Sutkowski et al., 2004), llevan a la activación de la expresión de retrovirus endógenos y de sus LTRs. Además ha sido reportado el aumento la expresión de los HERV-W frente a infecciones con Influenza A y virus del herpes simple-1 (HSV-1) (Nellåker et al., 2006) y la sobre-expresión de transcritos de *env* en células HepG2 es inducida por la proteína X del virus de la Hepatitis B (VHB) (Liu et al., 2017).

#### **1.5) Virus de la Hepatitis C y HERVs**

Recientemente un trabajo realizado por Tovo y cols. (2020) ha evidenciado que existe una asociación entre la infección por el virus de la Hepatitis C y la sobre-expresión del gen *pol* de retrovirus endógenos, incluso esta sobre-expresión persiste en pacientes luego del *clearance* viral inducido por drogas antivirales directas (Tovo et al., 2020).

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae*, género *Hepacivirus*, por lo que su genoma es ARN monocatenario con polaridad positiva. Este genoma tiene 9600 nucleótidos de longitud y codifica para una poliproteína que es clivada en

10 proteínas, 3 estructurales y 7 no estructurales. Si bien VHC es capaz de infectar diversos tipos de células del sistema inmune, es un virus principalmente hepatotrópico ya que su blanco principal son los hepatocitos.

La infección suele ser generalmente asintomática al comienzo y en el 15-25% de los casos se resuelve espontáneamente en los primeros 6 meses de la infección (Manns et al., 2017; L. S. Wang et al., 2016). El 75-85% de los casos restantes, progresa a una infección crónica, la cual puede resultar en el desarrollo de fibrosis hepática, cirrosis y hepatocarcinoma celular (HCC).

El proceso de carcinogénesis hepática se da en varias etapas asociadas a distintas alteraciones genéticas que derivan en la transformación maligna del hepatocito. En este proceso se genera proliferación y diferenciación celular, inflamación, estrés oxidativo y angiogénesis. La asociación entre VHC y el desarrollo de HCC es bastante confusa, no obstante se ha visto que hay varias proteínas virales que tienen efecto oncogénico al interferir en diversas vías de señalización en cultivo celular o ratones transgénicos (Lin et al., 2015).

El HCC es el sexto tipo de tumor maligno más prevalente y la tercera causa de muerte atribuida al cáncer a nivel mundial (Bravi et al., 2013). El desarrollo de HCC se da en varias etapas en las que diferentes alteraciones genéticas o epigenéticas influyen en diversas vías de señalización (Bertino et al., 2014). A nivel mundial, el 90% de los casos de HCC derivan de infecciones por el virus de la Hepatitis B (VHB) o el VHC así como del alcoholismo (El-Serag, 2012). Más de un 50% de los HCC son derivados de una infección con VHB como la causa principal. Mientras que la segunda causa son las infecciones por VHC y si bien representa un porcentaje menor en cantidad de HCC, resulta interesante de estudiar dado que no hay vacuna contra este virus y se estima que en las próximas décadas el HCC causado por VHC irá en aumento, al menos en los Estados Unidos (El-Serag, 2011).

Respecto a la asociación entre el HCC y la expresión de retrovirus endógenos se ha investigado muy poco, aunque un estudio indica que hay sobre-expresión de HERV-K (HML-2) en tejidos provenientes de HCC. Este estudio encuentra una asociación inversa entre el aumento de la expresión de retrovirus endógenos y la supervivencia de los pacientes con este tipo de cáncer (Ma et al., 2016).

## **2) Objetivos**

### **2.1) Objetivo general**

Contribuir al conocimiento sobre la expresión de retrovirus endógenos humanos en diferentes contextos celulares tumorales en comparación con células de donantes sanos. Además nos interesa en particular estudiar si la infección por el virus de la Hepatitis C es capaz de inducir un aumento en la expresión de HERVs que pueda acercarse al mecanismo de oncogenicidad de este virus. Asimismo se plantea, con el fin de poder realizar en un futuro estudios de expresión de la proteína Np9, colaborar con los primeros pasos de la producción de la proteína Np9 recombinante, etapa fundamental para la producción de anticuerpos Anti Np9 a ser utilizados en estudios de expresión.

### **2.2) Objetivos específicos**

1. Analizar la expresión de retrovirus endógenos por PCR en tiempo real en diferentes líneas celulares tumorales (Huh7.5, HepG2, HeLa, Jurkat, PC-3, LNCaP) y comparar estos resultados con la expresión en glóbulos blancos provenientes de donantes sanos.
2. Analizar mediante PCR en tiempo real si la infección por el virus de la hepatitis C activa la expresión de retrovirus endógenos en cultivos de células Huh7.5 transfectados con el clon infeccioso de VHC.
3. Generar un vector de expresión para el gen *np9* mediante clonado basado en el uso de sitios de restricción.



### **3) Materiales y métodos**

#### **3.1) Líneas celulares humanas tumorales**

Con el fin de comparar los niveles de expresión de HERVs en distintos contextos celulares tumorales, se emplearon diferentes líneas celulares humanas derivadas de diversos tipos de tumores:

**3.1.1) Línea celular HeLa de cáncer cérvico-uterino** (Scherer et al., 1953). Línea proveniente de un adenocarcinoma de una mujer de raza negra de 31 años. Las células se caracterizan por tener morfología epitelial y propiedades adherentes en cultivo. Además, tienen integrado en su genoma los genes E6 y E7 del virus de papiloma humano.

**3.1.2) Línea celular Jurkat de leucemia linfoide aguda** (U. Schneider et al., 1977). La línea proviene de una leucemia aguda de linfocitos T de un varón de 14 años. Se caracteriza por su morfología tipo linfoide y se cultivan en suspensión.

**3.1.3) Líneas celulares PC-3 y LNCaP de cáncer de próstata.** La línea PC-3 (Kaighn et al., 1979) proviene de un adenocarcinoma derivado de una metástasis de hueso de un hombre caucásico de 62 años. La morfología de las PC-3 es epitelial y se caracterizan por ser adherentes en cultivo aunque pueden ser cultivadas en agar blando donde crecen en forma de colonias. La línea LNCaP (Horoszewicz et al., 1980) es un carcinoma derivado de una metástasis del nódulo linfático subclavari izquierdo de un hombre adulto caucásico de 50 años. Se caracterizan por tener morfología epitelial y son adherentes. Al ser cultivadas crecen de manera individual y agrupadas.

**3.1.4) Líneas celulares HepG2 y Huh7.5 derivadas de HCC.** La línea Huh7.5 (Blight et al., 2002) corresponde a un clon derivado de la línea Huh7 que se caracteriza por su permisividad a la replicación de ARN genómico y subgenómico del VHC (Nakabayashi et al., 1982). Originalmente proviene de HCC de un paciente japonés de sexo masculino con hepatitis fulminante. Crecen en monocapa. La línea HepG2 (Knowles & Aden, 1983) proviene de un paciente varón caucásico de 15 años. Sus células se caracterizan por su morfología epitelial y por crecer adherentes en pequeños cúmulos de células.

### **3.2) Línea celular Huh7.5 transfectada con ARN viral.**

Además, con el fin de determinar si la infección con VHC podría promover un cambio en la expresión de HERVs, se trabajó con células Huh7.5 transfectadas con el ARN del clon infeccioso de VHC (J6/JFH-clon 2) y células transfectadas *Mock* (solamente con el reactivo de transfección que consistió en *Lipofectamine 2000*, Invitrogen). Las células estudiadas correspondieron al día 16 post-transfección (día en el cual se logra observar efecto citopático) y fueron cedidas por mi tutora, la Dra. Natalia Echeverría, quien realizó la transfección en el marco de su proyecto de doctorado (Echeverría, 2019).

### **3.3) Líneas celulares no humanas derivadas de tejidos normales**

Se emplearon como controles donde la expresión de HERVs debería ser nula ya que evolutivamente, debido al momento de su integración a los genomas de los hospederos, deberían de encontrarse únicamente en el linaje humano.

**3.3.1) Línea celular VERO de riñón de *Cercopithecus aethiops*** (Yasumura & Kawakita, 1963). Proviene del tejido epitelial normal de riñón de mono verde africano. Estas células se caracterizan por tener morfología epitelial y propiedades adherentes en cultivo.

**3.3.2) Línea celular MDCK de riñón de *Canis familiaris*.** Es una línea celular derivada de tejido epitelial normal de riñón de perro. Estas células se caracterizan por tener morfología epitelial y propiedades adherentes en cultivo.

### **3.4) Cultivo y manipulación de líneas celulares**

Si bien se extrajo el ARN de todas las líneas mencionadas anteriormente para los estudios de expresión de HERVs, en el marco de esta tesina de grado solamente se cultivaron las células Huh7.5 y HepG2, las cuales fueron mantenidas en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco, Grand Island, New York, USA) suplementado con 5% y 10% de suero fetal bovino (SFB) (HyClone, ThermoScientific, South Logan, Utah, USA), respectivamente. Además, los medios fueron suplementados con 0.1mM de aminoácidos no esenciales (NEAA, del inglés: *Non-essential amino acids*, Gibco, Grand Island, New York, USA) y 1% de

penicilina/estreptomicina. El cultivo fue realizado en estufa bajo condiciones estándar de cultivo celular a 37 °C con atmósfera 5% de CO<sub>2</sub>.

Los pasajes de células se realizaron cuando la confluencia alcanzó un 80-90% (Anexo 1). Además, tras varios pasajes se congelaron stocks de células (Anexo 2) previo conteo celular (Anexo 3).

Las restantes líneas celulares fueron cultivadas por otros miembros del laboratorio y fueron cedidas resuspendidas en 100µl de PBS 1X para su uso en el marco de esta tesina.

### **3.5) Glóbulos blancos provenientes de donantes sanos**

Con el fin de poder comparar la expresión de HERVs con tejidos humanos no tumorales, se reclutaron 10 donantes sanos que acudieron al Servicio Nacional de Sangre (SNS). La extracción de sangre fue realizada por personal del SNS y para el estudio se siguieron guías éticas nacionales e internacionales (buenas prácticas clínicas y la Declaración de la Asociación Médica Mundial de Helsinki). La información personal de los individuos reclutados es confidencial y su acceso fue restringido al personal médico de la institución. A partir de sangre entera se procedió a la lisis de eritrocitos de manera de obtener glóbulos blancos para su estudio. Se partió de 2 o 3 mL, dependiendo de la muestra, de sangre periférica sin suero con EDTA. Para lisar los glóbulos rojos, se le agregaron 20 mL de solución lisante fría (MgCl<sub>2</sub> 5 mM) y se centrifugó por 10 minutos (min) a 3000 rpm (centrífuga Hermle Labortechnik Z200A). El sobrenadante fue descartado, se agregaron nuevamente 20 mL de solución lisante y se centrifugó. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de PBS para luego volver a centrifugar. El sobrenadante fue descartado y el pellet se resuspendió en 400 µl de Dulbecco's PBS 1x (Gibco, Grand Island, New York, USA). A partir de estos glóbulos blancos se realizó la extracción de ARN.

### **3.6) Extracción de ARN**

Las extracciones de ARN se realizaron utilizando dos protocolos diferentes, dependiendo de las muestras.

- a) La extracción de ARN realizada a partir de células provenientes de cultivo celular, así como de los glóbulos blancos de los donantes sanos fue realizada mediante el método del *TRIzol LS*

*reagent* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) según instrucciones del proveedor (Chomczynski & Sacchi, 1987) (Anexo 4). Al momento de la precipitación del ARN se agregó 1 µL de *GlycoBlue* (Invitrogen, Vilna, Lituania) a cada una de las muestras para colorear el pellet y tornarlo más visible.

- b) La extracción de ARN de muestras derivada de la Línea celular Huh7.5 transfectada con ARN viral fue realizada empleando el kit comercial *Quick RNA™ Miniprep Plus Kit* (Zymo Research, Irvine, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor.

### **3.7) Repurificación de ARN contaminado con fenoles**

Las muestras de ARN extraídas con TRIzol cuyo *ratio* de absorbancia 260nm/230nm era menor a 1.8 fueron repurificadas por precipitación. Para ello se agregó 0.1 volúmenes de acetato de sodio (3 M, pH 5.2) a cada muestra y se dejaron incubar por 5 minutos en hielo. Se agregó 2.5 volúmenes de etanol al 100% frío y 0.5 µL de *GlycoBlue* (Invitrogen, Vilna, Lituania). Se dejaron incubar a -20°C por 30 min y luego fueron centrifugadas a 14000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado, se lavó el pellet con alcohol al 70% frío y fue centrifugado a 14000 g por 15 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se repitió el paso de lavado. Finalmente se volvió a descartar el sobrenadante y se secó el pellet en termobloque a 40°C. El pellet fue resuspendido en 20-50 µL de agua libre de ARNasas, dependiendo del origen de la muestra. Para favorecer la solubilización del ARN, se calentó la suspensión a 55-60°C por 10-15 min. Se verificó que la purificación había sido realizada con éxito al medir la absorbancia a 260, 230 y 280 nm utilizando un espectrofotómetro *Eppendorf BioSpectrometer®* y al calcular los *ratios* de absorbancia 260nm/280nm (aceptándose un coeficiente de ~2) y 260nm/230nm (aceptándose un coeficiente de 1,8 – 2).

### **3.8) Tratamiento con ADNasa**

A los ARN extraídos se les realizó un tratamiento con ADNasa para eliminar ADN cromosómico contaminante. Para ello se utilizó el kit *TURBO DNA-free* (Invitrogen, Vilna, Lituania) y se siguió el protocolo del fabricante. El volumen de reacción final de todos los tratamientos fue de 50 µL.

El éxito del tratamiento con ADNasa fue verificado con una PCR del gen *β-actina*, siguiendo protocolo que se detalla en la sección 3.11 pero

empleando ARN como molde, con excepción del control positivo de reacción, para el cual se empleó un ADN copia (ADNc). Posteriormente se verificaron los productos por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñidos con *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, Madison, USA).

### **3.9) Retrotranscripción (RT)**

Para generar ADNc de los ARNs extraídos, se realizó una RT con *random primers* hexaméricos empleando la enzima SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El ARN fue calentado a 65°C, para eliminar cualquier estructura secundaria que pudiera inhibir la retrotranscriptasa, y se mezclaron 5 µL de ARN con 2 µL de *random primers* hexaméricos 100 ng/µL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 µL de dNTPs (10mM cada uno), 4 µL de Buffer 5X First-Strand, 2µL de DTT (0.1M) , 1 µL de SuperScript II reverse transcriptase (200U/µL) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1 µL de RNaseOUT (40U/µL) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y 6 µL de agua ADNasa/ARNasa free (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), completando un volumen final de reacción de 20 µL. La retrotranscripción se realizó a 25°C por 10 min (hibridación de *random primers* hexaméricos), seguida de 42°C por 50 min (retrotranscripción), y luego la enzima fue inactivada a 70°C por 15 min.

El éxito de la retrotranscripción se verificó con una PCR del gen  $\beta$ -actina siguiendo protocolo que se detalla en la sección 3.11 y posterior electroforesis de productos en gel de agarosa al 1,5% teñidos con *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, Madison, USA).

### **3.10) Diseño de primers para np9**

A partir de la secuencia completa del HERV-K103 (Número de acceso NCBI: AF164611.1) y de la secuencia proteica de Np9 (Número de acceso NCBI: P61581.1) se reconstruyó la secuencia del mensajero de *np9*. A partir de ambas secuencias se diseñaron, teniendo en cuenta las regiones 5'UTR y 3'UTR, diferentes juegos de *primers* para analizar la expresión específica de *np9* (Tabla 1) y se modificó un juego de *primers* descritos en la literatura para amplificar el gen completo con una región con sitios de corte para enzimas de restricción EcoRI y BamHI (Armbruster et al., 2002) (Tabla 2). Mediante la herramienta *online* "OligoAnalyzer Tool" de IDT ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)) se buscó que la diferencia de Tm entre *primers* sentido y reverso fuera menor a 2°C, que no formara horquillas a

temperaturas mayores a 40°C ni que se formaran homo o hetero-dímeros con  $\Delta G$  menor a -7 kcal/mol. Además, se buscó en base de datos (NIH) con la herramienta Primer Blast que los *primers* no amplificaran productos inespecíficos.

Tabla 1. *Primers* para amplificar *np9* diseñados en el marco de esta tesina de grado.

Nombre	Sentido	Secuencia*	% GC	Tm (°C)	Tm máxima a la que se forman horquillas (°C)	Homo-dímeros (ΔG en kcal/mol)	Hetero-dímeros (ΔG en kcal/mol)	Tamaño esperado del amplicón
<i>np9-1</i>	Forward	5'- CCA ACG TGG AGG CTT TTC TCT AG -3'	52.2	57.5	36	-6.3	-6.24	194 pb
	Reverse	5'- <b>GTA CAC CTG CAG ACA CCA TCT CC</b> -3'	56.5	59.3	25.3	-10.24		
<i>np9-3</i>	Forward	5'- <b>TCC ACG GAG ATG GTG TCT G</b> -3'	57.9	56.5	34.7	-5.02	-5.02	247 pb
	Reverse	5'- GGT TGG GGG TAA GGT CAT AGA TTA AC -3'	46.2	56.9	7.6	-4.85		

\* En verde y negrita se indica la secuencia del *primer* que hibrida en el primer exón del gen y en rojo y negrita se muestra la secuencia que hibrida en el comienzo del segundo exón.

Tabla 2. Par de *primers* modificados de (Armbruster et al., 2002) para amplificar los genes completos derivados de los eventos de *splicing* alternativo de *env*. Los nucleótidos en azul y negrita indican las modificaciones realizadas.

Sentido	Sitio de corte para enzimas de restricción	Secuencia	% GC	Tm TOTAL (°C)	Tm (°C) *	Tm máxima a la que se forman horquillas (°C)	Homo-dímeros (ΔG en kcal/mol)	Hetero-dímeros (ΔG en kcal/mol)
Forward	EcoRI	5'- <b>CATTTGAgaattcMCA</b> ATGAACCCATCGGAG -3'	41.9	59.4	53.1	31,9	-8.51	-8.65
Reverse	BamHI	5'- CGCGCg gatccAACAGAATCTCAAGGCAGAAG -3'	56.2	66.3	52.6	20,1	-17.11	

\* Sin incluir sitios de corte y “colitas”

El análisis y alineamiento de secuencias de los genes *np9*, *rec*, *env* y  $\beta$ -*actina* y de los genomas de los HERV-K fue realizado en el software *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Kumar et al., 2018). Estas secuencias fueron obtenidas de la base de datos del NCBI (*National Center of Biological Investigation*) (Tabla 3) y fueron empleadas para la reconstrucción del ARNm de *np9* y el diseño de *primers* (con excepción de la correspondiente a  $\beta$ -*actina*, la cual se empleó únicamente para verificar la hibridación de los *primers*).

**Tabla 3. Secuencias utilizadas para realizar los análisis de secuencias con sus números de acceso en la base de datos del NCBI.**

Secuencia	Numero de acceso en NCBI
ARNm <i>env</i> de tipo 2	XM_017017016.1
ADN <i>env</i> de tipo 2	AF074086.2
	AF164611.1
ARNm <i>rec</i>	LN624403.1
ARNm <i>np9</i>	ERS 642673 (ERR738394.24)
Proteína Np9	P61581.1

### 3.11) Puesta a punto de PCRs de los genes $\beta$ -*actina* y *np9*

Se realizó la puesta a punto para la amplificación de estos genes por PCR en tiempo final. Para ello se utilizó la enzima *HighTaq DNA Polymerase* (BIORON GmbH, Römerberg, Alemania) y el volumen final de reacción fue de 25  $\mu$ l. Los volúmenes iniciales de reacción que no fueron modificados en los diferentes ensayos de puesta a punto fueron los siguientes: 2.5  $\mu$ l del buffer incompleto 10X, 0.5  $\mu$ l de dNTPs (10 mM) y 0.25  $\mu$ l de la enzima *High Taq DNA Polymerase* (5U/ $\mu$ l). Sin embargo, sí se varió la concentración de algunos de los componentes para lograr las mejores condiciones de amplificación. Los componentes a los cuales se les varió la concentración fueron: MgCl<sub>2</sub> (entre 1.2 y 2  $\mu$ M por reacción), cada *primer* (entre 0.32 y 0.48  $\mu$ M) y el volumen de ADNc (entre 1 y 2  $\mu$ L). El ADNc utilizado correspondió al de la línea celular Jurkat y se utilizaron 2 controles negativos, uno correspondiente al control negativo de la retrotranscripción y otro control negativo de PCR que constó de H<sub>2</sub>O DEPC (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA). Los *primers* utilizados para amplificar  $\beta$ -*actina* se extrajeron de la literatura (S. Wang et al., 2013) y el producto amplificado tiene un tamaño esperado de 184 pb. El ciclado para amplificar  $\beta$ -*actina* fue: 5 min a 94°C; 35 ciclos escalonados de 94°C por 10 segundos, 58°C por 20 segundos y 72°C por 30 segundos y, finalmente, 5 min 72°C. Para el caso de *np9* se utilizaron los *primers*



diseñados en el marco de esta tesis de grado (Tabla 1). Las temperaturas de *annealing* utilizadas para amplificar *np9* variaron entre los 53 y 61°C dependiendo del par de *primers* utilizados, mientras que el tiempo de extensión probado fue de entre 20 y 45 segundos.

Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, con *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, Madison, USA), incorporado al gel como agente intercalante.

### **3.12) Cuantificación relativa de la expresión de HERV-K mediante PCR a tiempo real**

La PCR a tiempo real se realizó en el termociclador *Step One Plus* de *Applied Biosystems* con el kit *Luna Universal qPCR Master Mix* (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), siguiendo el protocolo del fabricante, y se utilizó el gen  $\beta$ -*actina* como normalizador. Este kit se basa en la utilización de SYBR como intercalante de ADN.

Los *primers* de *np9* utilizados para la cuantificación relativa fueron extraídos de la literatura (Gonzalez-Hernandez et al., 2012). Para el mix de reacción de ambas PCR se utilizó 10  $\mu$ L de Buffer 2x, 0,2  $\mu$ L de cada *primer* (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L de ADNc y 8,6  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O DEPC (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA). De cada línea celular se realizaron al menos 2 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas cada una. Se utilizaron 2 controles negativos por triplicado, un control negativo de PCR en tiempo real (H<sub>2</sub>O DEPC) y el control negativo de cada retrotranscripción.

Para poder determinar los niveles de expresión del gen *np9* en las diferentes líneas celulares analizadas se utilizó el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001) el que permite cuantificar la expresión del gen de interés (*np9*) en un tipo celular relativo a otro tipo considerado como basal o de referencia. Asimismo, se emplea un gen de expresión constitutiva ( $\beta$ -*actina*) como normalizador de expresión. Esta metodología se basa en calcular las diferencias de Ct (por su sigla en inglés *Cycle threshold*). El Ct es el número de ciclo en el que la muestra supera un valor umbral (threshold) en la señal de fluorescencia, el cual es determinado (de forma manual o automática) previamente (Schmittgen & Livak, 2008). Para obtener los datos de la PCR en tiempo real se utilizó el software *StepOne* de *Applied Biosystems* v2.3 y se realizaron los siguientes cálculos:

$$\Delta CT = CT \text{ gen blanco} - CT \text{ gen de referencia}$$

Siendo *np9* el gen blanco y *β-actina* el gen de referencia. Estos cálculos se realizaron para cada una de las muestras (líneas celulares) así como para los glóbulos blancos de donantes sanos que fue empleada como condición calibradora.

Luego se calculó el  $\Delta\Delta Ct$ :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador}$$

Y a continuación el  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Todas las expresiones relativas calculadas fueron graficadas y sometidas a cálculos estadísticos en el software *GraphPad Prism* versión 5.01 (para Windows, San Diego, CA, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). A la condición calibradora se le asignó arbitrariamente una expresión de 100%. Para detectar la existencia de diferencias significativas entre las muestras se utilizó el test *One-way ANOVA* con corrección de Bonferroni. Un valor  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

Para las comparaciones de la expresión en las células Huh7.5 transfectadas con el ARN de VHC o transfectadas sólo con el reactivo de transfección, la condición calibradora elegida fue la expresión en esta línea celular sin transfectar.

### **3.13) RT-PCR a tiempo final para detectar VHC en células transfectadas**

Para confirmar que las muestras de línea celular Huh7.5 transfectadas con el clon infeccioso de VHC (J6/JFH-clon 2) contenían efectivamente copias de ARN viral al día 16 post-transfección, se realizó la amplificación de una región parcial del gen NS5B de VHC (Región de Okamoto). Este paso fue necesario ya que VHC es un virus que genera un efecto citopático poco claro al microscopio óptico, por lo cual verificar por un método molecular se vuelve una necesidad. Se realizó con el kit *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq High Fidelity DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), utilizando el *primer* reverso modificado de (Cantaloube et al., 2005) (5'-GAR TAY CTV GTC ATR GCC TC - 3') y el *forward* diseñado por el MSc. Fabián Aldunate en el marco de su tesis de maestría (Aldunate, 2019) (5'- CGG CYT GCA AGG CTG CGG - 3'). El mix para cada reacción fue: 15  $\mu$ L de Buffer 2x, 1  $\mu$ L de cada *primer* (10 $\mu$ M), 0.2  $\mu$ L de Ribolock (40 U/ $\mu$ L), 0.6  $\mu$ L de SuperScript/Taq Hi-Fi, 7.2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O DEPC (USB Corporation,

Cleveland, Ohio, USA) y 5 µL de ARN. El ciclado consistió en un primer paso de RT de 45 min a 48°C, y luego la amplificación en sí misma: 2 min a 94°C; 40 ciclos escalonados de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 68°C por 15 segundos, y un paso de extensión final de 5 min a 68°C. El amplicón generado tenía un tamaño esperado de 136 pb y fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Como control positivo de PCR se empleó el vector de ADN del clon infeccioso y como control negativo H<sub>2</sub>O DEPC.

### **3.14) Generación de un vector de expresión de Np9**

Ante la ausencia de la proteína Np9 como de anticuerpos contra ésta a nivel comercial, esta debe ser producida en el laboratorio ya sea con el fin de producir anticuerpos específicos, para poder cristalizarla o para utilizarla como suplemento en ensayos de funcionalidad en cultivo celular. Para esto el primer paso es la generación de un vector de expresión que incluya el ORF completo de Np9.

#### **3.14.1) Amplificación, purificación y digestión del gen *np9***

Para amplificar *np9* completo se empleó la enzima *HighTaq DNA Polymerase* (BIORON GmbH, Römerberg, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante, con *primers* que incluyen modificaciones de los sitios de corte para enzimas de restricción (Armbruster et al., 2002) (Tabla 2). Estas modificaciones fueron en el *primer forward*, en la región 5' previa al codón de inicio con el fin de mejorar la amplificación del gen. El objetivo principal de esta modificación fue cambiar el sitio de corte para enzimas de restricción y así poder direccionar el inserto que se desea clonar para poder realizar una ligación exitosa. El producto de amplificación se purificó empleando el *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research, Irvine, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El tamaño esperado del fragmento amplificado fue de 284 pb.

A continuación se realizó la digestión con dos enzimas de restricción, *EcoRI* y *BamHI*, para generar extremos cohesivos que permitieran la clonación del producto deseado por complementariedad. El mix de digestión se realizó en un volumen final de 30 µL siguiendo las indicaciones de *Thermo* (<https://www.thermofisher.com>; Double Digest Calculator) para una doble digestión involucrando estas enzimas: se utilizó el buffer Tango 10x (buffer universal de *Thermo*) en concentración final 2x, 20 U de BamHI y 10 U de EcoRI para digerir 500 ng de ADN plasmídico. La digestión se realizó por 1 hora a 37°C y se inactivaron las

enzimas a 65°C por 20 min. El éxito de la digestión se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. La purificación de *np9* digerido se realizó con el kit *DNA Clean & Concentrator*<sup>TM</sup> – 5 (Zymo Research, Irvine, USA) y se eluyó en 10 µL. Como control de la digestión se utilizó el vector DL-HCV-1b-F (Anexo 5) que debía rendir luego de la digestión una banda de 1900 pb y otra banda de 4850 pb.

### 3.14.2) Digestión del vector de expresión p3x-FLAG-CMV-14

Para la clonación se utilizó el vector *p3x-FLAG-CMV-14* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Anexo 6), cedido amablemente por el Laboratorio de Interacciones Molecular de Facultad de Ciencias. Este es un vector de expresión eucariota dirigido por un promotor de citomegalovirus. Además posee un gen de resistencia a ampicilina para amplificarlo en bacterias. La digestión (para generar extremos cohesivos) se realizó en un volumen final de 60 µL siguiendo las indicaciones de *Thermo* para una doble digestión involucrando estas enzimas: se utilizó el buffer Tango 10x (buffer universal de *Thermo*) en concentración final 2x, 40 U de *BamHI* y 20 U de *EcoRI* para digerir 2000 ng de ADN plasmídico. La digestión se realizó por 1 hora a 37°C, se inactivaron las enzimas a 65°C por 20 min y se verificó la digestión por electroforesis en gel de agarosa al 1%. La purificación del vector digerido se realizó con el kit *DNA Clean & Concentrator*<sup>TM</sup> – 25 (Zymo Research, Irvine, USA) siguiendo el protocolo del fabricante, y se eluyó finalmente en 25 µL.

También se utilizó el software *Snapgene Viewer v4.2.6* (GSL Biotech; disponible en [www.snapgene.com](http://www.snapgene.com)) para visualizar y analizar las características del vector de expresión que se utilizó para clonar *np9*.

### 3.14.3) Ligación

La ligación del producto digerido (inserto: *np9*) con el vector digerido, se realizó con la enzima T4 ligasa (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) durante toda la noche a 16°C. Se realizó la ligación en una relación (factor) 1:3 y 1:4 de cantidad de vector:cantidad de inserto. La cantidad de vector utilizado fue 100 ng en las dos ocasiones, mientras que la cantidad de *np9* se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Cant. de inserto (ng)} = \frac{\text{cant. vector (ng)} \times \text{Tamaño de inserto (pb)}}{\text{Tamaño del vector (pb)}} \times \text{factor}$$

#### **3.14.4) Transformación y plaqueo, crecimiento y selección de colonias, y purificación de plásmidos**

La transformación se realizó por el método de *heat shock* y se utilizaron bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). Se transformaron 25  $\mu$ L de estas células con 5  $\mu$ L de producto de ligación. Esta mezcla fue incubada por 30 min en hielo, luego se realizó el shock térmico a 42°C por 30 segundos y se dejó 5 min en hielo. Se agregaron 475  $\mu$ L de medio SOC y se dejó a 37°C por una hora en agitación (200 rpm). Luego se realizó un spin de 1 min para bajar las células, se retiró parte del sobrenadante y el restante se empleó para resuspender el pellet celular. Por tanto, se sembraron aproximadamente 50  $\mu$ L de esta suspensión bacteriana por rastrillado en placas de Petri con medio LB agar + ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y fueron incubadas *overnight* a 37°C. Se seleccionaron 5 colonias aisladas y se dejaron crecer por 16-18 horas en 2 mL de medio LB + ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Se alicuotaron 750  $\mu$ L del medio crecido con 250  $\mu$ L de glicerol para congelar y el medio restante se utilizó para la extracción de plásmidos que fue realizada empleando el *Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit* (Zymo Research, Irvine, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido purificado se corrió en un gel de agarosa al 1% para verificar la calidad de la extracción y el tamaño del plásmido. Como control se utilizó una alícuota del vector de expresión sin inserto.

#### **3.14.5) Verificación de inserto y secuenciación de plásmidos**

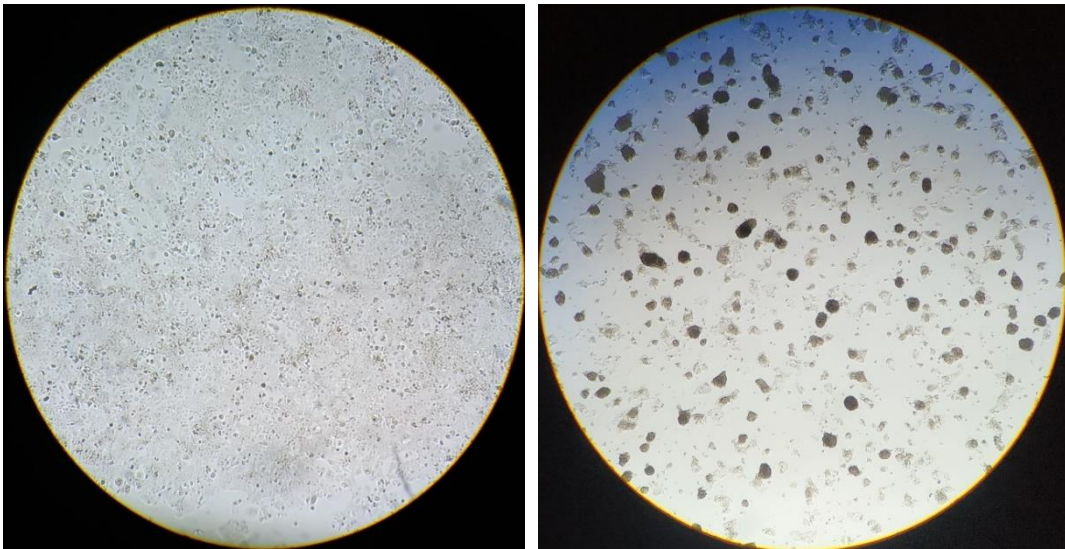
El éxito del clonado se verificó digiriendo el vector con las enzimas EcoRI y BamHI siguiendo los pasos anteriormente descritos.

Una vez verificado que los vectores contenían el inserto de interés (*np9*), alícuotas de éstos fueron enviadas a secuenciar al servicio de Macrogen Korea con el *primer* universal CMV-F (5' - CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG - 3'). Las secuencias de *np9* obtenidas a partir de los vectores con inserto fueron editadas y comparadas con la secuencia reconstruida empleando el programa *SeqMan* implementado en el paquete *DNASar 5.01* (DNASTAR, Madison, USA).

## 4) Resultados y discusión

### 4.1) Procesamiento de muestras

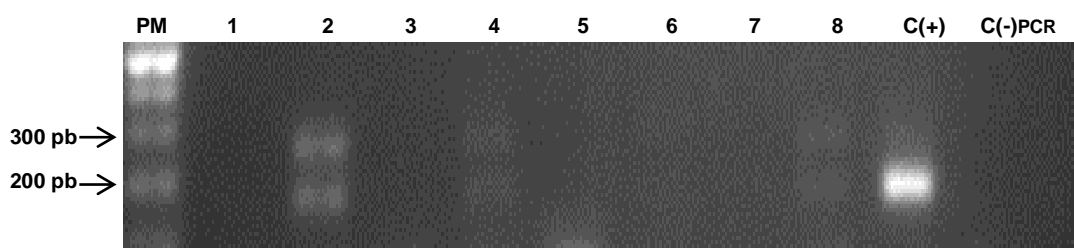
A partir de las líneas celulares Huh7.5 y HepG2, las cuales fueron cultivadas exitosamente en el marco de esta tesina de grado, (Figura 3) se realizó la puesta a punto de todo el *pipeline* de procesamiento de muestras.



**Figura 3. Líneas celulares derivadas de hepatocarcinoma con las que se trabajó en esta tesis.** En la imagen de la izquierda se puede ver cómo las células de la línea Huh7.5 crecen en monocapa. Mientras que en la foto de la derecha se observan las células HepG2 que crecen en *clusters*. Imágenes obtenidas del microscopio invertido a magnificación 4X.

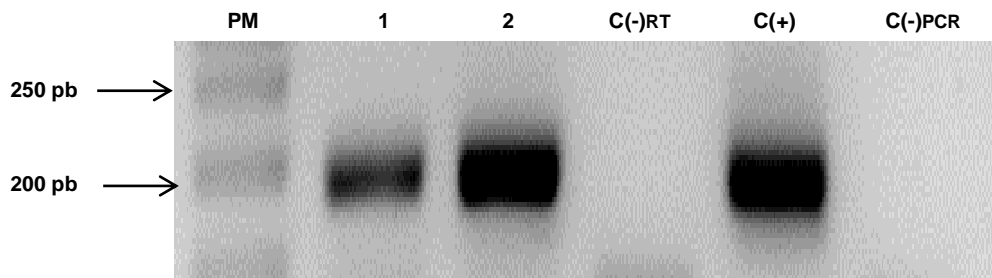
Se realizó con éxito la extracción del ARN mediante el método del TRIzol obteniéndose relaciones de absorbancia 260nm/230nm mayores a 1,8 y 260nm/280nm mayores a 2,0. La relación a 260nm/230nm indica la pureza de la muestra respecto a la cantidad de fenoles, carbohidratos o EDTA mientras que la relación a 260nm/280nm refiere a la pureza respecto a contaminación con proteínas. Las muestras con una relación 260nm/230nm menor a 1.8 fueron repurificadas y se logró de esta manera que todas los ARNs extraídos por este método resultaran de buena calidad.

Posterior a la extracción de ARN, el mismo fue tratado con ADNasa para eliminar cualquier contaminación con ADN genómico que pudiera haber quedado en la muestra y pudiera influenciar negativamente en la cuantificación relativa. Este tratamiento fue verificado por PCR a tiempo final amplificando  $\beta$ -actina a partir de ARN tratado y sin tratar, y posteriormente los resultados se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa. Como era esperable, se observó que las muestras tratadas con ADNasa no amplifican ninguna banda debido a que el ARN no sirve como molde en la PCR ya que la polimerasa es ADN dependiente, sin embargo las muestras contaminadas con ADN sin tratar amplifican dos bandas: una de 190 pb de manera inespecífica y otra de 279 pb que corresponde al gen de  $\beta$ -actina en el ADN (Figura 4). Cabe destacar que en el control positivo, la banda inespecífica de 190 pb amplifica con mayor intensidad que la del tamaño específico. Las muestras tratadas que de todos modos amplificaron, evidenciaron un tratamiento ineficaz por lo cual fueron sometidas nuevamente a un segundo tratamiento con ADNasa.



**Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para verificar el éxito del tratamiento con ADNasa.** En los carriles impares se observan las muestras tratadas con ADNasa, mientras que en los pares se encuentran las muestras sin tratar. Carriles 1 y 2: Huh7.5; carriles 3 y 4: HepG2; y carriles 5 al 8: muestras de glóbulos blancos de donantes sanos. Para el control positivo se utilizó ADN copia proveniente de Huh7.5. Para el control negativo de PCR se utilizó H<sub>2</sub>O DEPC. En las muestras sin tratar contaminadas con ADN (carriles pares) se pueden apreciar dos productos amplificados.

Una vez verificado que el tratamiento con ADNasa había sido exitoso, se procedió a retrotranscribir el ARN y se verificó la correcta generación de ADNc mediante PCR a tiempo final del gen de  $\beta$ -actina. Las muestras cuyos ADNc resultaron amplificables, rindieron una banda de 184 pb correspondiente al mensajero de  $\beta$ -actina retrotranscripto (Figura 5).



**Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para verificar que los ADNc resultado de la retrotranscripción eran amplificables.** Carril 1: ADN copia de Huh7.5; carril 2: ADN copia de HepG2; carril 3: control negativo de retrotranscripción; carril 4: control positivo con ADN copia de Huh7.5 amplificable (verificado previamente); último carril: control negativo de PCR con H<sub>2</sub>O DEPC. Teniendo en cuenta la buena amplificación de las muestras y que los controles negativos no amplificaron se puede afirmar que la retrotranscripción fue exitosa.

Únicamente se prosiguió con la utilización de aquellos ADNc que habían amplificado correctamente (con la presencia de banda en el correspondiente control positivo y la ausencia de amplificación en ambos controles negativos).

Tras haber puesto a punto el tratamiento de ADNasa y la retrotranscripción a partir de las muestras provenientes de las líneas celulares Huh7.5 y HepG2, se realizó con éxito el procesamiento de las muestras provenientes de las otras líneas celulares cultivadas en el laboratorio, los glóbulos blancos provenientes de donantes sanos y las muestras de la línea celular Huh7.5 transfectadas con VHC con sus respectivos controles. En este punto es importante mencionar que el ARN de las muestras transfectadas fue extraído mediante la utilización de un kit comercial debido a que la cantidad de células era baja. Este kit incluye un paso de tratamiento con ADNasa *in-column*. Los ARNs extraídos de estas muestras fueron posteriormente sometidos a la PCR de verificación de dicho tratamiento y fueron también retrotranscritos, al igual que con las muestras procesadas por el método de Trizol.

En suma:

- se realizó el procesamiento completo de 2 réplicas biológicas de las líneas celulares: LnCAP, PC-3, HeLa, Vero y MDCK; 3 réplicas biológicas de HepG2 y 4 de Huh 7.5.
- El procesamiento de Jurkat se realizó a partir de ARN tratado con ADNasa que fue previamente realizado por la MSc. Sabrina Fischer en su tesis de maestría (Fischer, 2015) aunque se realizaron 4 retrotranscripciones a partir de ese ARN tratado.



-Se procesaron 10 muestras de sangre de donantes sanos de las cuales solamente a partir de 2 se logró una extracción de ARN de buena calidad, por lo que se continuó trabajando solo con esas dos muestras.

-Finalmente se procesaron 2 muestras transfectadas con VHC con sus respectivos controles Mock.

## 4.2) Detección de *np9* con *primers* diseñados en el marco de esta tesina

### 4.2.1) Reconstrucción del ARNm de *np9*

En primer lugar, se logró realizar la reconstrucción de la secuencia del mensajero completo de *np9* incluyendo no sólo el ORF, sino las regiones 5' y 3' UTR putativas (Figura 6). Para llevarla a cabo fue necesario basarse en que la región 5'LTR de los retrovirus endógenos se transcribe y forma parte de la región 5'UTR del ARN mensajero (Schmitt et al., 2015), ya que toda las secuencias de *np9* disponibles en bases de datos correspondían al ORF y/o a la secuencia aminoacídica.

```
GCCCAACGTGGAGGCTTTTCTCTAGGGTGAAGGTACGCTCGAGCGTGGTCATTGAGGACAAGTCGACG
AGAGATCCCGAGTACATCTACAGTCAGCCTTACGGTAAGCTTGTCGCTCGGAAGAAGCTAGGGTGAT
AAATGAACCCATCGGAGATGCAAAGAAAAGGGCCTCCACGGAGATGGTG//TCTGCAGGTGTACCCAA
CAGCTCCGAAGAGACAGCGACCATCGAGAACAGGCCATGATGACGATGGCGGTTTTGTGCGAAAAGAA
AAGGGGGAAATGTGGGGAAAAGCAAGAGAGATCAGATTGTTACTGTGTCTGTGTAGAAAAGAGTAGA
CATAGGAGACTCCATTTTGTATGTACTAAGAAAAATTCTTCTGCCTTGAGATTCTGTTAATCTATGACCT
TACCCCAACCCC
```

**Figura 6. Secuencia del ARNm de *np9* reconstruida a partir de secuencias de ADN y ADNc de bases de datos.** En rojo se indica la región 5'UTR, en negro el ORF de *np9* y en azul parte de la región 3'UTR del mensajero. Las dos barras diagonales verdes indican el lugar en el que ocurre el *splicing*. La región 5'UTR se obtuvo de la secuencia del NCBI con número de acceso AF074086.2:975-1112. El ORF se reconstruyó a partir de las secuencias AF164611.1 y P61581.1 La región 3'UTR se obtuvo a partir de la secuencia continua al ORF de *env* en la secuencia AF074086.2.

### 4.2.2) Búsqueda y evaluación de *primers* específicos de *np9* en la literatura

Se decidió utilizar *primers* ya reportados en la literatura para amplificar específicamente *np9*, en particular se seleccionó el par 5'- AGATGTCTGCAGGTGTACCCA -3' (*primer forward*)

y 5´- CTCTTGCTTTTCCCCACATTTC -3´ (*primer reverse*) (Gonzalez-Hernandez et al., 2012). Previo a su utilización, se procedió a realizar un análisis *in silico* para determinar mediante alineamiento de secuencia, si el set era específico para distinguir entre el mensajero de *env* y el mensajero de su *splicing* alternativo, *np9*. Para evitar la amplificación de ADN genómico potencialmente contaminante, el diseño de *primers* para cuantificación relativa de la expresión de un gen determinado, implica que uno de los *primers* debe diseñarse de tal manera que aproximadamente la mitad del mismo hibride con la región 3´ terminal de un exón, y la otra mitad con la región 5´ terminal del siguiente exón. Sin embargo, los *primers* reportados por González-Hernández et al., 2012 fueron inicialmente descartados debido a que se consideró que era posible que el uso de este set amplificara también los mensajeros de *rec* y *env*. La amplificación de estos dos mensajeros sería inespecífica pero podría ocurrir ya que, de los 21 pb del *primer forward*, 18 y 17 pb de su región 3´ hibridan con *rec* y *env*, respectivamente (Figura 7). Si bien el *primer reverse* abarca una parte del ORF de *np9* que es específica de este último, es posible que esa secuencia, aunque ausente en los ORFs de *rec* y *env*, se encuentre en la región 3´UTR de estos dos mensajeros. Es por eso que, en caso de emplear este set de *primers*, los análisis de expresión podrían reflejar la expresión de los tres mensajeros combinados, en caso de que efectivamente exista co-expresión en una misma línea celular.

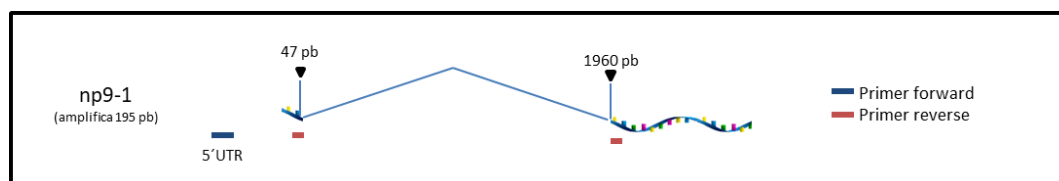
Species/Abbrv								*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
1. XM_017017016.1 HERV-K Env mRNA TIPO 2	C	T	G	T	T	G	T	A	G	T	C	T	G	C	A	G	G	T	G	T	A	C	C	C	A	A	C			
2. ORF rec	A	T	C	A	A	C	A	G	T	G	T	C	T	G	C	A	G	G	T	G	T	A	C	C	C	A	A	C		
3. np9	C	A	C	G	G	A	G	A	T	G	T	C	T	G	C	A	G	G	T	G	T	A	C	C	C	A	A	C		
4. Primer forward np9 Gonzalez-Hernandez	-	-	-	-	-	A	G	A	T	G	T	C	T	G	C	A	G	G	T	G	T	A	C	C	C	A				

**Figura 7. Alineamiento del primer forward utilizado por Gonzalez-Hernandez et al., 2012 con las secuencias de los mensajeros de env, rec y np9.** La secuencia 1 corresponde a la secuencia de *env* proveniente de un HERV-K de tipo 2. La secuencia 2 corresponde al marco abierto de lectura de *rec*. La secuencia 3 corresponde a una secuencia de *np9* proveniente de la secuenciación masiva de tejidos sanos (Schmitt et al., 2015). La cuarta secuencia corresponde al primer forward empleado por Gonzalez-Hernandez et al., 2012 para amplificar *np9*. Como se puede apreciar *rec* tiene 18 pb en común con la secuencia del primer y *env* 17 pb; en ambos casos esta región está en el extremo 3´ por lo que podría amplificar inespecíficamente. La flecha negra indica el sitio del *splicing*. Alineamiento realizado con el software MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Kumar et al., 2018).

Debido a lo anteriormente expuesto, se diseñaron diferentes sets de *primers* para intentar amplificar específicamente el mensajero de *np9* (Tablas 1 y 2) los cuales se emplearon para la puesta a punto por PCR a tiempo final. El ADNc utilizado para todas las puestas a punto correspondió a la línea celular Jurkat debido a que era la única de la que se tenía la seguridad de que expresaba *np9* (Chen et al., 2013).

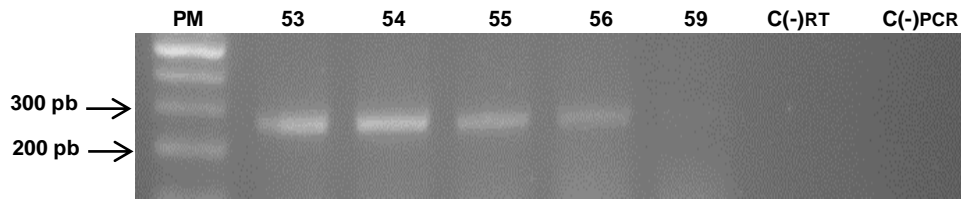
#### 4.2.3) Diseño de *primers* np9-1 y puesta a punto de amplificación por PCR a tiempo final y a tiempo real

Para el diseño del par de *primers* np9-1 se decidió que el *primer forward* hibridara en la región 5' UTR y así de este modo, abarcar el inicio del ORF en la amplificación y no sesgarlo con la secuencia derivada del *primer* a utilizar. El *primer reverse* se diseñó tomando en cuenta la región del *splicing* en el ARN mensajero de *np9* (Figura 8).



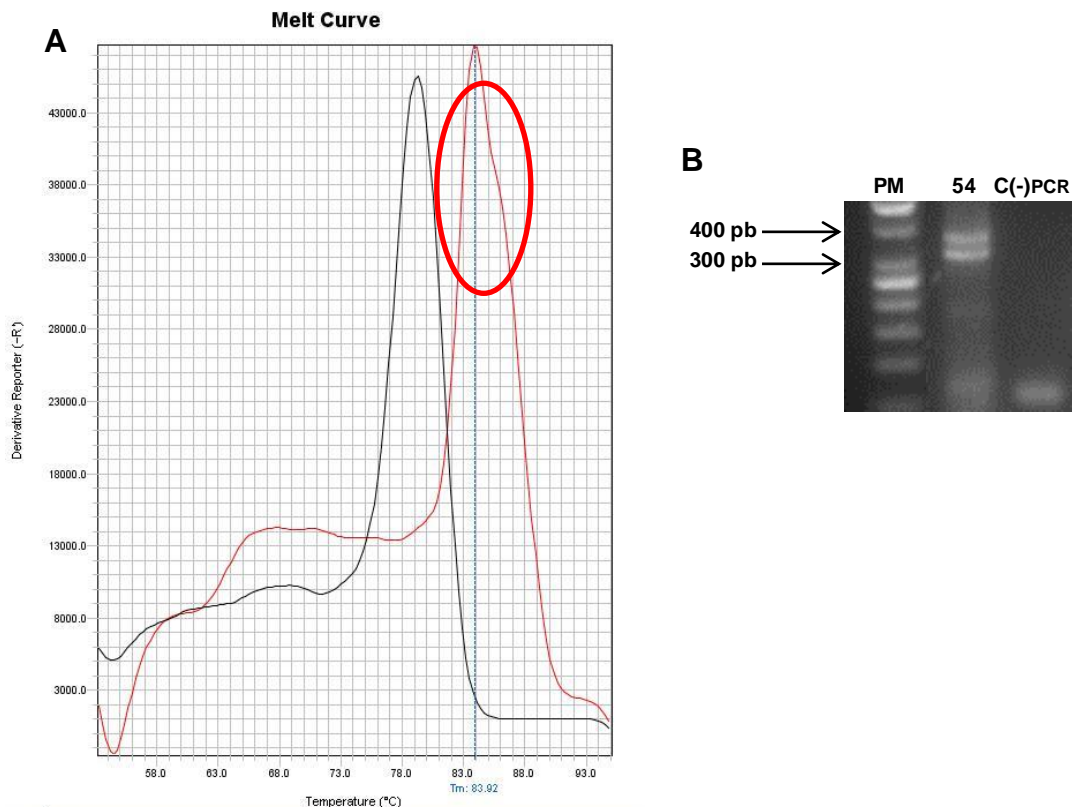
**Figura 8. Localización de los *primers* np9-1 forward y reverse en el marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) del ARN mensajero de *np9*.** En azul se puede ver el *primer forward* que hibrida fuera del ORF. Mientras tanto en rojo se puede ver que el *primer reverse* hibrida en la zona en la que ocurre el *splicing* de *np9*. Con el análisis de secuencia realizado se espera que el amplicón sea de 195 pb.

Bajo este diseño se esperaba que el amplicón tuviera un largo de 195 pb, según la reconstrucción de la secuencia del mensajero completo de *np9* (Figura 6). La PCR de puesta a punto con los *primers* np9-1 se realizó con diferentes temperaturas de *annealing*: 53, 54, 55, 56 y 59 °C, y el resultado evidenció una banda de mayor tamaño al esperado (entre 200 y 300 pb) con una mayor intensidad de banda a los 54 °C (Figura 9). La diferencia en el tamaño esperado podría deberse a una reconstrucción *in silico* de la región 5'UTR más corta de lo que realmente es.



**Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de la puesta a punto de la PCR a tiempo final con el par de *primers* np9-1.** Los números sobre cada carril indican la temperatura de *annealing* en cada PCR. La banda amplificada está entre los 200 y los 300 pb, siendo mayor a la banda esperada. Para el control negativo de RT se utilizó el ADNc generado como control negativo de la retrotranscripción de las muestras de Jurkat y para el control negativo de PCR se utilizó H<sub>2</sub>O DEPC.

Tras la puesta a punto de la PCR a tiempo final se realizó la puesta a punto de la PCR a tiempo real. Para ello el ciclado contempló la temperatura de *annealing* que mejores resultados rindió en la puesta a punto por PCR a tiempo final (54°C), pero también las indicaciones del fabricante del kit de PCR a tiempo real empleado (Kit Luna Universal qPCR Master Mix de NEB), y por tanto consistió de 10 min a 95°C, 40 ciclos escalonados de 95°C por 15 segundos, 54°C por 30 segundos y 45 segundos a 60°C. A continuación se realizó una rampa de *melting* entre 60°C y 95°C en la que la temperatura aumenta y se mide la fluorescencia de las muestras cada 0,3°C. Con este ciclado se obtuvo una buena amplificación (evidenciada por valores de Ct menores a 30 ciclos; datos no mostrados), pero tras analizar la curva de *melting* se apreció un perfil de pico asimétrico, que podría estar indicando la amplificación de dos productos de pesos moleculares similares, o bien del mismo tamaño pero contenido GC diferente (Figura 10). Esto fue comprobado por electroforesis en gel de agarosa donde se distinguen claramente dos bandas de entre 300 y 400 pb (Figura 11). Asimismo, aunque el control negativo había mostrado amplificación (Ct de 33), la curva de *melting* indicó una T<sub>m</sub> menor que la muestra de Jurkat, y al verificar en un gel, se observaron únicamente dímeros de *primers*.



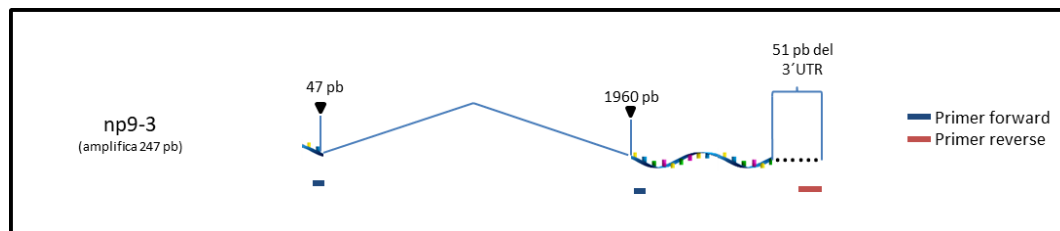
**Figura 10. Resultados de la puesta a punto de la PCR a tiempo real con el juego de primers np9-1. A) Curva de *melting* de los productos amplificados.** En esta PCR a tiempo real se utilizó el ADN copia de la línea celular Jurkat (línea roja). Como control negativo se utilizó H<sub>2</sub>O DEPC (línea negra). El aparente doble pico se aprecia con claridad en la muestra correspondiente a Jurkat y se señala con un óvalo rojo. El control negativo muestra un pico de *melting* de menor temperatura, consistente con una amplificación inespecífica o bien con dímeros de primers. **B) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.** Mediante PCR a tiempo real con temperatura de *annealing* de 54°C se amplificaron dos fragmentos de entre 300 y 400 pb con el par de primers np9-1. En el control negativo de PCR se observan únicamente dímeros de primers.

Una vez más, se esperaba que el producto específico a amplificar fuera de menor tamaño para este par de primers (195 pb); sin embargo, y como fue mencionado anteriormente, existía la posibilidad de que fuera de otro tamaño dado que no hay secuencias de la región 5'UTR del transcrito en la base de datos y solamente la hay del ORF. A pesar de la diferencia respecto del tamaño esperado, no era esperable que se obtuvieran 3 productos de amplificación de distinto tamaño (uno por PCR a tiempo final y dos por PCR a tiempo real), por lo que los tres productos fueron purificados y enviados a secuenciar. Como resultado de la secuenciación se constató que ninguno de los tres amplicones eran específicos para *np9* ni para ningún ARN mensajero derivado de *env*, por lo que resultaron ser producto de amplificaciones inespecíficas. Sin embargo, es importante

destacar que según el análisis *in silico* de los *primers*, no se habían detectado blancos de hibridación inespecíficos en la base de datos. Debido a la incapacidad de amplificar el producto inicialmente deseado, este par de *primers* fue descartado para analizar la expresión de *np9*.

#### 4.2.4) Diseño de *primers* np9-3 y puesta a punto de amplificación por PCR a tiempo final y a tiempo real

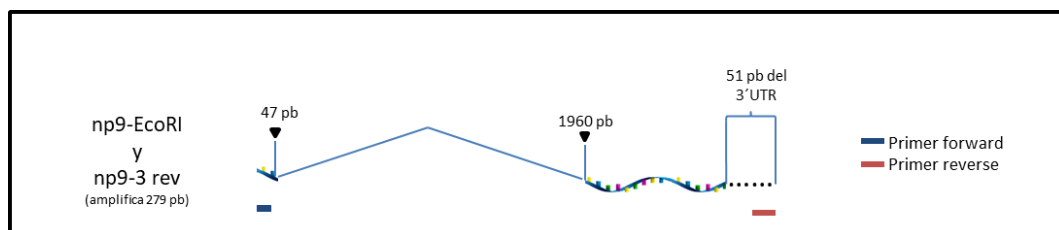
El otro par de *primers* diseñado para analizar la expresión de *np9* fue np9-3. Para el *primer forward* de este par se tuvo en cuenta el sitio de *splicing* del gen; mientras que para el *primer reverse* se buscó que hibridara en la región 3'UTR del transcripto de *np9* (Figura 11).



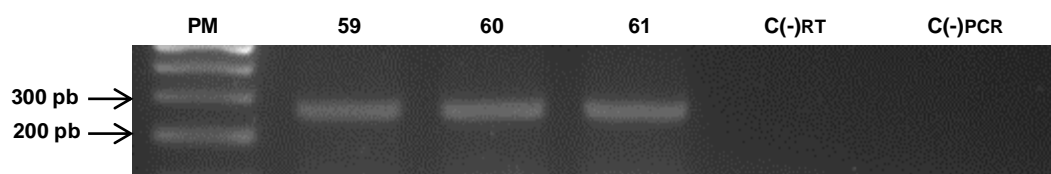
**Figura 11. Localización de los *primers* np9-3 forward y reverse en el ORF y región 3'UTR del ARN mensajero de *np9*.** En azul se puede ver el *primer forward* que hibrida en el sitio de *splicing* de *np9*. Mientras tanto, en rojo se indica el *primer reverse* que hibrida fuera del ORF, más precisamente en la región 3'UTR. Este juego de cebadores se espera amplifique una región de 247 pb.

La PCR a tiempo final se realizó en las mismas condiciones y temperaturas de *annealing* que para np9-1. A partir de este juego de *primers* no se obtuvo ningún amplicón (datos no mostrados), a pesar de las variadas condiciones testeadas. Para analizar cuál de los dos *primers* era el que no hibridaba con la región de interés, se realizó una combinación entre éstos y los *primers* que amplifican el gen completo (Tabla 2). Como resultado, se encontró que sólo la combinación del *primer* np9-3 reverse y el *primer* np9-EcoRI (Figura 12) amplificaba un producto de entre 200 y 300 pb, consistente con el tamaño esperado de 279 pb (Figura 13). Esta amplificación se realizó siguiendo un ciclado de 5 min a 94°C; 35 ciclos escalonados de 94°C por 30 segundos, 59/60/61°C por 45 segundos y 72°C por 20 segundos; y finalmente 5 min a 72°C. La intensidad de la banda fue similar en las tres condiciones de *annealing*, como se puede apreciar en la Figura 13. Tras purificar el amplicón y mandarlo a secuenciar se pudo confirmar que con estos *primers* se puede amplificar el ORF completo de *np9* y parte de la región 3'UTR, más

específicamente 51 pb (Figura 6), que no estaba previamente descrita en ningún artículo aunque se puede hallar en varios archivos de SRA (*Sequence Read Archive*) resultado de estudios de secuenciación masiva, asociados al artículo de Schmitt et al., 2015. Esto representa un avance en el conocimiento del ARN mensajeros de *np9* ya que no hay secuencia de este gen en la base de datos del NCBI más allá de las previamente comentadas aunque se puede reconstruir el ORF a partir de imágenes de algunos artículos. Si bien al momento de escritura no ha sido subido al NCBI, me encuentro en el proceso de hacerlo. En conclusión, el *primer np9-3 forward* parece ser el que no hibrida en ningún templado.



**Figura 12.** Localización de los *primers np9-3 reverse* y *np9-EcoRI* en el ORF y región 3'UTR del ARN mensajero de *np9*. En azul se puede ver el *primer np9-EcoRI* que hibrida en el inicio del ORF. Mientras tanto en rojo se puede ver que el *primer np9-3 reverse* hibrida fuera del ORF; más precisamente en la región 3'UTR. Este juego de cebadores se espera que amplifique una región de 279 pb.

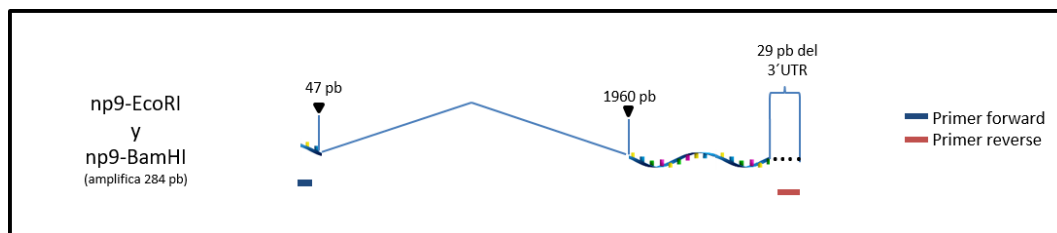


**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de la puesta a punto de la PCR a tiempo final con los *primers np9-EcoRI* y *np9-3 reverse* a tiempo final. Los números sobre cada carril indican la temperatura de *annealing* de cada PCR. La banda amplificada tiene un tamaño entre 200 y los 300 pb, coincidiendo aproximadamente con la banda esperada (279 pb). Para el control negativo de RT se utilizó el ADNc generado como control negativo de la retrotranscripción de las muestras de Jurkat y para el control negativo de PCR se utilizó H<sub>2</sub>O DEPC.

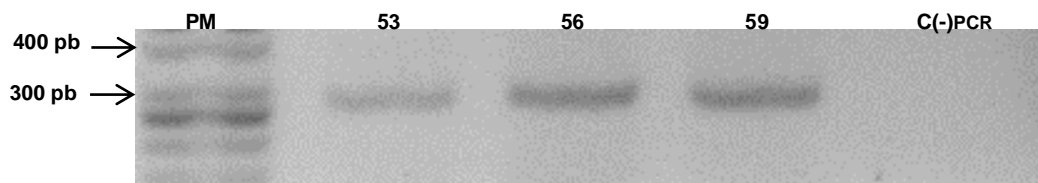
#### 4.2.5) Puesta a punto de la PCR a tiempo final para amplificar el ORF completo para clonado

Finalmente, se puso a punto la amplificación del ORF de *np9* completo con los *primers* con los sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (Figura 14), de manera de poder clonarlo en un vector de

expresión. El ciclado utilizado para la PCR fue 5 min a 94°C; 35 ciclos escalonados de 94°C por 30 segundos, 53/56/59°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos y, finalmente, 5 min 72°C. Como se observa en la Figura 15, se logró una amplificación de similar intensidad de banda con las temperaturas de *annealing* de 56 y 59°C, y el amplicón resultó ser un fragmento del tamaño esperado.



**Figura 14. Localización de los primers np9-EcoRI y np9-BamHI en el ORF y región 3' UTR del ARN mensajero de np9.** En azul se puede ver que np9-EcoRI hibrida en el inicio del ORF. Mientras tanto en rojo se puede ver que np9-BamHI hibrida fuera del ORF. Más precisamente en la región 3'UTR, unas 29 pb luego del codón STOP. Este juego de cebadores se espera que amplifique una región de 284pb.



**Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de la puesta a punto de la PCR a tiempo final con los primers np9-EcoRI y np9-BamHI.** Los números sobre cada carril indican la temperatura de *annealing* en cada PCR. La banda amplificada es ligeramente menor a 300 pb. Para el control negativo de PCR se utilizó H<sub>2</sub>O DEPC.

#### 4.2.6) Análisis de secuencias de productos amplificados

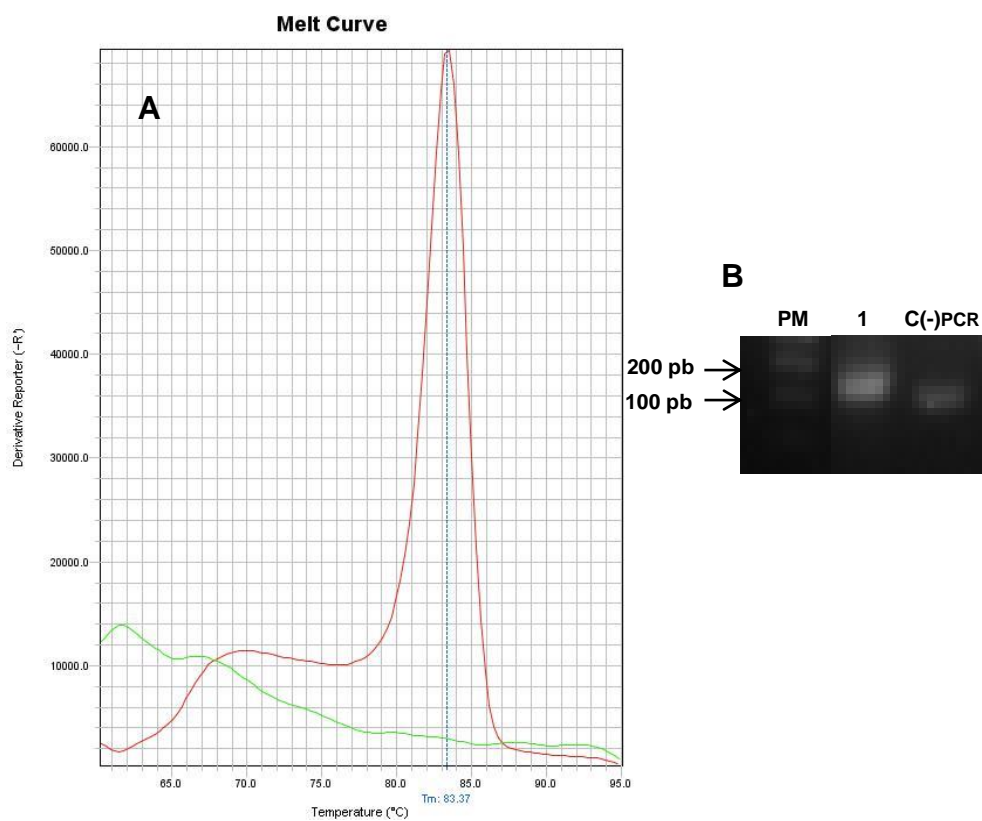
Por secuenciación se verificó la identidad del amplicón y se pudo comprobar que, efectivamente, se amplificó el gen *np9* y que en sus extremos se encuentran los sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *BamHI*.

Teniendo los resultados de secuenciación del gen completo, tanto a partir de los primers np9-EcoRI y np9-3 reverse (Figura 12) como los amplificados por np9-EcoRI y np9-BamHI (Figura 14), se realizó el alineamiento en el software MEGA X de estas secuencias conjuntamente con los primers que presuntamente son los que fallaron np9-1 reverse y





2012), a pesar de haber concluido anteriormente mediante ensayos *in silico*, que podrían no ser específicos para dicho oncogen. Sin embargo, sí podrían ser útiles para determinar los niveles de expresión de HERVs-K (HML-2) en diferentes ambientes celulares. Dado que estos *primers* ya habían sido utilizados en el laboratorio, se procedió directamente a poner a punto las condiciones de PCR a tiempo real para corroborar la especificidad de la amplificación. Como se observa en la Figura 17A, el pico de *melting* es simétrico, indicando la presencia de un único producto de amplificación lo cual se verificó por electroforesis en gel de agarosa (Figura 17B).



**Figura 17. Puesta a punto de la PCR a tiempo real de los *primers* obtenidos de (Gonzalez-Hernandez et al., 2012). A) Curva de *melting* del producto amplificado. En rojo se muestra la curva de *melting* correspondiente a Jurkat y en verde se muestra la del control negativo B) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% del producto único de la PCR a tiempo real. En el carril 1 se ve el producto de amplicación de Jurkat y en el carril C-PCR se utilizó H<sub>2</sub>O DEPC como control negativo.**

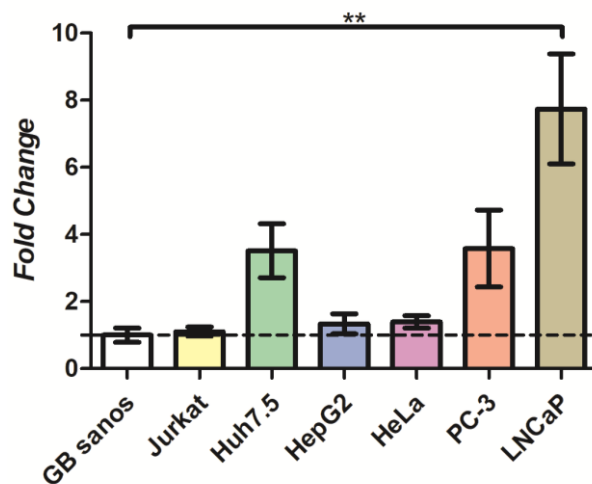
En suma, los *primers* reportados por Gonzalez-Hernandez et al., 2012 son adecuados para el análisis de la expresión de HERVs y fueron los utilizados a tales fines ya que los diseñados en el marco de la tesina para hibridar en el sitio de *splicing* no hibridan correctamente por la presencia de un codón extra.

### 4.3) Expresión relativa de retrovirus endógenos en distintas líneas celulares

La expresión de retrovirus endógenos está asociada a diversas patologías, entre ellas diversos tipos de cáncer. Ante la carencia de tejidos provenientes de tumores es interesante la posibilidad de estudiar la expresión relativa de retrovirus endógenos en diversas líneas celulares derivadas de tejidos tumorales, como una aproximación a lo que puede suceder en procesos tumorales en pacientes. Para ello se analizaron 6 líneas celulares diferentes (representativas de 4 tipos de cánceres) y se comparó la expresión respecto a los glóbulos blancos de donantes sanos (GB sanos), el cual representa un control no tumoral.

En la Figura 18 se ven los resultados del análisis de cuantificación relativa que se llevó a cabo utilizando el método de  $-\Delta\Delta Ct$ . El *fold change* en las líneas derivadas de cáncer de próstata fue el mayor: en LNCaP es de  $7,72\pm 1,64$  (SEM, *standard error mean*) siendo éste el ambiente celular que exhibe mayor expresión relativa de HERVs. En PC3 el *fold change* es de  $3,58\pm 1,14$  (SEM). La expresión en Huh7.5 es muy similar a la de PC3 ( $3,51\pm 0,81$ ). Sin embargo, tanto la expresión de la otra línea celular proveniente de HCC (HepG2), como la de las células HeLa y Jurkat son similares a la expresión en donantes sanos (*fold change*  $1,34\pm 0,30$ ,  $1,39\pm 0,18$  y  $1,11\pm 0,19$ , respectivamente).

De las 6 líneas celulares solamente se puede afirmar que LNCaP tiene una expresión estadísticamente mayor que los donantes sanos (test estadístico One-way ANOVA con corrección de Bonferroni). Si se comparan las líneas de HCC entre ellas se puede ver que hay diferencia de expresión, no obstante, esta diferencia no es estadísticamente significativa. Es importante mencionar que de todos modos se observa una tendencia hacia una mayor expresión en las líneas Huh7.5 y PC-3, diferencia que podría tornarse significativa en caso de incluir más réplicas biológicas.



**Figura 18. Expresión relativa de mensajeros del gen *env* de retrovirus endógenos en diferentes ambientes celulares.** Se utiliza la expresión en los glóbulos blancos de donantes sanos como calibrador (arbitrariamente considerada como 1). Las barras de error indican los errores estándar del promedio (SEM) de las réplicas biológicas (2-4 por cada línea celular y 2 donantes sanos, cada una con 3 réplicas técnicas). Las líneas celulares que tienen diferencia de expresión estadísticamente significativa (One-way ANOVA, con corrección de Bonferroni,  $p < 0.05$ ) de HERV-K (HML-2) comparado a los donantes sanos se indican con asteriscos.

Las diferencias en los niveles de expresión de los mensajeros de HERV-K que se observa entre dos líneas celulares derivadas de un mismo tipo tumoral (HCC: Huh7.5 vs HepG2; cáncer de próstata: LNCaP vs PC-3) pueden deberse a distintas causas:

1. Que los procesos tumorales sean diferentes y sean resultado de la activación de diferentes vías celulares; En Ma et al., 2016 se muestra que el grado de diferenciación de los tumores de hígado está relacionado con la expresión de retrovirus endógenos, cuanto más diferenciado, más expresa. Aunque en este estudio no se trabajan con las dos líneas celulares provenientes de HCC, se demuestra que el grado de diferenciación produce un cambio en la expresión, una hipótesis que también se maneja en Armbruster et al., 2002;
2. Características genéticas y epigenéticas propias de cada paciente del cual fueron extraídas originalmente. Estudios previos demostraron que la expresión de algunos HERV-K es muy variable entre distintas líneas celulares provenientes de cáncer de próstata (Goering et al., 2011) y que estas diferencias responden a causas multifactoriales. En dicho trabajo se discute que la línea celular LNCaP es una línea celular con capacidad de respuesta de andrógenos mientras que PC-3 es lo contrario, ya que carece de receptores de andrógenos. Además demuestran que la metilación del HERV-K17 en LNCaP es muy baja (2,8) mientras que en

PC-3 es mayor (37,5). En total consonancia con los resultados obtenidos en esta tesis, también describen que la expresión de HERVs-K (HERV-K 17 y HERV-k\_22q11.23) es mayor en LNCaP que en PC-3. Por tanto las diferencias genéticas y epigenéticas entre ambas líneas podrían explicar la expresión diferencial de HERVs hallada. La diferencia entre el artículo y esta tesis es que la región amplificada del HERV-K\_22q11.23 es parte del 5'UTR y la del HERV-K 17 no se especifica.

Si bien la expresión de retrovirus endógenos es muy variada en las diversas líneas celulares, resulta imposible saber mediante esta técnica si se expresan estas oncoproteínas en cada uno de estos tejidos debido a que la presencia del ARN mensajero no es sinónimo de síntesis de proteína (Armbruster et al., 2002). Por ejemplo, el ARN mensajero podría estar dentro de las células en cuerpos de procesamiento sin estar siendo traducido. Es por eso que para detectar la presencia de estas oncoproteínas en células o tejidos es fundamental realizar otros tipos de análisis, por ejemplo ensayos con anticuerpos (como *Western Blot* o inmunoprecipitación).

Con respecto a los donantes sanos, es importante destacar que, aunque su expresión promedio resultó comparable a la detectada en Jurkat (que deriva de una leucemia aguda de linfocitos T), HeLa (cáncer cérvico-uterino) y HepG2 (HCC), solamente se contó con dos muestras en el análisis, lo cual puede no ser representativo de la población sana en general. Por otra parte, no sólo se ha identificado la expresión de HERVs en tejidos no tumorales (Schmitt et al., 2015), sino que previamente en nuestro laboratorio se había determinado que la expresión era variable entre diferentes individuos (Fischer et al., 2014).

Además de estudiar la expresión en líneas celulares tumorales humanas, se incluyó el análisis de dos líneas celulares no tumorales animales a modo de verificar la ausencia de expresión específica de HERV-K. Los resultados de las líneas Vero y MDCK (Apéndice 1) no se incluyeron conjuntamente con los ya presentados para las líneas humanas debido que se considera fundamental la realización de una curva de calibración de los *primers* utilizados para medir su eficiencia de amplificación ya que estas muestras provienen de otros animales cuyos genes no necesariamente son iguales en secuencia a los nuestros. A pesar de ello se puede apreciar que en la línea MDCK, proveniente de perro, no se ve expresión de retrovirus endógenos; lo que coincide con lo esperado dado

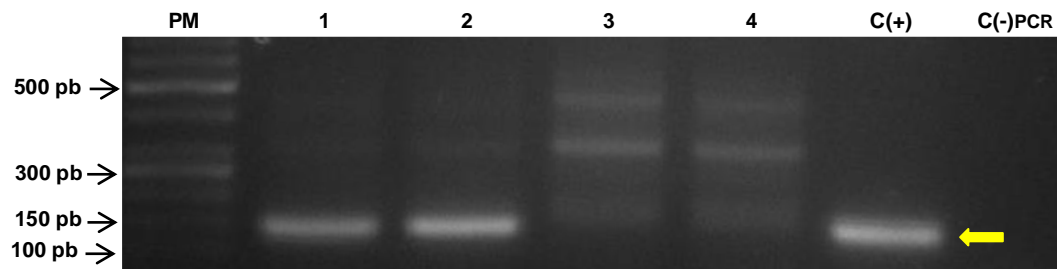
que los retrovirus endógenos HERV-K (HML-2) se integraron a la línea germinal del linaje humano.

Los estudios realizados en el presente estudio presentan algunas limitaciones. La primera de ellas es la baja cantidad de réplicas biológicas, ya que con un mayor número de réplicas biológicas los resultados obtenidos tendrían un mayor sustento estadístico. Por otra parte, no se realizó una curva de eficiencia de amplificación de los *primers* utilizados. De haberse realizado, y haberse obtenido una buena eficiencia (mayor a 95%), los resultados obtenidos de las líneas celulares de origen no humano podrían haber sido utilizados en esta tesina como controles.

En suma, se detectaron niveles de expresión de HERVs variables en diferentes ambientes celulares tumorales, siendo significativamente más altos en la línea LNCaP de cáncer de próstata.

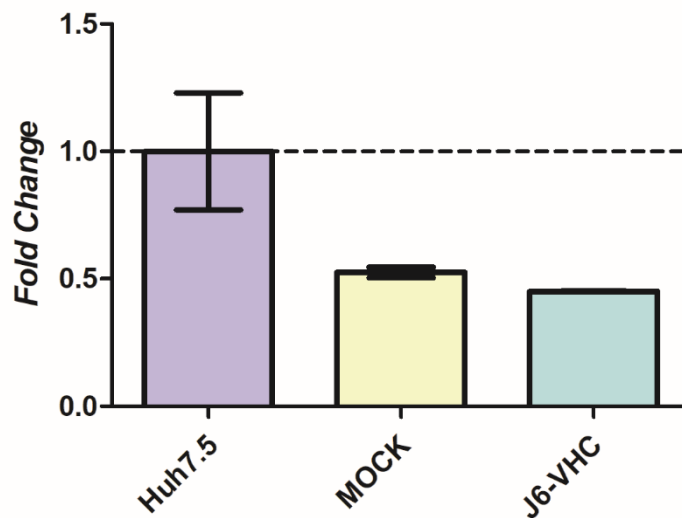
#### **4.4) Expresión relativa de retrovirus endógenos en líneas transfectadas con VHC**

Con el fin de indagar en las posibles causas de la generación de hepatocarcinoma como consecuencia de la infección por VHC, se estudió la expresión de retrovirus endógenos en la línea celular Huh7.5 transfectada con ARN de este virus. La presencia del VHC en las muestras analizadas se verificó amplificando la región de Okamoto por RT-PCR (Figura 19), por lo que se pudo comprobar que las células realmente estaban produciendo ARN viral 16 días post transfección con el clon de VHC. Como se puede observar en la Figura 19, se observa un amplicón de aproximadamente 136 pb correspondiente al genoma viral de VHC, mientras que en las células transfectadas sólo con el vehículo (Mock), se observan algunas bandas tenues de mayor al tamaño esperado las cuales representan productos inespecíficos. En conclusión, se puede afirmar que las células transfectadas efectivamente contenían ARN viral, y considerando que corresponden al día 16 post transfección, y que sufrieron pasajes celulares en 4 oportunidades durante ese período, es probable que el ARN detectado sea resultado de la replicación viral y no se corresponda con el ARN transfectado inicialmente (ya que la cantidad de células que lo contenían habría quedado diluida).



**Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la verificación de transfección de la línea Huh7.5 con VHC.** El amplicón esperado se sitúa cercano a los 150 pb y se indica con la flecha amarillas. Carriles 1 y 2: muestras J6-24 y J6-48 del día 16 post-transfección, respectivamente. Ambas muestras estaban transfectadas con VHC, una durante 24hs y otra durante 48hs. Carriles 3 y 4: muestras MOCK 1 y MOCK 2 del día 16 post-transfección, respectivamente. Ambas muestras estaban transfectadas sólo con el reactivo de transfección, una durante 24hs y otra durante 48hs. Para el control positivo se utilizó el vector del clon infeccioso de VHC. Para el control negativo de PCR se utilizó H<sub>2</sub>O DEPC.

Los resultados de la cuantificación de la expresión relativa en las dos condiciones de transfección, con VHC y MOCK, revelaron que no ocurrió un cambio significativo en la expresión con respecto a la condición calibradora sin transfectar (Figura 20).



**Figura 20. Expresión relativa de los genes de retrovirus endógenos en presencia del virus de la Hepatitis C.** Se utiliza el *fold change* de la línea celular Huh7.5 como calibrador. No se encuentra diferencia significativa de expresión de HERV-K (HML-2) entre las 3 muestras tras realizar el test estadístico One-way ANOVA, con corrección de Bonferroni. La muestra MOCK corresponde a la línea celular Huh7.5 a la que se le realizó un control de transfección con lipofectamina. La muestra J6-VHC corresponde a la línea celular Huh7.5 que fue transfectada con el clon infeccioso del VHC. Se emplearon 4 réplicas biológicas del calibrador y 2 réplicas biológicas de cada condición a evaluar. Las barras de error corresponden a errores estándar del promedio (SEM).

Aunque en la gráfica se puede apreciar que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las muestras transfectadas con VHC y los controles de transfección, no es posible afirmar que la infección por el VHC no aumenta la expresión de retrovirus endógenos dado que se transfectó una línea celular que tiene muchos de sus mecanismos de control celular alterados. Sería interesante comparar este análisis partiendo de tejidos de hígado, tanto sano como infectado, y así poder obtener resultados que emulen de mejor manera lo que ocurre en el cuerpo humano. Asimismo, aunque el uso del clon infeccioso es el abordaje experimental que más se acerca a una infección, tiene sus limitaciones. En primer lugar, las muestras estudiadas fueron resultado de la transfección del ARN viral y no de una infección; y por otra parte, el genoma del clon presenta mutaciones adaptativas para poder replicar en cultivo. Sin embargo, principalmente, si la expresión de HERVs es alta en diferentes tipos de cánceres, y en este trabajo se vio una tendencia a una mayor expresión en Huh7.5 versus GB sanos, pequeños cambios en la magnitud de esta expresión podrían no detectarse.



El resultado obtenido contrasta con los resultados de Tovo et al., 2020 en los que se muestra que el gen *pol* de HERV-K y H aumenta significativamente su expresión en pacientes pediátricos que sufren una infección por el VHC. Este aumento de expresión continúa incluso luego del *clearance* viral por lo que es posible que la predisposición a tener cáncer y a desórdenes autoinmunes una vez curado de la infección esté relacionado con este aspecto (Tovo et al., 2020). Sin embargo, los resultados podrían no ser comparables con los obtenidos en esta tesis ya que los transcritos estudiados son diferentes (*pol* versus transcritos derivados de *env*). A pesar de ello, Nellåker et al., 2006 muestra que la expresión de *gag* y *env* de HERV-W aumentan de manera similar frente a la infección con HSV-1, no así frente a la infección con Influenza, donde sí aumenta *env* pero no *gag*. Si se tiene presente que *gag* y *pol* son dos ORFs contenidos en el mismo transcrito, el aumento de expresión de uno de estos genes sería equiparable al del otro. Así es que entonces, considerando los resultados de Nellåker et al., 2006, conjuntamente con los de Tovo et al., 2020, se podría pensar que ante un aumento de *pol* (o *gag*), podría haber un aumento de *env* o sus transcritos alternativos, en caso de que la infección con VHC promueva un perfil de expresión de HERVs similar a HSV. De ocurrir de este modo, los resultados aquí mostrados contrastan con dicha hipótesis, aunque no puede descartarse la explicación mencionada anteriormente relacionada a una expresión basal de HERVs alta en la línea Huh7.5. Como se discutió previamente, se recomienda hacer otras aproximaciones.

A pesar de la carencia de estudios que relacionen la expresión de HERVs en infecciones con virus de la familia *Flaviviridae*, hay un estudio en el que se ve que la proteína X del virus de la Hepatitis B (Familia *Hepadnaviridae*) induce la expresión de *env* de HERV-W en células HepG2 por lo que se evidencia que se puede inducir la expresión de HERVs en cultivo celular a partir de algunas proteínas virales.

Sin embargo, en este trabajo no se detectó un cambio significativo en la expresión de retrovirus endógenos en las distintas condiciones de transfección con el ARN de VHC comparado al calibrador.

#### 4.5) Generación del vector de expresión de *np9*

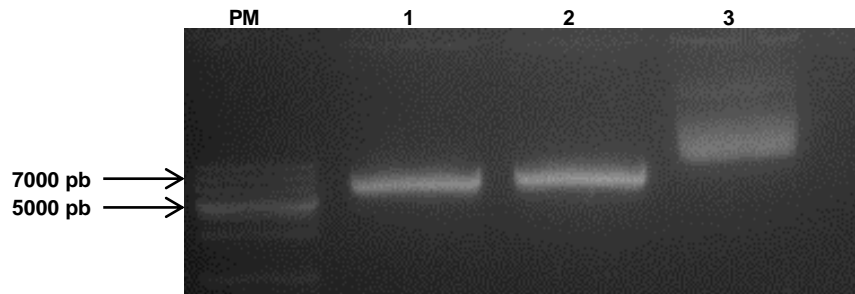
Para comprobar la presencia de estas oncoproteínas en células es necesario tener anticuerpos contra las mismas dado que la cuantificación de los ARN mensajeros no es un sinónimo de la presencia de proteínas. Como no hay anticuerpos comerciales contra ellas es necesario producir las proteínas de manera recombinante para generar los anticuerpos.

Para ello se optó por generar un vector de expresión de Np9 en células eucariotas. El vector utilizado fue p3x-FLAG-CMV-14 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Este vector tiene 6310 pb y se caracteriza por tener un gen de resistencia a ampicilina con su respectivo promotor y un origen de replicación lo que permite que se pueda replicar y seleccionar en bacterias. Además codifica para un marcador de selección contra la neomicina lo que permite que las células eucariotas que incorporen el vector sean seleccionadas; tiene el promotor de CMV (Citomegalovirus) previo al sitio donde se inserta el fragmento a expresar y, posterior al sitio de clonado, tiene un 3xFLAG lo que facilitará la purificación de la proteína a la hora de producirla (Figura Suplementaria 4).

Previo a clonar el gen *np9*, se digirió el vector con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* para generar los extremos cohesivos ya que el gen completo amplificado en la sección 3.14.1 contenía estos sitios de restricción. Debido a que el fragmento a escindir en el vector p3x-FLAG-CMV-14 es de 50 pb y no se apreciaría correctamente en un gel de agarosa, sumado al hecho de que se debía realizar una doble digestión y éstas deben ser puestas a punto previo a su realización, se digirió el vector DL-HCV-1b-F (Anexo 5) para poner a punto las condiciones de doble digestión ya que al ser digerido por estas dos enzimas produce dos fragmentos de tamaño apreciable en gel de agarosa (Figura Suplementaria 2).

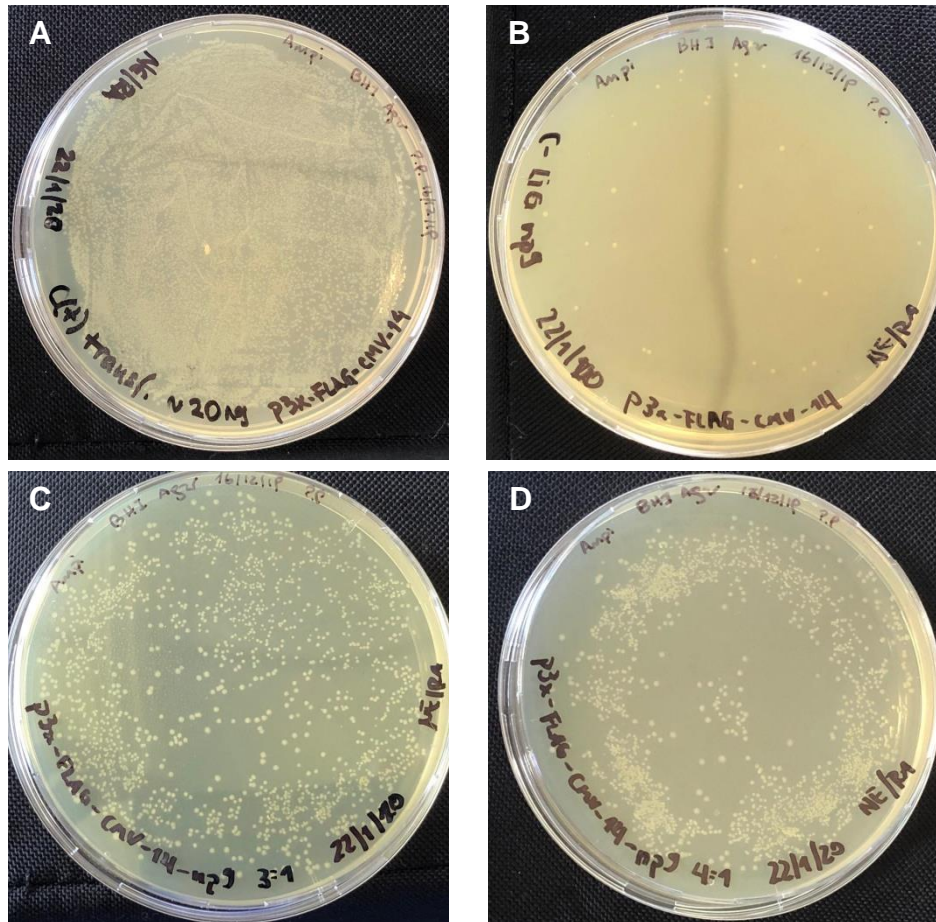
Teniendo la seguridad de que el protocolo a realizar era eficaz para la digestión con ambas enzimas se procedió a realizar la digestión del vector de expresión así como del producto de PCR de *np9* (generado con los *primers* de la Figura 13 por PCR a tiempo final y previamente purificado). Para visualizar que la digestión había sido realizada con éxito se realizó una electroforesis en gel de agarosa donde se pudo ver que el vector había sido cortado con éxito por las dos enzimas al apreciar una banda de 6000 pb que migra más en el gel que el vector sin digerir (Figura 21). Como era esperado la banda de 50 pb no se visualizó en el gel; por lo que haber realizado la puesta a punto de la digestión previo a digerirlo resultó

fundamental para poder proseguir con el clonado del vector con la seguridad de contar con un molde adecuado.



**Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% posterior a la doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* del vector p3x-FLAG-CMV-14. Carriles 1 y 2: dos alícuotas del vector p3x-FLAG-CMV-14 digerido. Carril 3: vector sin digerir como control.**

Teniendo el vector y el gen digeridos y purificados, se continuó con la ligación de estos dos fragmentos bajo las condiciones descritas en la sección 3.14.3 de Materiales y Métodos. Los vectores ligados fueron transformados en bacterias DH5- $\alpha$  competentes. Se realizaron en total 4 transformaciones, 3 con los productos de ligación y además un control positivo con el plásmido circular sin inserto. Como ya se describió, 2 ligaciones se realizaron contemplando dos *ratios* de inserto:vector diferente (3:1 y 4:1), y además se incluyó un control negativo de ligación (sólo vector digerido, sin inserto). Estas bacterias fueron sembradas en placas de LB con ampicilina por lo que solo crecieron las bacterias que tenían el plásmido (Figura 22).



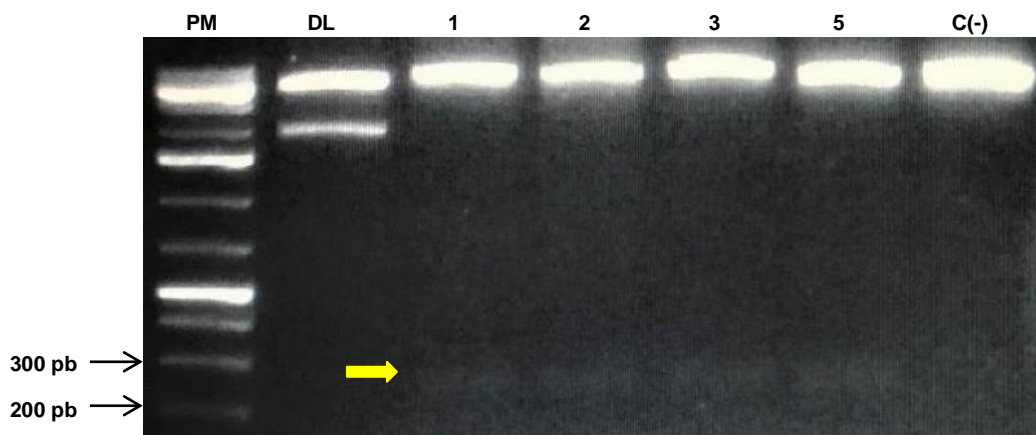
**Figura 22. Resultado de las transformaciones realizadas con el vector p3x-FLAG-CMV-14.** A) control positivo de transformación. B) control negativo de ligación. C) transformación con plásmidos que fueron ligados con una relación 3:1. D) transformación con plásmidos que fueron ligados con una relación 4:1.

Como se desprende de la Figura 22, la ligación fue exitosa con ambos *ratios*, aunque para el caso de 4:1 se obtuvo muchas más colonias y no bien aisladas, por lo cual para continuar se seleccionaron 5 de la placa que fue transformada con plásmidos ligados en una relación de 3:1. Estas 5 colonias fueron crecidas exitosamente en cultivo líquido con el fin de amplificar los vectores contenidos en ellas.

Además se picaron 3 colonias del control positivo de transfección para tener una alícuota mayor del vector original para utilizar en un futuro.

Los vectores fueron extraídos mediante un kit de extracción plasmídica, y con excepción de un clon resultado de la ligación de *np9* (clon 4) cuya extracción resultó de mala calidad, las restantes rindieron buena cantidad de plásmido como para enviar a secuenciar. Sin embargo, previo a la secuenciación, se verificó que la clonación había sido exitosa mediante la digestión del vector con las dos enzimas de restricción previamente

utilizadas esperando que el inserto de *np9* se visualizara en un gel de agarosa. Como se puede ver en la Figura 23 la digestión fue exitosa en los 4 clones restantes (1, 2, 3 y 5) en los que se visualizó el inserto de *np9*. La banda observada es de tenue intensidad en comparación con el resto del vector debido a su tamaño comparativamente mucho menor (por lo cual contiene menos intercalante de ADN). Cabe mencionar que se digirió además el vector sin inserto como control negativo donde efectivamente no se detectó la escisión de ninguna banda.



**Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% post digestión con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* del vector de expresión con el inserto.** Carril DL: vector DL-HCV-1b-F que se utilizó como control positivo de digestión. Carriles 1, 2, 3 y 5: vectores p3x-FLAG-CMV-14 con el inserto de *np9* digerido. Se aprecia que el inserto (señalado con flecha amarilla) tiene entre 200 y 300 pb como era de esperarse. Carril C(-):vector p3x-FLAG-CMV-14 que no fue sometido al proceso de clonación (sin inserto).

Tras verificar que el vector tenía inserto el gen *np9*, se procedió a secuenciar cada uno de los mismos para determinar la secuencia de *np9* que fue clonada. De estos datos se obtuvo que ninguno de los insertos tenía exactamente la misma secuencia de *np9* que se había obtenido como producto de secuenciación previamente (Figura 24). Las mutaciones halladas en cada una de ellas se describen en la Tabla 4. A pesar de haberse detectado cambios en los clones, es de destacar que la secuencia obtenida a partir del producto de PCR de *np9* de la línea celular Jurkat exhibe la misma identidad nucleotídica que la secuencia maestra obtenida por la MSc. Sabrina Fischer a partir de 10 muestras de pacientes con leucemia linfóide crónica y 4 donantes sanos (Fischer, 2015), lo cual indica que a nivel poblacional, este gen parece ser muy conservado.

np9 completo	ATG	AAC	CCA	TCG	GAG	ATG	CAA	AGA	AAA	GGG	CCT	CCA	CAG	AGA	TGT	CTG	CAG	GTG	TAC	CCA
np9-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
np9-2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
np9-3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
np9-5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
np9-Fischer	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
np9 completo	ACA	GCT	CCG	AAG	AGA	CAG	CGA	CCA	TCG	AGA	ACG	GGC	CAT	GAT	GAC	GAT	GGC	GGT	TTT	GTC
np9-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
np9-2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
np9-3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
np9-5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
np9-Fischer	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
np9 completo	GAA	AAG	AAA	AGG	GGG	AAA	TGT	GGG	GAA	AAG	CAA	GAG	AGA	TCA	GAT	TGT	TAC	TGT	GTC	TGT
np9-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
np9-2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
np9-3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
np9-5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
np9-Fischer	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
np9 completo	GTA	GAA	AGA	AGT	AGA	CAT	AGG	AGA	CTC	CAT	TTT	GTT	CTG	TAC	TAA					
np9-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...					
np9-2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...					
np9-3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...					
np9-5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...					
np9-Fischer	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...					

**Figura 24. Alineamiento de las secuencias de *np9* de los clones analizados.** La secuencia obtenida del producto de secuenciación de *np9* completo amplificado a partir de la línea celular Jurkat se empleó como secuencia referencia. Además se indica la secuencia maestra que obtuvo la MSc. Sabrina Fischer en su maestría (Fischer, 2015) a partir de muestras de 10 pacientes con leucemia linfocítica crónica y 4 pacientes sanos. En el recuadro rojo se marcan las mutaciones no sinónimas y en verde las sinónimas encontradas en los clones.

**Tabla 4. Mutaciones en las secuencias de *np9* que fueron clonadas en el vector p3x-FLAG-CMV-14.**

Vector (p3x-FLAG- CMV-14)	Modificación nucleotídica			Modificación aminoacídica			Tipo de mutación *
	MutN	PosN	OriN	MutP	PosP	OriP	
np9-1	A	143	G	E	48	G	NS
np9-2	G	24	A	R	8	R	S
	G	56	A	C	19	Y	NS
	G	71	A	R	24	K	NS
np9-3	A	33	T	P	11	P	S
np9-5	G	77	A	R	26	Q	NS

**Referencias:**

**MutN:** mutación nucleotídica que tiene la secuencia de *np9* secuenciada a partir del vector

**PosN:** posición en el ADN en la que se generó la mutación

**OriN:** nucleótido que se esperaba encontrar como resultado de la secuenciación (según secuenciación original del producto de PCR)

**MutP:** aminoácido (aá) que se generaría como producto del cambio aminoacídico

**PosP:** posición del aá que cambiaría

**OriP:** aá que se esperaba obtener en la secuencia proteica según secuenciación original del producto de PCR.

\* **S:** sinónima; **NS:** no sinónima

Todos los vectores generados en el marco de esta tesina presentan mutaciones puntuales. Solamente el vector p3x-FLAG-CMV-14-*np9-3* presenta una mutación silenciosa por lo que sería el que está en mejores condiciones de ser utilizado para ensayos *in vitro* o para producción de proteínas aunque se corre el riesgo que el cambio de codón produzca un cambio de plegamiento a nivel proteico debido a una diferencia en la velocidad de traducción. La mutación en el vector p3x-FLAG-CMV-14-*np9-1* produce el cambio de un ácido glutámico en lugar de una glicina, por lo que se estaría cambiando un aminoácido (aá) apolar por uno polar, lo que muy posiblemente tenga consecuencias conformacionales. El vector p3x-FLAG-CMV-14-*np9-2* posee 3 mutaciones. Una de ellas es silenciosa. Otra induce el cambio de una cisteína en lugar de una tirosina en la posición 19 de la proteína, lo que es un cambio significativo ya que si bien ambos aá son polares, poseen características muy distintas. La tirosina es un aá grande con una cadena lateral aromática mientras que la cisteína es un aá pequeño con un grupo tiol que le permite formar puente disulfuro con otras cisteínas. La otra sustitución se daría en la posición 24

de la cadena polipeptídica y se cambiarían una arginina en lugar de una lisina. Estos dos aá poseen propiedades fisicoquímicas similares por lo que a nivel estructural no se esperaría un gran cambio. Finalmente el p3x-FLAG-CMV-14-np9-5 tiene un solo cambio nucleotídico en la posición 26. Este cambio es de una arginina en lugar de una glutamina, por lo que si bien ambos aminoácidos tienen cadenas polares, estos tienen propiedades fisicoquímicas muy diferentes.

De todas estas mutaciones, solamente 2 caen en dominios putativos: las sustituciones K24R y Q26R. Ambas se ubican en un dominio de localización nuclear (Armbruster et al., 2002) y el sitio de unión a la proteína PLZF (Denne et al., 2007). Estas mutaciones podrían interferir en la translocación de la proteína al núcleo aunque Np9 tiene otros dos dominios putativos de localización nuclear. Sin embargo, la proteína PLZF interactúa con Np9 solo en ese dominio por lo que un cambio en esa región podría inhibir su unión lo que produciría que PLZF inhiba la expresión del proto.oncogen *c-myc* (Denne et al., 2007), un gen que puede inducir las células a su proliferación, su control de sobrevivencia y diferenciación (Patel et al., 2004).

Las mutaciones encontradas en estos fragmentos clonados son muy posiblemente producto de una amplificación con una polimerasa de baja fidelidad, si bien no puede descartarse que sean cambios intrínsecos a las múltiples copias de secuencias provirales de HERV-K presentes en nuestro genoma. Si bien podrían no resultar útiles para la producción de anticuerpos, estos vectores pueden ser utilizados para ensayos de funcionalidad de Np9 en cultivo celular y así potencialmente identificar si hay algún dominio de esta proteína que tenga mayor importancia a nivel celular.

En suma, se logró generar vectores de expresión de 4 variantes de Np9, 3 de ellos pueden ser empleados para ensayos de funcionalidad en cultivo celular y uno de ellos podría servir para la producción de anticuerpos.



## 5) Conclusiones

A continuación se resumen las principales conclusiones de este trabajo sobre el estudio de la expresión de retrovirus endógenos humanos en diferentes ambientes celulares:

- Se logró la puesta a punto exitosa de la amplificación del gen *np9* completo por PCR a tiempo final por dos aproximaciones distintas, en una de las cuales se amplifica una región 3'UTR que no había sido descrita previamente, lográndose la secuencia del ORF completo y 51 pb de la región 3'UTR. El otro abordaje incorpora sitios de corte para enzimas de restricción y permite el clonado del ORF en vectores de expresión.
- El análisis de la expresión relativa de genes derivados de *env* en líneas celulares tumorales humanas evidenció una mayor actividad transcripcional en la línea LNCaP derivada de cáncer de próstata. Este aumento de expresión respecto a los donantes sanos, empleados como calibradores, resultó estadísticamente significativo. Adicionalmente, otras dos líneas mostraron una tendencia hacia un incremento en la expresión (líneas Huh7.5 de HCC y PC-3 de cáncer de próstata), aunque las diferencias en actividad no fueron significativas.
- La expresión de HERVs en 2 muestras de glóbulos blancos provenientes de pacientes sanos reveló niveles comparables a los de las líneas celulares Jurkat (leucemia linfocítica aguda), HeLa (cáncer cérvico-uterino) y HepG2 (HCC).
- La transfección de ARN del virus de la Hepatitis C no parece influenciar en los niveles de expresión de HERVs, según resultados obtenidos a partir de la línea Huh7.5 derivada de hepatocarcinoma.
- Se generaron 4 vectores de expresión de Np9 que pueden ser de utilidad para ensayos de funcionalidad en cultivo celular.

## 6) Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos, se sugieren las siguientes perspectivas de investigación:

- Realizar análisis transcriptómicos a nivel computacional para conocer mejor la región 5'UTR de los transcritos derivados del gen *env* para poder diseñar *primers* que permitan la amplificación exclusiva de *np9*.
- Realizar ensayos de expresión relativa en un mayor número de líneas celulares tumorales y en lo posible tejidos humanos derivados de procesos oncogénicos o infecciones virales para determinar la variabilidad de expresión de HERVs en ambientes celulares más diversos.
- Aumentar la cantidad de donantes sanos de glóbulos blancos para poder tener un número más representativo de individuos que permita minimizar la variabilidad presente en la población y obtener una mejor idea de la expresión en tejidos sanos.
- Analizar más clones resultado de la ligación y transformación de *np9* en el vector de expresión, en búsqueda de uno que exprese la proteína cuya secuencia fue inicialmente clonada.
- Realizar análisis transcriptómicos para detectar posibles polimorfismos del gen *np9* como así de otros genes de retrovirus endógenos.
- Transfectar el ADN de los vectores generados en diferentes líneas celulares y analizar la expresión de genes de vías de señalización celular implicados en la oncogénesis para aproximarnos a los mecanismos subyacentes a dichos procesos en relación a la expresión de *np9*.

## 7) Referencias bibliográficas

- Aldunate, F. (2019). *Sustituciones Asociadas a Resistencia a Drogas Antivirales Directas en las Regiones NS5A y NS5B del genoma del Virus de la Hepatitis C en pacientes uruguayos*.
- Armbruster, V., Sauter, M., Krautkraemer, E., Meese, E., Kleiman, A., Best, B., Roemer, K., & Mueller-Lantsch, N. (2002). A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clinical Cancer Research*, 8(6), 1800–1807.
- Bannert, N., & Kurth, R. (2004). Retroelements and the human genome: New perspectives on an old relation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404838101>
- Barbulescu, M., Turner, G., Seaman, M. I., Deinard, A. S., Kidd, K. K., & Lenz, J. (1999). Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Current Biology*, 9(16), 861-S1. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80390-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80390-X)
- Bertino, G., Demma, S., Ardiri, A., Proiti, M., Malaguarnera, G., Bertino, N., Malaguarnera, M., & Malaguarnera, M. (2014). Hepatocellular Carcinoma: Novel Molecular Targets in Carcinogenesis for Future Therapies. *BioMed Research International*, 2014, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2014/203693>
- Blight, K. J., McKeating, J. A., & Rice, C. M. (2002). Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology*, 76(24), 13001–13014. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.24.13001-13014.2002>
- Blond, J.-L., Lavillette, D., Cheynet, V., Bouton, O., Oriol, G., Chapel-Fernandes, S., Mandrand, B., Mallet, F., & Cosset, F.-L. (2000). An Envelope Glycoprotein of the Human Endogenous Retrovirus HERV-W Is Expressed in the Human Placenta and Fuses Cells Expressing the Type D Mammalian Retrovirus Receptor. *Journal of Virology*, 74(7), 3321–3329. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.7.3321-3329.2000>
- Bravi, F., Bosetti, C., Tavani, A., Gallus, S., & La Vecchia, C. (2013). Coffee Reduces Risk for Hepatocellular Carcinoma: An Updated Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 11(11), 1413-1421.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.04.039>
- Buzdin, A., Kovalskaya-Alexandrova, E., Gogvadze, E., & Sverdlov, E. (2006). At Least 50% of Human-Specific HERV-K (HML-2) Long Terminal Repeats Serve In Vivo as Active Promoters for Host Nonrepetitive DNA Transcription. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.00871-06>
- Cantaloube, J.-F., Gallian, P., Attoui, H., Biagini, P., De Micco, P., & de Lamballerie, X. (2005). Genotype Distribution and Molecular Epidemiology of Hepatitis C Virus in Blood Donors from Southeast France. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 3624–3629. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.3624-3629.2005>
- Chaffanet, M., Popovici, C., Leroux, D., Jacrot, M., Adélaïde, J., Dastugue, N., Grégoire, M. J., Hagemeyer, A., Lafage-Pochitaloff, M., Birnbaum, D., & Pébusque, M. J. (1998). t(6;8), t(8;9) and t(8;13) translocations associated with stem cell myeloproliferative disorders have close or identical breakpoints in chromosome region 8p11-12. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201601>
- Chen, T., Meng, Z., Gan, Y., Wang, X., Xu, F., Gu, Y., Xu, X., Tang, J., Zhou, H., Zhang,

- X., Gan, X., Van Ness, C., Xu, G., Huang, L., Zhang, X., Fang, Y., Wu, J., Zheng, S., Jin, J., ... Xu, R. (2013). The viral oncogene Np9 acts as a critical molecular switch for co-activating  $\beta$ -catenin, ERK, Akt and Notch1 and promoting the growth of human leukemia stem/progenitor cells. *Leukemia*, 27(7), 1469–1478. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.8>
- Cohen, M., & Larsson, E. (1988). Human endogenous retroviruses. *BioEssays*, 9(6), 191–196. <https://doi.org/10.1002/bies.950090603>
- Contreras-Galindo, R., López, P., Vélez, R., & Yamamura, Y. (2007). HIV-1 Infection Increases the Expression of Human Endogenous Retroviruses Type K (HERV-K) in Vitro. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 23(1), 116–122. <https://doi.org/10.1089/aid.2006.0117>
- Dai, L., Del Valle, L., Miley, W., Whitby, D., Ochoa, A. C., Flemington, E. K., & Qin, Z. (2018). Transactivation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) by KSHV promotes Kaposi's sarcoma development. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0282-4>
- Davari Ejthadi, H., Martin, J. H., Junying, J., Roden, D. A., Lahiri, M., Warren, P., Murray, P. G., & Nelson, P. N. (2005). A novel multiplex RT-PCR system detects human endogenous retrovirus-K in breast cancer. *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0378-8>
- Denne, M., Sauter, M., Ambruester, V., Licht, J. D., Roemer, K., & Mueller-Lantzsch, N. (2007). Physical and Functional Interactions of Human Endogenous Retrovirus Proteins Np9 and Rec with the Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein. *Journal of Virology*, 81(11), 5607–5616. <https://doi.org/10.1128/JVI.02771-06>
- Depil, S., Roche, C., Dussart, P., & Prin, L. (2002). Expression of a human endogenous retrovirus, HERV-K, in the blood cells of leukemia patients. *Leukemia*, 16(2), 254–259. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402355>
- Downey, R. F., Sullivan, F. J., Wang-Johanning, F., Ambs, S., Giles, F. J., & Glynn, S. A. (2015). Human endogenous retrovirus K and cancer: Innocent bystander or tumorigenic accomplice? *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.29003>
- Echeverría, N. (2019). *Variabilidad genética, resistencia al tratamiento y eficiencia traduccional del Virus de la Hepatitis C: Caracterización de factores virales y del hospedero*.
- Ehlhardt, S., Seifert, M., Schneider, J., Ojak, A., Zang, K. D., & Mehraein, Y. (2006). Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) Rec expression and transcriptional activities in normal and rheumatoid arthritis synovia. *Journal of Rheumatology*.
- El-Serag, H. B. (2011). Hepatocellular carcinoma. In *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001683>
- El-Serag, H. B. (2012). Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.061>
- Fava, P., Bergallo, M., Astrua, C., Brizio, M., Galliano, I., Montanari, P., Tovo, P. A., Novelli, M., Savoia, P., Quaglino, P., & Fierro, M. T. (2016). Human Endogenous Retrovirus Expression in Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Dermatology*. <https://doi.org/10.1159/000438669>

- Fischer, S. (2015). *Estudio de la expresión de retrovirus endógenos humanos y de la abundancia de repetidos alfa a nivel centromérico en leucemia linfocítica crónica.*
- Fischer, S., Echeverría, N., Moratorio, G., Landoni, A. I., Dighiero, G., Cristina, J., Oppezzo, P., & Moreno, P. (2014). Human endogenous retrovirus np9 gene is over expressed in chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia Research Reports*, 3(2), 70–72. <https://doi.org/10.1016/j.lrr.2014.06.005>
- Garcia-Montojo, M., Doucet-O'Hare, T., Henderson, L., & Nath, A. (2018). Human endogenous retrovirus-K (HML-2): a comprehensive review. In *Critical Reviews in Microbiology*. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1501345>
- Geng, S., Zhao, J., Gu, L., Xu, X., & Liu, H. (2010). The expression of human endogenous retrovirus K envelope protein in breast tumor and its significance. *Chinese Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-8179.2010.22.007>
- Gitlin, S. D., Galindo, R. C., Kaplan, M. H., & Markovitz, D. M. (2008). Role of Human Endogenous Retroviruses in Lymphoma Pathogenesis and a Possible Biomarker of Disease. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.v112.11.3751.3751>
- Goering, W., Ribarska, T., & Schulz, W. A. (2011). Selective changes of retroelement expression in human prostate cancer. *Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr181>
- Goering, W., Schmitt, K., Dostert, M., Schaal, H., Deenen, R., Mayer, J., & Schulz, W. A. (2015). Human Endogenous Retrovirus HERV-K ( HML-2 ) Activity in Prostate Cancer Is Dominated by a Few Loci. *The Prostate*, 75, 1958–1971. <https://doi.org/10.1002/pros.23095>
- Gonzalez-Hernandez, M. J., Swanson, M. D., Contreras-Galindo, R., Cookinham, S., King, S. R., Noel, R. J., Kaplan, M. H., & Markovitz, D. M. (2012). Expression of Human Endogenous Retrovirus Type K (HML-2) Is Activated by the Tat Protein of HIV-1. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.07215-11>
- Griffiths, D. J. (2001). Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biology*, 2(6), REVIEWS1017. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-6-reviews1017>
- Hanke, K., Chudak, C., Kurth, R., & Bannert, N. (2013). The Rec protein of HERV-K(HML-2) upregulates androgen receptor activity by binding to the human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein (hSGT). *International Journal of Cancer*, 132(3), 556–567. <https://doi.org/10.1002/ijc.27693>
- Heidmann, O., Béguin, A., Paternina, J., Berthier, R., Deloger, M., Bawa, O., & Heidmann, T. (2017). HEMO, an ancestral endogenous retroviral envelope protein shed in the blood of pregnant women and expressed in pluripotent stem cells and tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702204114>
- Heyne, K., Kölsch, K., Bruand, M., Kremmer, E., Grässer, F. A., Mayer, J., & Roemer, K. (2015). Np9, a cellular protein of retroviral ancestry restricted to human, chimpanzee and gorilla, binds and regulates ubiquitin ligase MDM2. *Cell Cycle*, 14(16), 2619–2633. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1064565>
- Hohn, O., Hanke, K., & Bannert, N. (2013). HERV-K(HML-2), the Best Preserved Family of HERVs: Endogenization, Expression, and Implications in Health and Disease.

- Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Chu, T. M., Wajsman, Z. L., Friedman, M., Papsidero, L., Kim, U., Chai, L. S., Kakati, S., Arya, S. K., & Sandberg, A. A. (1980). The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Progress in Clinical and Biological Research*.
- Iramaneerat, K., Rattanatunyong, P., Khemapech, N., Triratanachat, S., & Mutirangura, A. (2011). HERV-K hypomethylation in ovarian clear cell carcinoma is associated with a poor prognosis and platinum resistance. *International Journal of Gynecological Cancer*. <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e3182021c1a>
- Iwabuchi, H., Kakihara, T., Kobayashi, T., Imai, C., Tanaka, A., Uchiyama, M., & Fukuda, T. (2004). A gene homologous to human endogenous retrovirus overexpressed in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*. <https://doi.org/10.1080/10428190412331272758>
- Jern, P., Sperber, G. O., & Blomberg, J. (2005). Use of Endogenous Retroviral Sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy. *Retrovirology*. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-2-50>
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., & Jones, L. W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative Urology*.
- Kleiman, A., Senyuta, N., Tryakin, A., Sauter, M., Karseladze, A., Tjulandin, S., Gurtsevitch, V., & Mueller-Lantzsch, N. (2004). HERV-K(HML-2) GAG/ENV antibodies as indicator for therapy effect in patients with germ cell tumors. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.11649>
- Knowles, B., & Aden, D. (1983). *HUMAN HEPATOMADERIVED CELL LINE, PROCESS FOR PREPARATION THEREOF, AND USES THEREFOR*. <https://patentimages.storage.googleapis.com/39/55/a0/57fbaac0541403/US4393133.pdf>
- Kovalskaya, E., Buzdin, A., Gogvadze, E., Vinogradova, T., & Sverdlov, E. (2006). Functional human endogenous retroviral LTR transcription start sites are located between the R and U5 regions. *Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.007>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., Fitzhugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., Levine, R., McEwan, P., ... Morgan, M. J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35057062>
- Lemaître, C., Tsang, J., Bireau, C., Heidmann, T., & Dewannieux, M. (2017). A human endogenous retrovirus-derived gene that can contribute to oncogenesis by activating the ERK pathway and inducing migration and invasion. *PLOS Pathogens*, 13(6), e1006451. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006451>
- Lin, M. V., King, L. Y., & Chung, R. T. (2015). Hepatitis C Virus--Associated Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040323>

- Liu, C., Liu, L., Wang, X., Liu, Y., Wang, M., & Zhu, F. (2017). HBV X Protein induces overexpression of HERV-W env through NF- $\kappa$ B in HepG2 cells. *Virus Genes*. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1479-2>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lower, R., Tonjes, R., Korbmacher, C., Kurth, R., & Lower, J. (1995). Identification of a Rev-Related Protein by Analysis of Spliced Transcripts of the Human Endogenous. *Journal of Virology*, *69*(1), 141–149.
- Ma, W., Hong, Z., Liu, H., Chen, X., Ding, L., Liu, Z., Zhou, F., & Yuan, Y. (2016). Human Endogenous Retroviruses-K (HML-2) Expression Is Correlated with Prognosis and Progress of Hepatocellular Carcinoma. *BioMed Research International*, *2016*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/8201642>
- Manns, M. P., Buti, M., Gane, E., Pawlotsky, J. M., Razavi, H., Terrault, N., & Younossi, Z. (2017). Hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.6>
- Mi, S., Lee, X., Li, X., Veldman, G. M., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X.-Y., Edouard, P., Howes, S., Keith, J. C., & McCoy, J. M. (2000). Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, *403*(6771), 785–789. <https://doi.org/10.1038/35001608>
- Nakabayashi, H., Miyano, K., Sato, J., Yamane, T., & Taketa, K. (1982). Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Research*.
- Nellåker, C., Yao, Y., Jones-Brando, L., Mallet, F., Yolken, R. H., & Karlsson, H. (2006). Transactivation of elements in the human endogenous retrovirus W family by viral infection. *Retrovirology*. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-3-44>
- Ono, M., Kawakami, M., & Ushikubo, H. (1987). Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.61.6.2059-2062.1987>
- Patel, J. H., Loboda, A. P., Showe, M. K., Showe, L. C., & McMahon, S. B. (2004). Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. In *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc1393>
- Patzke, S., Lindeskog, M., Munthe, E., & Aasheim, H. (2002). Characterization of a Novel Human Endogenous Retrovirus , HERV-H / F , Expressed in Human Leukemia Cell Lines. *Virology*, *303*, 164–173. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1615>
- Pérot, P., Mugnier, N., Montgiraud, C., Gimenez, J., Jaillard, M., Bonnaud, B., & Mallet, F. (2012). Microarray-based sketches of the HERV transcriptome landscape. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040194>
- Robinson, D., Van Allen, E. M., Wu, Y.-M., Schultz, N., Lonigro, R. J., Mosquera, J.-M., Montgomery, B., Taplin, M.-E., Pritchard, C. C., Attard, G., Beltran, H., Abida, W., Bradley, R. K., Vinson, J., Cao, X., Vats, P., Kunju, L. P., Hussain, M., Feng, F. Y., ... Chinnaiyan, A. M. (2015). Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. *Cell*, *161*(5), 1215–1228. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.001>
- Rycaj, K., Plummer, J. B., Yin, B., Li, M., Garza, J., Radvanyi, L., Ramondetta, L. M., Lin,

- K., Johanning, G. L., Tang, D. G., & Wang-Johanning, F. (2015). Cytotoxicity of human endogenous retrovirus K-specific T cells toward autologous ovarian cancer cells. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0388>
- Scherer, W. F., Syverton, J. T., & Gey, G. O. (1953). STUDIES ON THE PROPAGATION IN VITRO OF POLIOMYELITIS VIRUSES. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.97.5.695>
- Schiavetti, F., Thonnard, J., Colau, D., Boon, T., & Coulie, P. G. (2002). A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Research*, 62(19), 5510–5516. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12359761>
- Schmitt, K., Heyne, K., Roemer, K., Meese, E., & Mayer, J. (2015). HERV-K(HML-2) rec and np9 transcripts not restricted to disease but present in many normal human tissues. *Mobile DNA*, 6(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13100-015-0035-7>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schneider, P. M., Witzel-Schlömp, K., Rittner, C., & Zhang, L. (2001). The endogenous retroviral insertion in the human complement c4 gene modulates the expression of homologous genes by antisense inhibition. *Immunogenetics*. <https://doi.org/10.1007/s002510000288>
- Schneider, U., Schwenk, H. -U, & Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910190505>
- Singh, S., Kaye, S., Gore, M. E., McClure, M. O., & Bunker, C. B. (2009). The role of human endogenous retroviruses in melanoma. *British Journal of Dermatology*, 161(6), 1225–1231. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09415.x>
- Stengel, S., Fiebig, U., Kurth, R., & Denner, J. (2010). Regulation of human endogenous retrovirus-K expression in melanomas by CpG methylation. *Genes Chromosomes and Cancer*. <https://doi.org/10.1002/gcc.20751>
- Subramanian, R. P., Wildschutte, J. H., Russo, C., & Coffin, J. M. (2011). Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. *Retrovirology*, 8(1), 90. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-90>
- Sutkowski, N., Chen, G., Calderon, G., & Huber, B. T. (2004). Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein LMP-2A Is Sufficient for Transactivation of the Human Endogenous Retrovirus HERV-K18. *Journal of Virology*, 78(14), 7852–7860. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.14.7852-7860.2004>
- Tomlins, S. A., Laxman, B., Dhanasekaran, S. M., Helgeson, B. E., Cao, X., Morris, D. S., Menon, A., Jing, X., Cao, Q., Han, B., Yu, J., Wang, L., Montie, J. E., Rubin, M. A., Pienta, K. J., Roulston, D., Shah, R. B., Varambally, S., Mehra, R., & Chinnaiyan, A. M. (2007). Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06024>
- Toufaily, C., Landry, S., Leib-Mosch, C., Rassart, E., & Barbeau, B. (2011). Activation of LTRs from Different Human Endogenous Retrovirus (HERV) Families by the HTLV-1 Tax Protein and T-Cell Activators. *Viruses*, 3(11), 2146–2159.



<https://doi.org/10.3390/v3112146>

- Tovo, P. A., Garazzino, S., Daprà, V., Alliaudi, C., Silvestro, E., Calvi, C., Montanari, P., Galliano, I., & Bergallo, M. (2020). Chronic hcv infection is associated with overexpression of human endogenous retroviruses that persists after drug-induced viral clearance. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms211113980>
- Vargiu, L., Rodriguez-Tomé, P., Sperber, G. O., Cadeddu, M., Grandi, N., Blikstad, V., Tramontano, E., & Blomberg, J. (2016). Classification and characterization of human endogenous retroviruses; mosaic forms are common. *Retrovirology*, 13(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0232-y>
- Varmus, H., & June, I. (1988). Retroviruses. *Science*, 240(4858), 1427–1435.
- Wang-Johanning, F., Frost, A. R., Jian, B., Epp, L., Lu, D. W., & Johanning, G. L. (2003). Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206241>
- Wang-Johanning, F., Frost, A. R., Johanning, G. L., Khazaeli, M. B., LoBuglio, A. F., Shaw, D. R., & Strong, T. V. (2001). Expression of human endogenous retrovirus K envelope transcripts in human breast cancer. *Clinical Cancer Research*.
- Wang-Johanning, F., Liu, J., Rycaj, K., Huang, M., Tsai, K., Rosen, D. G., Chen, D. T., Lu, D. W., Barnhart, K. F., & Johanning, G. L. (2007). Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.22256>
- Wang-Johanning, F., Rycaj, K., Plummer, J. B., Li, M., Yin, B., Frerich, K., Garza, J. G., Shen, J., Lin, K., Yan, P., Glynn, S. A., Dorsey, T. H., Hunt, K. K., Ambbs, S., & Johanning, G. L. (2012). Immunotherapeutic potential of anti-human endogenous retrovirus-k envelope protein antibodies in targeting breast tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr540>
- Wang, L. S., D'Souza, L. S., & Jacobson, I. M. (2016). Hepatitis C—A clinical review. In *Journal of Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/jmv.24554>
- Wang, S., Huang, J., Lyu, H., Lee, C.-K., Tan, J., Wang, J., & Liu, B. (2013). Functional cooperation of miR-125a, miR-125b, and miR-205 in entinostat-induced downregulation of erbB2/erbB3 and apoptosis in breast cancer cells. *Cell Death & Disease*, 4(3), e556–e556. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.79>
- Wodrich, H., & Kräusslich, H. G. (2001). Nucleocytoplasmic RNA transport in retroviral replication. In *Results and problems in cell differentiation*. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-40025-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-540-40025-7_12)
- Yasumura, Y., & Kawakita. (1963). A line of cells derived from African green monkey kidney. *Nippon Rinsho*, 21, 1209–1210.
- Yu, P., Lübben, W., Slomka, H., Gebler, J., Konert, M., Cai, C., Neubrandt, L., Prazeres da Costa, O., Paul, S., Dehnert, S., Döhne, K., Thanisch, M., Storsberg, S., Wiegand, L., Kaufmann, A., Nain, M., Quintanilla-Martinez, L., Bettio, S., Schnierle, B., ... Bauer, S. (2012). Nucleic Acid-Sensing Toll-like Receptors Are Essential for the Control of Endogenous Retrovirus Viremia and ERV-Induced Tumors. *Immunity*, 37(5), 867–879. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.07.018>
- Zhao, J., Rycaj, K., Geng, S., Li, M., Plummer, J. B., Yin, B., Liu, H., Xu, X., Zhang, Y.,

Yan, Y., Glynn, S. A., Dorsey, T. H., Ambs, S., Johanning, G. L., Gu, L., & Wang-Johanning, F. (2011). Expression of Human Endogenous Retrovirus Type K Envelope Protein is a Novel Candidate Prognostic Marker for Human Breast Cancer. *Genes and Cancer*. <https://doi.org/10.1177/1947601911431841>

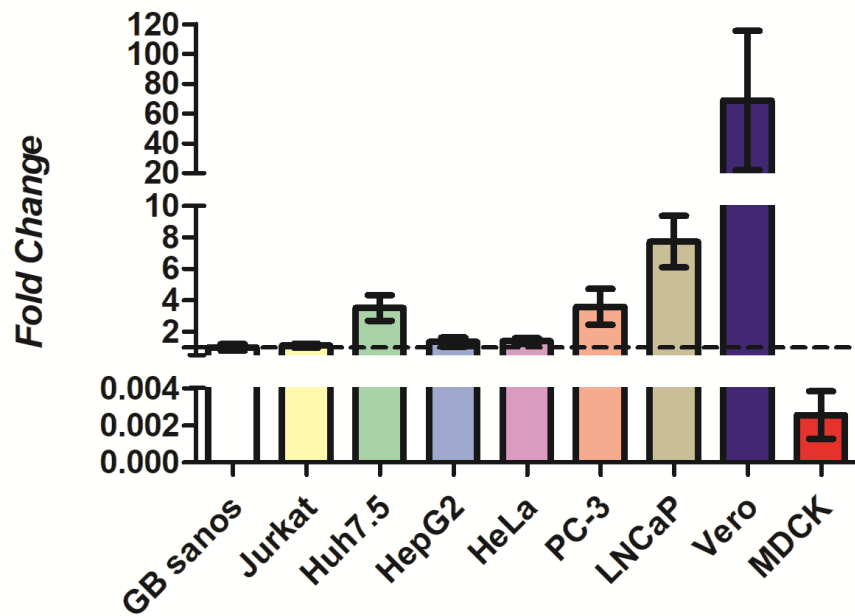
Zhou, F., Li, M., Wei, Y., Lin, K., Lu, Y., Shen, J., Johanning, G. L., & Wang-Johanning, F. (2016). Activation of HERV-K Env protein is essential for tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11455>

## 8) Apéndices

### 8.1) Apéndice 1 - Análisis de expresión relativa en líneas celulares no humanas

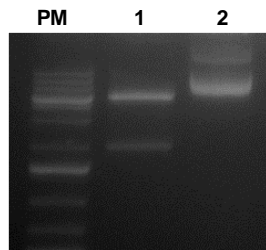
Si bien se realizó el procesamiento de las muestras en simultáneo al resto de las líneas celulares, no es correcto comparar los resultados obtenidos de la PCR a tiempo real de las líneas MDCK y Vero conjuntamente con las líneas humanas debido a que provienen de otros organismos en los cuales no hay HERV-K (HML-2) integrados. Por tal motivo, es probable que la amplificación del gen constitutivo empleado como normalizador de la expresión ( *$\beta$ -actina*) tenga una eficiencia menor ya que los *primers* son para amplificar la variante humana de este gen. Por otro lado, si bien muchos organismos presentan ERVs en sus genomas, es esperable que las secuencias de sus genes difieran de las de HERVs, y que por tanto ocurra amplificación con menor eficiencia o bien ninguna. Por estos motivos, sin realizar un análisis de eficiencia de amplificación de  *$\beta$ -actina* y genes derivados de *env* con los *primers* utilizados en esta tesina, los resultados de la cuantificación relativa pueden estar sobreestimando o infravalorando la expresión de estos genes.

A pesar de esto se realizó el análisis con los datos obtenidos de la PCR a tiempo real (Figura Suplementaria 1). Si bien la cuantificación es incorrecta, se aprecia que en Vero (línea de primates) parecería haber expresión de genes provenientes de retrovirus endógenos, mientras que en MDCK (línea de caninos) no hay expresión de éstos, lo que coincide con que los HERV-K infectaron nuestra línea germinal en procesos relativamente recientes de la evolución.



**Figura Suplementaria 1. Expresión relativa de los genes de retrovirus endógenos de las líneas celulares humanas comparados a la línea Vero y MDCK.** Se utiliza el *fold change* de los glóbulos blancos de donantes sanos como calibrador. Se puede apreciar que hay expresión de retrovirus endógenos en la línea Vero pero no en la línea MDCK.

## 8.2) Apéndice 2 - Control de digestión: Digestión del vector DL-HCV-1b-F



**Figura Suplementaria 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la puesta a punto de la digestión con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*.** Carril 1: vector DL-HCV-1b-F digerido por las dos enzimas de restricción. Carril 2: vector DL-HCV-1b-F sin digerir como control. PM: Peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen, Vilna, Lituania).

## 9) Anexos

### 9.1) Anexo 1 – Pasaje de líneas celulares

Las cantidades de volumen utilizadas de medio de cultivo, lavado de la monocapa y la tripsinización son las descritas en la Tabla Anexo 1. Los pasos a seguir para realizar pasajes, cuando la confluencia celular alcanzó entre 80-90% fueron los siguientes, independientemente del tamaño del frasco de cultivo utilizado:

- 1) Se descartó el medio completo.
- 2) Se lavó la monocapa con Phosphate Buffered Saline 1x (PBS) (Gibco, Grand Island, New York, USA) y se descartó.
- 3) Se agregó tripsina (Gibco, Grand Island, New York, USA) 0,05% y se dejó actuar por 3-5 min, dependiendo de la confluencia, a temperatura ambiente.
- 4) Se neutralizó la tripsina con la misma cantidad de medio de cultivo completo con suero fetal bovino al 5%.
- 5) Se realizó la división de la suspensión de células y se agregó la cantidad necesaria de medio de cultivo para la siembra en el nuevo frasco.

**Tabla Anexo 1. Cantidades de reactivos utilizados para cada etapa del pasaje de líneas celulares.**

	Área superficial (cm <sup>2</sup> )	Volumen de medio de cultivo (mL)	Volumen de PBS para lavado (mL)	Volumen de tripsina (mL)
<b>Frasco T175</b>	175	30	25-20	5
<b>Frasco T75</b>	75	10	10	1
<b>Frasco T25</b>	25	5	5	0,5

## **9.2) Anexo 2 – Congelamiento de líneas celulares para stock**

El congelado de células para stock se realizó siempre a partir de un frasco T175.

- 1) Se retiró el medio del frasco.
- 2) Se lavó la monocapa con 20 mL de PBS 1X y se retiró del frasco.
- 3) Se agregó 5 mL de tripsina (Gibco, Grand Island, New York, USA) 0.05% y se dejó actuar entre 3-5 min.
- 4) Se neutralizó la tripsina con 5 mL de medio completo con suero fetal bovino al 5%.
- 5) En un tubo Falcon de 50 mL se filtraron los 10 mL de suspensión de células con un filtro de 40 $\mu$ M (Corning).
- 6) Posteriormente se colocaron las células en un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugaron a 1250 rpm por 5 min en una centrífuga Hermle Z200 A.
- 7) Se retiró el sobrenadante, dejando 200  $\mu$ L de medio para resuspender bien el pellet celular.
- 8) Se agregó 800  $\mu$ L de medio de congelamiento que consistió en 700  $\mu$ L de suero fetal bovino inactivado y 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO). De este modo, las células quedaron congeladas en 20% de medio, 70% de suero fetal bovino y 10% de DMSO.

### **9.3) Anexo 3 – Conteo de células en cámara de Neubauer**

El conteo de células se realiza como paso previo al congelamiento de un stock de células. El fin de realizar este protocolo es tener una idea aproximada de la cantidad de células que se van a congelar.

- 1) Se alicuotan 200  $\mu$ L de la suspensión celular obtenida en el paso 5 del Anexo 2.
- 2) Se mezclan 10  $\mu$ L de esa suspensión con 10  $\mu$ L de azul tripán y se coloca la mezcla en una cámara de Neubauer.
- 3) Se coloca la cámara de Neubauer en el microscopio con un aumento x25 y se cuentan las células vivas (células blancas que no fueron teñidas por el azul tripán) de los cuadrantes que se ubican en las esquinas. Se cuentan las células individuales, los cúmulos de varias células se cuentan como una.
- 4) Contados los 4 cuadrantes, se realiza el promedio de los cuadrantes y se multiplica por el factor de dilución (en este caso es 2 debido a que se diluyó la suspensión celular original en una cantidad igual de azul tripán) y luego se multiplica por 10000, de esta manera se obtiene la cantidad de células por mL. Para saber la cantidad total de células se multiplica por 10 dado que la suspensión original tenía 10 mL.



## **9.4) Anexo 4 – Extracción de ARN con TRIzol**

### **PREPARACION DE LA MUESTRA**

- 1) A las células resuspendidas en 100µl de PBS 1X se les agregó 1 mL de TRIzol LS reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- 2) Se les agregó 0,2 mL de cloroformo por cada 1 mL de TRIzol. Se agitaron bien por inversión y vortex y luego se incubaron por 2-3 min a temperatura ambiente.
- 3) Se centrifugaron las muestras por 15 min a 12000 g a 4°C. Como producto de la centrifugación se obtuvieron tres fases, una fase inferior orgánica roja que contiene fenol y cloroformo, una interfase y una fase superior acuosa transparente.

NOTA: la fase acuosa contiene el ARN, la fase orgánica las proteínas y lípidos, mientras que en la interfase se encuentra el ADN.

Se retiró la fase acuosa que contiene el ARN y se colocó en un nuevo tubo.

### **PRECIPITACIÓN DEL ARN**

- 1) Se agregó 0,5 mL de isopropanol por cada 1 mL de TRIzol utilizado para la lisis, se mezcló bien y se incubó por 10 min a -20°C.
- 2) Posteriormente se centrifugaron las muestras por 10 min a 12000 g y a 4°C. Terminado el centrifugado, el ARN se visualizó en el fondo de los tubos como un precipitado parecido a un gel y se descartó el sobrenadante por volcado.

NOTA: Como se mencionó en la sección 3.6 (pág 15), en este paso se agregó GlycoBlue al isopropanol para visualizar el pellet de color azul.

### **LAVADO DEL ARN**

- 1) Los pellets se resuspendieron en 1 mL de etanol al 75% y se vortexearon brevemente.
- 2) Luego se centrifugaron a 7500 g por 5 min a 4°C.
- 3) Se descartaron los sobrenadantes por volcado y el remanente extra por pipeteo y se dejaron secar los pellets en el termobloque a 40°C.

### **SOLUBILIZACIÓN DEL ARN**

- 1) Se resuspendieron los pellets por pipeteo en 20-50 µL de agua libre de ARNasa.

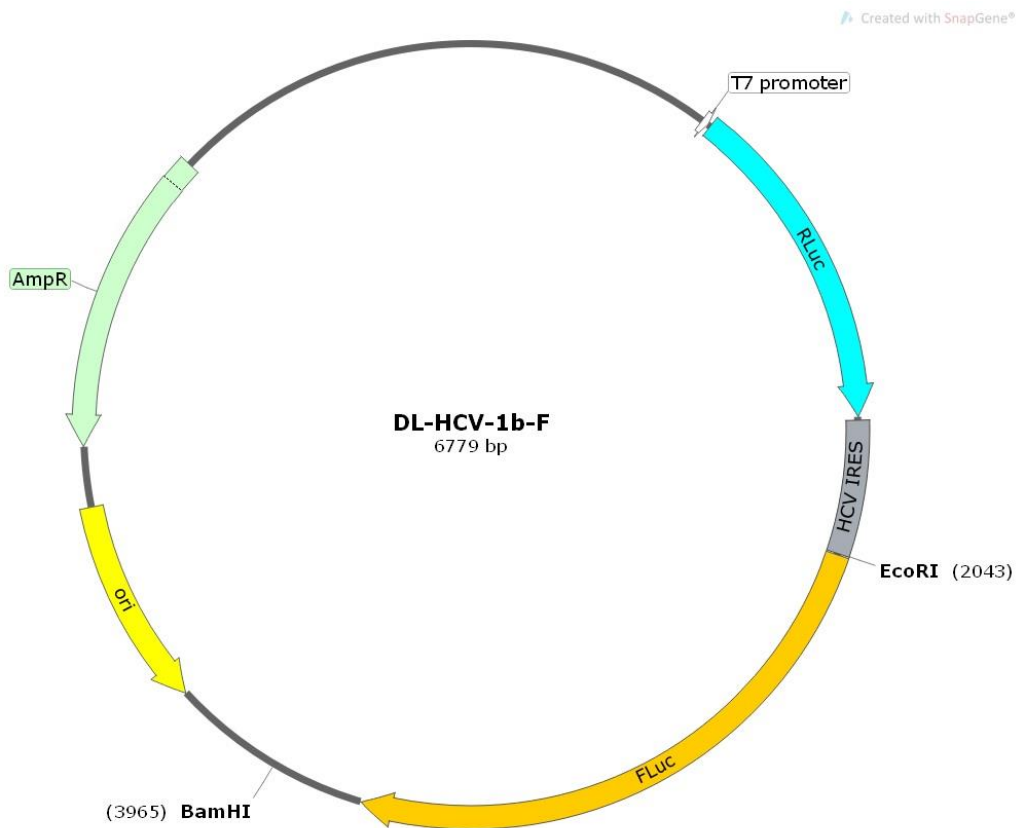
- 2) Se incubaron a 55-60°C por 10-15 min para que el ARN solubilizara completamente.

#### DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LA EXTRACCIÓN

- 1) A partir de 2 µL del ARN extraído se midió la absorbancia a 260 nm (A260) y a 280 nm (A280) en un espectrofotómetro BioSpectrometer basic (Eppendorf).
- 2) La relación entre A260/A280 determina la pureza en la extracción, y si es mayor a 2, significa que el ácido nucleico extraído se encuentra puro. La relación a 260nm/230nm nos indica la pureza de la muestra respecto a la cantidad de fenoles, carbohidratos o EDTA y si es mayor a 1.8, significa que el ácido nucleico extraído no se encuentra contaminado con sustancias que absorben a 230nm.
- 3) Para calcular la concentración de ARN se multiplicó la absorbancia de la muestra a 260 nm por la dilución realizada, por el factor 40. (A260\*dilución\*40 = µg ARN/mL).

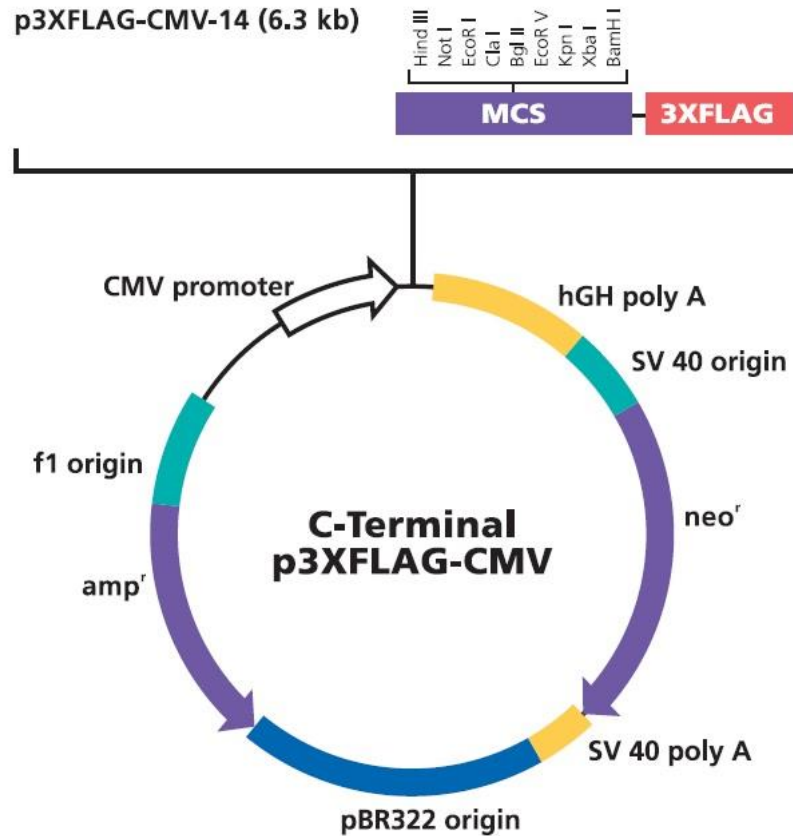
NOTA: El espectrofotómetro utilizado realiza automáticamente los cálculos de relación A260/A280, relación A260/A230 y de concentración.

## 9.5) Anexo 5 – Vector de expresión DL-HCV-1b-F



**Figura Suplementaria 3: VECTOR DE EXPRESIÓN DL-HCV-1b-F.** El vector DL-HCV-1b-F fue utilizado como control de las digestiones realizadas con *EcoRI* y *BamHI*. Es un vector de 6779 pb y en esta imagen generada en SnapGene se pueden apreciar los sitios de corte de ambas enzimas.

## 9.6) Anexo 6 – Vector de expresión eucariota p3x-FLAG-CMV-14



**Figura Suplementaria 4: VECTOR DE EXPRESIÓN EUCARIOTA p3x-FLAG-CMV-14.** Se empleó el vector p3x-FLAG-CMV-14 para clonar el gen *np9*. Este vector tiene un tamaño de 6.3kb y la expresión del gen de interés está promovida por el promotor de citomegalovirus, un fuerte promotor de expresión en eucariotas. Además tiene dos genes de selección, uno de ellos es el gen de resistencia a ampicilina lo que es de utilidad para la amplificación del vector en bacterias. El otro gen es de resistencia a neomicina y permite seleccionar las células eucariotas que fueron transfectadas con el vector exitosamente. Modificado de <https://www.sigmaldrich.com/>