



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis de los efectos de la expresión de E5 de VPH-16
sobre las vías de señalización involucradas en los procesos
de auto-renovación y diferenciación de queratinocitos
inmortalizados HaCaT**

TESIS

Que presenta

VICTOR MANUEL JONATHAN CARDOSO JAIME

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR**

Director de tesis

Dr. JOSÉ EFRAÍN GARRIDO GUERRERO

México D.F.

SEPTIEMBRE, 2015

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de investigación en Biología Molecular y Celular del Cáncer (Lab. No. 1) del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. José Efraín Garrido Guerrero y con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), mediante los fondo del proyecto 105174.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Efraín Garrido Guerrero, por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, del cual quería formar parte y fue motivo de haber llegado al CINVESTAV. Sin duda alguna fue una gran oportunidad, el haber ingresado a su laboratorio, y agradezco su confianza, tiempo, consejos, su orientación y apoyo, que contribuyeron no solo en el desarrollo profesional si no también en lo personal.

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega y al Dr. Humberto Lanz Mendoza, por su tiempo, dedicación y consejos, en el desarrollo de este trabajo.

A Dr. Salvador Hernández Martínez, por su apoyo, el cual sin duda alguna fue el motor de arranque en esta etapa de desarrollo profesional y personal.

A la M.C. Alicia Reveles Espinoza, Alice como le decimos de cariño, quiero darle un agradecimiento especial, por todo el apoyo brindado, su paciencia, por compartir todo su conocimiento con migo, por su amistad, por ser una gran maestra. Gracias.

Al Biólogo Pedro Chávez Olmos, o señor P., quien siempre tuvo el tiempo y la disponibilidad de apoyarme y vigilarme, para que no hacer ninguna barbaridad.

A mis compañero y amigo de laboratorio, Raúl quien su compañía y amistad a lo largo de estos dos años es invaluable; Diana a quien conocía poco hasta antes de entrar al laboratorio, pero que sin duda alguna es una gran persona y amiga; Roció por su amistad y tiempo para escucharme; Janet cuyas pláticas eran muy agradables; Beto por su apoyo en las estrategias de citometría de flujo y PCR, por su apoyo moral en los experimentos fallidos, y su amistad; Katy, quien fue una compañera en las tardes-noches de trabajo, y cuya estancia en él fue muy especial; Dany que juntos aprendimos cosas de Alice; a Nancy y Gloria por las pláticas de las tardes; Bianca quien siempre tuvo material limpio para que trabajara y con quien siempre había algo que platicar; Glustein y Vicky que aunque sus visitas al lab fueron esporádicas siempre pasamos ratos agradables.

A mis compañeros de generación, especialmente a Nely, Ana, Enue, Thelma, Alejandra, Saida y Nelby. Conocerlos y pasar con ustedes tardes enteras estudiando o conviviendo ha sido una muy buena experiencia.

A mis amigos de hace tiempo, Miguel y Yarazet, mis grandes amigos que siempre han compartido con migo momentos difíciles y de alegría. A Víctor, quien fue la persona que me entusiasmó aún más para venir al CINVESTAV, y con quien compartí muchas charlas a lo largo de la carrera. A Jessika por siempre ser un apoyo muy importante ante cualquier circunstancia; Yuliana por ser siempre un soporte, consejera y compañera ante cualquier adversidad; y por ultimo pero no menos importante a Ari, Yanelly, Lupe, Mariel.

Al QFB. Víctor Rosales y a la Unidad de Citometría de Flujos, por dejarme hacer uso de los equipos con los que cuenta la unidad. Así como las asesorías de Víctor, para la estandarización de metodologías necesarias para la realización de este trabajo.

A Gaby Mora, quien siempre fue atenta y agilizó todos los trámites requeridos para mi estancia en la institución.

DEDICATORIA

Durante toda mi vida, en cualquier meta que me proponga siempre he contado con estas personas, sin ellas nada de esto sería posible.

A mi madre Virginia, por siempre darme lo mejor, por su amor y por apoyarme incondicionalmente. Has sido, eres y serás, mi ejemplo de vida y mi fortaleza. Gracias por todo, esto es uno de los logros más que debo agradecerte, ya que sin ti nada hubiese realizado.

A mi padre Víctor, por el gran apoyo que me ha dado, por sus consejos, por su cariño, paciencia, y por siempre enseñarme algo nuevo y bueno sobre la vida. Gracias, siempre has sido mi ejemplo y mi guía. Tener a padres como tú y mi mama es la dicha más grande que puede tener.

A mis hermanos: Vidal y Venus, mis compañeros de siempre, mis cómplices y mis mejores amigos, que siempre han estado con migo para animarme, hacerme reír. Siempre han sido la alegría de mis días, gracias.

A mi tía Emma, por siempre apoyarme en cada uno de los proyectos de mi vida, siempre entusiasmándome, siempre cuidando de mí. Has sido parte importante de cada uno de mis logros, gracias. **A mi prima luz**, por enseñarme a ser siempre fuerte y dar la mejor cara ante la adversidad. Y también por todos los momentos de alegrías. **A mi tío Oswaldo**, quien siempre me ha ayudado.

A mis Abuelos: Claudia y Pulciano, porque siempre fueron como unos padres. Por ser las mejores personas que he conocido, y por enseñarme el valor de la humildad, el trabajo, la familia, el amor incondicional, la solidaridad. Siempre estarán en mi corazón y siempre los llevare con migo en cada momento de mi vida.

Al amor de mi vida Krystal, por estar con migo en todos los momentos importantes y difíciles, por cuidar de mí, por entenderme, por tu amor, por el apoyo incondicional que siempre me has dado. Conocerme ha sido un suceso que cambio mi vida. Gracias por todo.

A mi familia. Mis tíos: María, Juan, Enriqueta, Bertín; Mis primos: Claudia, Daniel, Carmina, Juan, Flora, Socorro, Minerva. Gracias siempre por estar al pendiente de mí y apoyarme. Juntos hemos pasado muchas alegrías, y siempre estamos unidos ante cualquier situación difícil.

RESUMEN

La infección por VPH requiere del ingreso de la partícula vírica a la capa basal del epitelio escamoso estratificado, en la cual se encuentran 3 poblaciones celulares susceptibles a la infección, que con base a su estadio de diferenciación se conocen como: células troncales, células transitoriamente amplificadas y células diferenciadas tempranas. Una vez que la partícula viral ha infectado una célula, comienza a expresar sus genes tempranos. La proteína de expresión temprana E5 de los papilomavirus de alto riesgo (VPH tipo 16, por ejemplo) afecta procesos fisiológicos y celulares como angiogénesis, evasión de la respuesta inmune, proliferación, diferenciación y apoptosis. Uno de los mecanismos de acción de esta proteína involucra su capacidad de promover el reciclamiento del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), el cual “río abajo” activa múltiples vías de señalización involucradas en proliferación, resistencia a la apoptosis, motilidad y diferenciación. Datos de nuestro grupo de investigación demuestran que la expresión del gen E5 de VPH-16 en la línea celular de queratinocitos inmortalizados no transformados HaCaT, induce un incremento en una subpoblación celular con características de troncalidad e inmunofenotipo $\alpha 6$ -Integrina^{brillante} CD71^{disminuido} ($\alpha 6$ -I^{bri} CD71^{dim}) Aunado a lo anterior, se ha descrito que la proteína E5 potencia la vía de señalización del EGFR que es medular en el mantenimiento de células troncales de queratinocitos. Lo anterior nos llevó a sugerir que posiblemente E5 incrementa la subpoblación $\alpha 6$ -I^{bri} CD71^{dim} mediante la activación de esta vía. Para demostrar lo anterior se realizaron ensayos que evidencian que la proteína E5 incrementa la población $\alpha 6$ -I^{bri} CD71^{dim} mediante la vía de señalización del EGFR de manera dependiente de su ligando. Los resultados obtenidos nos permitieron generar un modelo que propone un mecanismo molecular en el cual la activación del EGFR induce cascadas de señalización “río abajo”, las cuales incrementan su activación en presencia de E5 VPH-16. Es posible que una de estas vías sea la de PI3K/Akt, que induce auto-renovación e impide la diferenciación temprana de queratinocitos. Esta vía además inhibe la vía de las MAPKs, la cual demostramos se encuentra atenuada, y su activación es importante en el inicio de la diferenciación temprana de queratinocitos.

SUMMARY

Human Papillomavirus (HPV) infection requires the entry of the viral particle to the basal layer in the stratified squamous epithelium. This layer is composed by three cell populations susceptible to infection, that based on their differentiation stage are known as: stem cells, transit amplifying cells and early differentiated cells. Once the viral particle has infected a cell, begins to express its early genes. In the high risk human papillomaviruses (e.g. HPV-16) the E5 protein affects several physiological and cellular processes, such as angiogenesis, immune response evasion, proliferation, differentiation and apoptosis. One of the action mechanisms of this protein involves its capacity to promote the recycling of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), which “downstream” activates multiple signaling pathways involved with proliferation, apoptosis resistance, motility and differentiation. Data from our research group showed that HPV-16 E5 gene expression in the immortalized keratinocytes cell line HaCaT induces an increase in the cell subpopulation with stem cells characteristics, identified by its $\alpha 6$ -Integrin^{bright}CD71^{diminished} ($\alpha 6$ -I^{bri}CD71^{dim}) immunophenotype. In addition, it has been described that E5 protein enhances the EGFR signaling pathway, which is central in maintaining of keratinocytes stem cells. This lead us to suggest that possibly E5 increases the $\alpha 6$ -I^{bri}CD71^{dim} subpopulation by activating this pathway. To demonstrate this hypothesis, we performed several assays showing that E5 protein increases the $\alpha 6$ -I^{bri}CD71^{dim} subpopulation through the EGFR signaling pathway in a ligand-depend manner. With the results obtained in this work we generated a model proposing a molecular mechanism in which the activation of EGFR triggers “downstream” signaling pathways and its activation is increased in the presence of HPV-16 E5. One of these pathways is possibly PI3K/Akt, which has been demonstrated induces self-renewal and prevents early differentiation of keratinocytes. This pathway also inhibits MAPKs pathway, whose activation is important in the onset of early differentiation of keratinocytes, and we demonstrated is attenuated in the presence of E5.

Índice

1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 El Virus de Papiloma Humano.....	1
1.2 Organización Genómica del VPH	2
1.3 Infección del epitelio por el VPH.....	3
1.4 Células de la capa basal del epitelio escamoso estratificado	3
1.5 Proteínas de VPH tipo 16 expresadas en células de la capa basal.....	8
1.6 La proteína E5	10
1.6.1 La proteína E5 de VPH tipo 16	12
1.7 Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico	15
1.7.1 Vías de señalización del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico	17
1.7.2 Internalización del EGFR	19
2 ANTECEDENTES	22
3 JUSTIFICACIÓN	25
4 HIPÓTESIS.....	25
5 OBJETIVO GENERAL.....	26
6 OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
7 Estrategia Experimental	27
8 MATERIALES Y MÉTODOS	28
8.1 Cultivo celular y tratamientos.....	28
8.2 Transducción celular y titulación de lentivirus.	29
8.3 Extracción de RNA de células HaCaT.....	32
8.4 Reacción de RT PCR.....	33
8.5 PCR punto final.....	33
8.5.1 Oligonucleótidos.	34
8.6 SDS-PAGE y Western Blot.	34
8.6.1 Lisis de células HaCaT, extracción de proteína total.....	34
8.6.2 Cuantificación de proteínas.	35
8.6.3 SDS-PAGE.	35
8.6.4 Electrotransferencia.....	36
8.6.5 Bloqueo de la membrana.....	36

8.6.6 Adición de anticuerpos	36
8.6.7 Detección.	37
8.6.8 Anticuerpos para Western Blot.....	38
8.7 Citometría de Flujo.....	38
9 RESULTADOS	40
9.1 Transducción celular.	40
9.2 Evaluación del efecto del EGF sobre la abundancia relativa de las subpoblaciones de células HaCaT E5 VPH-16.	41
9.3 Evaluación del estado de activación de la vía del EGFR.....	44
10 DISCUSIÓN	49
11 CONCLUSIONES.....	57
12 PERSPECTIVAS	58
13 APÉNDICE	59
14 BIBLIOGRAFÍA.....	61

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El Virus de Papiloma Humano

Los papilomavirus pertenecen a la familia *Papillomaviridae* de la cual se han descrito más de 170 tipos que se han organizados en 5 géneros: α , β , γ , μ , η ; pueden ser cutáneos o mucocutáneos según el tipo de tejido que infectan (1). Alrededor de 100 tipos de papilomavirus infectan humanos y 40 de estos infectan el tracto genital (2). Los Virus de Papiloma Humano (VPH) de tipo mucocutáneo son los que infectan principalmente el tracto genital, y pueden ser de bajo riesgo o de alto riesgo; los primeros desarrollan lesiones benignas, por ejemplo las verrugas, los de alto riesgo desarrollan lesiones que pueden progresar a cáncer (3). El cáncer de cuello uterino es el segundo tipo de cáncer más común en mujeres. Aproximadamente 270 000 mujeres mueren cada año por causa de cáncer de cérvix (4), el 85% de estas muertes ocurren en países de bajo y medio desarrollo (4,5). Más del 99% de los casos de cáncer de cérvix se asocian con VPH. Los VPH tipo 16, 18, 58, 33, 45, 31, 52, 35, 59, 39, 51 y 56 están asociados con el mayor número de casos de cáncer de cérvix. El VPH tipo 16 (VPH-16) es el más común en el desarrollo de carcinomas invasivos y está presente en el 50% de los carcinomas (3).

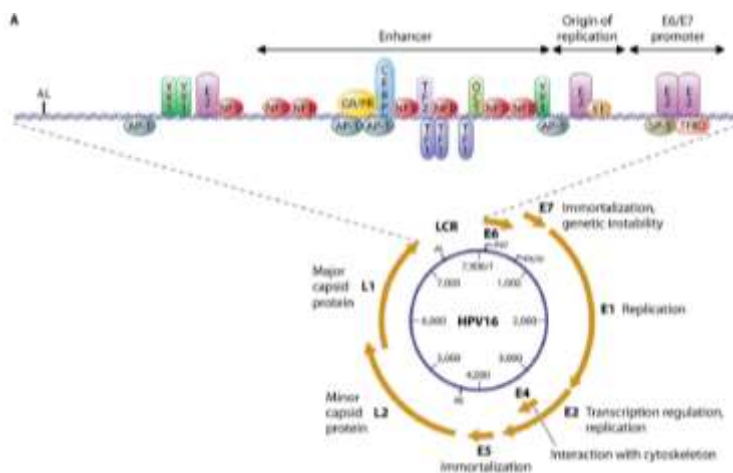
Una vacuna se desarrolló recientemente y es suministrada en niñas y adolescentes de entre 9 y 13 años de edad previniendo eficientemente el desarrollo de lesiones cancerosas asociadas al VPH; sin embargo en pacientes mayores de 30 años es necesaria una revisión ginecológica para monitorear una posible infección activa por VPH de alto riesgo, y en pacientes que tienen cáncer invasivo es necesario un tratamiento médico adecuado (2,4). Sin embargo se requiere estudiar los mecanismos y factores de riesgo necesarios para el desarrollo de cáncer promovido por VPH, ya que el desarrollo de cáncer requiere de muchas variables que son dependientes del VPH, por ejemplo la carga viral y los mecanismos moleculares por los cuales el virus controla la respuesta inmune y la maquinaria celular (2).

1.2 Organización Genómica del VPH

Los Virus de Papiloma Humano cuentan con un genoma de DNA circular de doble cadena con aproximadamente 8000 pb que se asocia con histonas y forma una estructura similar a un cromosoma eucarionte. Está contenido dentro de una cápside compuesta por las proteínas L1 y L2 (6,7), con aproximadamente 72 capsómeros que mide alrededor de 55nm de diámetro (6,8).

El genoma de VPH contiene de 7 a 9 marcos de lectura abierta (ORF por sus siglas en inglés) dependiendo del genotipo. El genoma de los papilomavirus comparte la misma organización en la cual solo una cadena es codificante (7). El genoma codifica dos tipos de proteínas las tempranas o Early (E por su sigla en inglés) y las tardías o Late (L por sus siglas en inglés). Codifica dos proteínas tardías L1 y L2 las cuales se encargan de formar la cápside. Las proteínas de expresión tempranas son: E1, E2, E4, E5, E6 y E7 las cuales cumplen funciones necesarias para la replicación y la regulación del genoma viral (6). El virus además de las secuencias codificantes, cuenta con una región no codificante que regula la expresión de las proteínas y es llamada Región Larga de Control (LCR por sus siglas en inglés); esta región cuenta con secuencias de unión a múltiples factores de transcripción como: AP1, cEBP NF1, YY1, Oct1, TEF1 (TF1), TFIID, Sp1, receptor a glucocorticoides y receptor de progesterona (GR/PR) (Figura 1) (7).

Figura 1. Organización Genómica del VPH tipo 16. En la figura se muestra la función y ubicación de las proteínas E y L, así como también las secuencias de unión a factores de transcripción en la LCR. Tomado de (7).



1.3 Infección del epitelio por el VPH

El ciclo de replicación del VPH es dependiente de la diferenciación del epitelio escamoso estratificado, ya que en las distintas etapas de diferenciación celular se expresan factores necesarios para la generación de partículas virales (9,10). Se ha sugerido que la infección comienza en las células de la capa basal, las cuales constantemente se dividen y cuentan con la maquinaria necesaria para la amplificación del genoma viral (6). Por otro lado se ha descrito que el VPH únicamente puede infectar células en proliferación, dado que cuentan con los elementos necesarios para el transporte de la partícula viral de la superficie de la célula al núcleo (11). Sin embargo no todas las células de la capa basal se encuentran en proliferación constante, ya que existen células que ciclan lentamente las cuales se han descrito como “stem cells” ó células troncales epiteliales. Estas células se han propuesto como un posible reservorio del VPH por su capacidad de entrar en estado de quiescencia y como consecuencia mantener al virus en estado de latencia (9). Dicho estado de latencia, junto con la capacidad ilimitada de proliferación de las células troncales, han sugerido a estas células como los mejores candidatos causantes de las infecciones persistentes por virus de alto riesgo, y posteriormente de la acumulación de eventos de transformación (10). Aunque son pocas las evidencias de lo mencionado, son contundentes y en los últimos años, las células de la capa basal se han convertido en el foco de interés de muchas investigaciones.

1.4 Células de la capa basal del epitelio escamoso estratificado

El epitelio cervical es de tipo mucoso escamoso estratificado, se puede dividir en 4 capas: capa basal, escamosa, granular y estrato corneo, las tres últimas representan distintas etapas de diferenciación (Figura 2) (12); la capa basal por lo contrario, contiene células con un gran potencial de proliferación y cierto grado de indiferenciación (13), las cuales darán origen a células diferenciadas que formaran parte de las capas superiores del epitelio (12).

Las células de la capa basal son capaces de proliferar activamente, sin embargo no todas lo hacen de la misma manera. En 1974 Potten propuso un modelo en el cual

existen tres poblaciones celulares en la capa basal. A una de ellas le llamó unidades epidérmicas de proliferación (UEP), las cuales este autor sugirió como células troncales. Las UEP podían dar origen a otras células, las cuales proliferaban de manera rápida sin embargo no lo hacían por mucho tiempo, a estas células se les llamó transitoriamente amplificada (TA), que después de varias divisiones generaban células que migraban a la capa suprabasal, lo que indicaba un inicio de la diferenciación, por tal motivo se les llamo células comprometidas a diferenciación temprana (ED por sus siglas en inglés) (13). Este modelo se fortaleció cuando Barranton *et al.* demostraron que queratinocitos humanos en cultivo tienen la capacidad de formar colonias de origen clonal, las cuales fueron clasificadas de acuerdo a su capacidad de proliferación y densidad celular en: holoclonas (altamente proliferativas), meroclonas (proliferación limitada) y paraclonas (poco proliferativa). La caracterización de estas clonas permitió determinar que posiblemente correspondían a células troncales, células transitoriamente amplificadas y células comprometidas a diferenciación. Además se demostró que células de holoclonas pueden transitar a meroclonas y estas a paraclonas de manera unidireccional (14).

La diferenciación del epitelio escamoso estratificado es un proceso altamente regulado, y depende principalmente de la homeostasis de las subpoblaciones celulares de la capa basal (15). Uno de los mecanismos celulares sugeridos para la regulación de la diferenciación, es un modelo de estructuración jerárquica, en el cual el nivel más bajo o nivel ancestral corresponde a las células troncales. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse, sin embargo no lo hacen de manera espontánea. Tras varias divisiones la célula troncal comienza un proceso de compromiso a la diferenciación, en otras palabras gradualmente pierde su troncalidad. Cuando este paso ocurre la célula troncal da origen a una célula transitoriamente amplificada y ésta a su vez origina a una célula comprometida a diferenciación, y todo esto ocurre de manera gradual (Figura 2) (16).

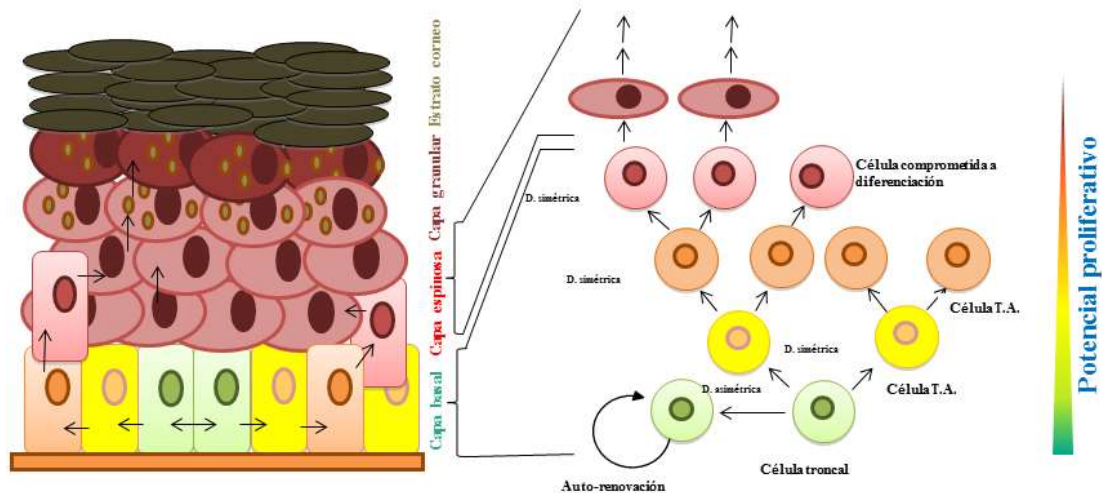


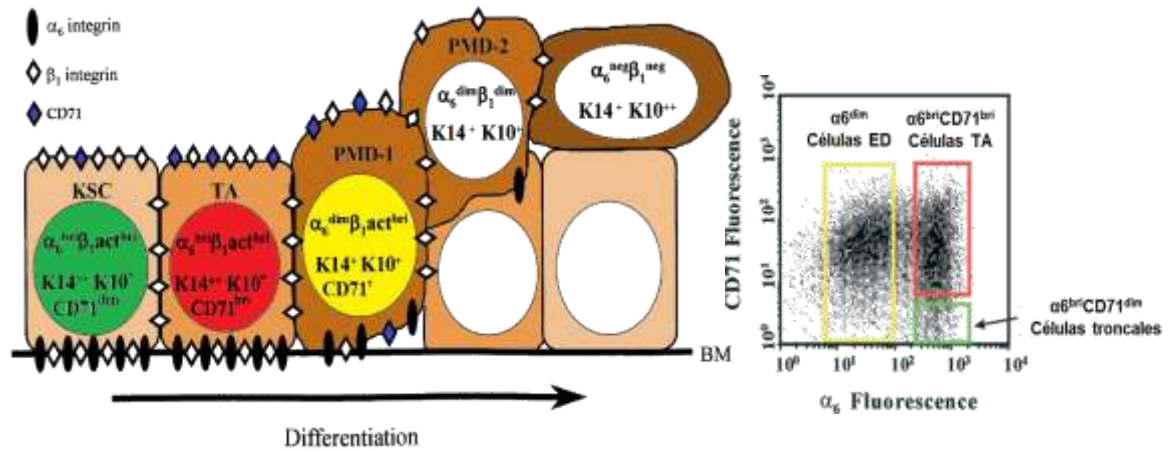
Figura 2. Modelo jerárquico de diferenciación epitelial. El epitelio escamoso estratificado se compone de 4 capas divididas según su estado de diferenciación. Las células de la capa basal son las encargadas de mantener la homeostasis. El mecanismo por el cual lo hacen es mediante divisiones simétricas y asimétricas, las cuales dan origen a progenie que se diferencia de manera gradual con cada nueva generación, por lo que se va generando un epitelio con células organizadas jerárquicamente, en donde el ancestro más antiguo es la célula troncal. Esta célula es la única capaz de auto-renovarse y es la única con potencial de proliferación ilimitado. Imagen modificada de Potten, 2002 (16).

Las células de la capa basal se diferencian de manera gradual (13,14,16,17). Sin embargo, si todas las células se diferenciaban, la homeostasis se perdería, y gradualmente terminaría en muerte celular. El mecanismo por el cual se mantiene la homeostasis y proliferación de las células de la capa basal, está mediado por las células troncales ya que son las únicas capaces de auto-renovarse o diferenciarse, es decir, de dar origen a otra célula madre con el mismo nivel jerárquico y potencial troncal o a una célula más especializada (18). Esto es posible debido a que una célula troncal es la única célula que puede dividirse de manera asimétrica, dando origen a una célula hija troncal y una diferenciada de esta manera expandiendo la subpoblación de células diferenciadas sin agotar la subpoblación troncal; la división simétrica también ocurre en células troncales, sin embargo puede ocurrir de dos maneras: dar origen a dos células troncales (auto-renovación), o dar origen a dos células hijas diferenciadas (17–19). Por otra parte, las células transitoriamente amplificadas y las comprometidas a diferenciación, únicamente pueden dividirse de

manera simétrica, dando origen a dos células hijas con un nivel de diferenciación mayor que la ancestral (Figura 2) (19).

Las células troncales juegan un papel fundamental en el mantenimiento y reparación de los tejidos, por lo que son un tema de estudio central debido a su potencial terapéutico en medicina regenerativa, cáncer, etc. (20,21). Las células troncales epidérmicas se han tratado de aislar usando características morfológicas, fisiológicas y mediante marcadores bioquímicos y moleculares, sin embargo en la actualidad no se han logrado aislar completamente (12,15). Algunos de los criterios morfológicos para identificar estas células es la relación de la proporción núcleo-citoplasma, ya que en un modelo murino se demostró que las células troncales presentan una proporción mayor del núcleo con respecto al citoplasma (22). Otro criterio, y uno de los más empleados, es la capacidad de formar holoclonas y de auto-renovarse (14). Por otro lado se ha demostrado que las células troncales son células en reposo (quiescentes) y bajo ciertos estímulos son capaces de dividirse (23–25). Algunas proteínas se han propuesto como marcadores de troncalidad en el epitelio escamoso estratificado. Por ejemplo el factor de transcripción p63 cuya expresión es alta en células con características de troncalidad, y su participación es fundamental en el mantenimiento del potencial proliferativo de las células de la capa basal, han sugerido a esta proteína como un marcador de células troncales epiteliales (26,27). Otro factor candidato es Bmi-1; es un gen de la familia polycomb y ha sido implicado en el mantenimiento de células troncales de algunos tejidos, en la regulación de la actividad de la telomerasa, y recientemente se ha sugerido que también puede ser un marcador de células troncales de queratinocitos (28). Por otro lado, aunque las citoqueratinas han servido para el estudio del proceso de diferenciación de queratinocitos, éstas se expresan diferencialmente únicamente cuando se trata de una capa diferente, es decir, en la capa basal se expresan la citoqueratina K5 y K14 sin distinción alguna, y en la capa espinosa comienzan a expresarse la citoqueratina K1 y K10 (12,29). No obstante recientemente se ha reportado a la citoqueratina K15 como un marcador para diferenciar células troncales de transitoriamente amplificadas (30). Sin embargo estos marcadores no parecen ser los adecuados para aislar una población troncal pura y estudiarla posteriormente.

Recientemente se han desarrollado metodologías para el aislamiento y estudio de células troncales de diferentes tejidos, mediante el uso de proteínas de superficie, las cuales sirven como marcadores. Las moléculas de adhesión han sido utilizadas como marcadores para separar las subpoblaciones de células de la capa basal. Las integrinas son un ejemplo claro de moléculas de adhesión utilizadas para separar las subpoblaciones de la capa basal. La proteína integrina $\beta 1$, se reportó que puede expresarse de manera abundante (“brillante”) en las células troncales, disminuida en células transitoriamente amplificadas y casi de manera ausente en células comprometidas a diferenciación, por lo que se ha usado como un marcador para células troncales (31). La Desmogleina 3 (Dsg3) es una proteína, expresada de manera abundante en las uniones extracelulares. Se ha demostrado que células que expresan bajos niveles de Dsg3 (Dsg3^{dim}) presentan características de troncalidad, además Dsg3 combinado con el marcador integrina $\beta 1$ permite identificar de manera más eficiente las células troncales con el fenotipo Dsg3^{dim} $\beta 1$ ^{bri} (32,33). Sin embargo la combinación de marcadores preferida en la actualidad, es la proteína de adhesión a la membrana basal integrina $\alpha 6$ (I- $\alpha 6$) y el receptor de la transferrina CD71. La primera se expresa de manera exclusiva en células de la capa basal, y se comienza a perder su expresión cuando las células comienzan a diferenciarse (células comprometidas a diferenciación). Por otro lado CD71 es un marcador de proliferación. El uso de ambos marcadores tiene como resultado la separación de las tres subpoblaciones celulares de la capa basal. Esto se debe a que las células troncales expresan de manera brillante I- $\alpha 6$ y CD71 de manera “disminuida”, puesto que se encuentran fuertemente adheridas a la capa basal, y ciclan de manera esporádica; las células transitoriamente amplificadas, expresan de manera abundante I- $\alpha 6$, pero debido a que estas células proliferan rápidamente expresan de manera brillante a CD71; por último las células comprometidas a diferenciación comienzan a perder adhesión a la membrana basal, y pueden ciclar rápido o lento, por lo que expresan I- $\alpha 6$ disminuida y CD71 brillante o disminuido (Figura 3) (22,34,35). Estos marcadores han tomado popularidad debido a su alta eficiencia para separar las subpoblaciones de la capa basal (36), y son actualmente una herramienta invaluable para estudiar las células troncales.



Recuadro	Población celular
Verde	$\alpha 6^{bri} CD 71^{dim}$ /Células troncales/Quiescentes
Rojo	$\alpha 6^{bri} CD 71^{bri}$ /TA/Ciclando
Amarillo	$\alpha 6^{dim}$ /ED/Diferenciadas

Figura 3. Subpoblaciones celulares de la capa basal. Identificación de las células troncales, TA y ED usando los marcadores $\alpha 6$ integrina y CD71. Modificado de (35,36).

1.5 Proteínas de VPH tipo 16 expresadas en células de la capa basal

Se ha sugerido que el papilomavirus puede acceder a las células de la capa basal mediante la zona de transformación o por lesiones cervicales en donde se exponen dichas células (37,38). En la matriz extracelular de estas células existen moléculas como los heparan sulfato proteoglicanos (HSPGs) los cuales se ha demostrado interactúan con la proteína L1. Además los HSPGs son capaces de interactuar con diferentes moléculas necesarias para la internalización del virus a la célula huésped (7,10,39). El complejo protéico $\alpha 6/\beta 4$ Integrina se expresa de manera abundante en células de la capa basal, y se ha sugerido que puede ser un receptor secundario para la internalización del virus (39,40). Por otro lado se presume que estos complejos de unión permiten la internalización del virus por la vía de clatrin, caveolinas, balsas lipídicas etc. (39).

Las proteínas E1 y E2 son esenciales para la etapa de mantenimiento y replicación del genoma. La proteína E2 tiene la función de factor de transcripción (TF por sus siglas en inglés), ya que se ha observado, puede regular la transcripción de los genes virales

por medio de varias secuencias de unión localizadas en la LCR. De la misma manera E2 regula la replicación del genoma ya que en la LCR existe una secuencia de origen de replicación la cual contiene unas secuencias adyacentes de unión para E1 y E2, y se ha descrito que E2 puede reclutar a E1 a su sitio de unión comenzando así la expansión del genoma (40) (Figura 1).

Las células inicialmente infectadas por el VPH son pertenecientes a la capa basal, por lo que tienden a diferenciarse y la célula en mayor grado de diferenciación tiende a bajar la expresión de los factores necesarios para la replicación viral. El VPH-16 puede abatir este problema mediante la expresión de la proteína viral E7 cuya función es inhibir a Retinoblastoma (Rb) provocando un incremento de los factores necesarios para la replicación viral. Aunque altos niveles de E7 inducen la expresión de p53 cuya actividad es normalmente inhibir el crecimiento y puede producir apoptosis, la proteína viral E6 inhibe a p53 y de esa manera el virus puede mantener bajo control las condiciones celulares propicias para la replicación viral (Figura 4). Por otra parte una expresión alta de la proteína E2 mantiene baja la expresión de E6 y E7 mediante la regulación de la región promotora de los genes tempranos (Figura 1), lo que hace posible la diferenciación de las células de la capa basal (41).

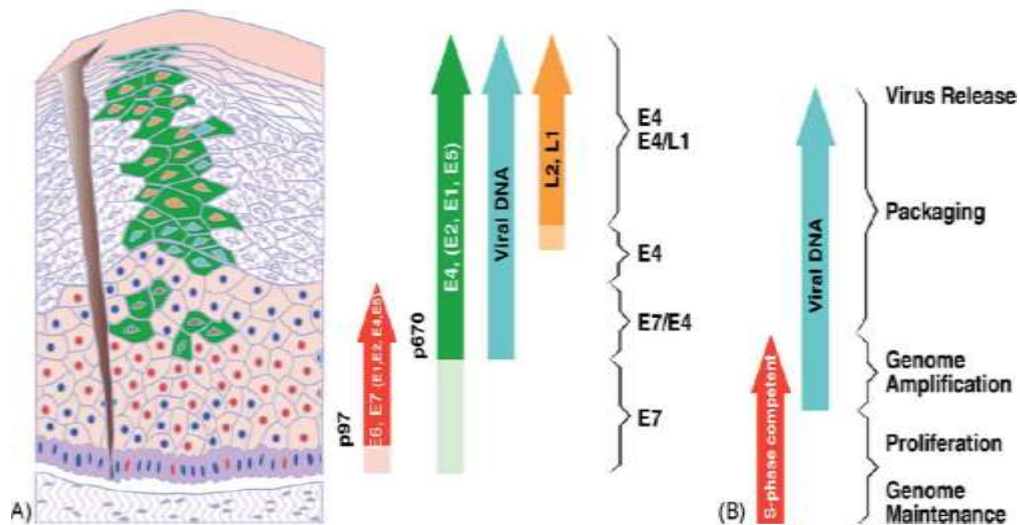


Figura 4. Ciclo viral de VPH 16. La expresión diferencial de proteínas virales en las capas del epitelio, cumple una función importante para el ciclo viral como muestra la figura B, la cual indica la función principal de las diferentes proteínas indicadas en la imagen A(37).

Los genes tempranos E1, E2, E4 y E5 son policistronicos y se expresan en la fase temprana de la infección, además se cree que lo hacen prioritariamente para la expansión y el mantenimiento de los episomas (37). Una proteína producto del gen E4 cuya función es poco conocida se acumula en la superficie de los queratinocitos, en donde se lleva a cabo la expresión y ensamblaje de las proteínas de la cápside L1 y L2. Además, se ha descrito que E4 interactúa con el citoesqueleto y la citoqueratina, por lo que se ha sugerido que la proteína E4 puede alterar la queratinización y generar un colapso celular y favoreciendo el ensamblaje del virus. También se ha visto que E4 secuestra al complejo Cilina1/CDK1 promoviendo la inhibición del ciclo celular en G2/M, sin embargo, las implicaciones de esta relación han sido poco estudiadas (42). Por último, se forman los viriones y son liberados nuevamente en la superficie del epitelio en donde puede empezar la infección nuevamente.

El VPH tipo 16 contiene 2 oncoproteínas principales: E6 cuya función principal es la de inhibir a P53 y de esta manera immortalizar a la célula, y la proteína E7 que promueve la progresión del ciclo celular por medio de la inhibición de Rb. E5 ha sido también considerada como una tercera oncoproteína viral y su función más conocida es la de potenciar las señales mitóticas por medio de la dimerización del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR por sus siglas en inglés) (42). Sin embargo, las funciones de E5 aún no son comprendidas por completo y es importante su estudio por las razones que se discutirán más adelante.

1.6 La proteína E5

Muchos, pero no todos los papilomavirus codifican proteínas E5. Las proteínas E5 de todos los papilomavirus que la poseen, tienen un tamaño pequeño (40-85 aminoácidos), son altamente hidrofóbicas y contienen dominios transmembranales (43). El papel que desempeña esta proteína en el ciclo replicativo del virus es desconocido. Sin embargo, se cree que potencia la infección y participa en los procesos de carcinogénesis (44). Las proteínas más estudiadas son las pertenecientes al virus del papiloma bovino tipo 1 (VPB-1) y al virus de papiloma humano tipo 16. No obstante la proteína E5 de VPB-1 ha sido la más estudiada, y se sabe que es la oncoproteína más importante de este virus. Por otra parte, la proteína E5 de VPH-16

es menos conocida y parece jugar un papel secundario en el proceso de transformación. Sin embargo los estudios indican que estas proteínas de ambos virus inducen efectos similares (45,46).

La proteína E5 del VPB-1 ha sido el modelo de estudio para dilucidar los mecanismos moleculares de carcinogénesis inducidos por las proteínas E5 de otros papilomavirus, entre ellas la proteína E5 de VPH-16. El VPB-1 es el principal agente etiológico de múltiples neoplasias en diferentes tejidos y especies (43). Esta proteína puede afectar múltiples vías de señalización, muchas de ellas mitogénicas, las cuales se han sugerido como el mecanismo principal de transformación (44). La vía por excelencia afectada por E5 de VPB-1 es la vía del Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas β (R-PDGF β). Esta vía se encuentra sobreactivada en presencia de E5 y en ausencia de su ligando (PDGF), sin embargo,

si necesita de la actividad tirosina cinasa del receptor para encender la vía (47). El Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) también es uno de los blancos de E5, sin embargo el mecanismo de activación independiente del ligando no es tan marcado como en el R-PDGF β , no obstante en presencia del ligando la vía de señalización se sobreactiva (48). Lo anterior ocurre debido a una desregulación en la degradación de EGFR, lo cual es atribuido a la capacidad de E5 para inhibir a una ATPasa- H^+ vacuolar mediante su interacción con la unidad 16K de esta enzima (49). Esta inhibición impide la degradación del EGFR por falta de acidificación en los endosomas, y promueve el reciclamiento del receptor a la superficie, lo cual termina en una activación sostenida de la vía. Sin embargo, en ambos receptores existe cierta independencia al ligando cuando está presente E5 y es debido a la forma de interactuar con los receptores (50). Por otro lado, se ha demostrado que E5 de VPB-1 puede afectar vías como PI3K “rio abajo” de R-PDGF β sin la participación de este receptor (51), no obstante, el mecanismo por el cual sucede esto no está totalmente esclarecido. Por último, se ha sugerido que E5 produce la alcalinización del aparato de Golgi, posiblemente afectando el procesamiento de cientos de proteínas que pueden contribuir al proceso de transformación (52).

1.6.1 La proteína E5 de VPH tipo 16

La proteína E5 de VPH-16 es una proteína de 83 aminoácidos con un peso aproximado de 10 kDa; tiene tres regiones hidrofóbicas que le permiten el anclaje a membranas (Figura 5) (42,53,54), y se ha demostrado que la primera región es

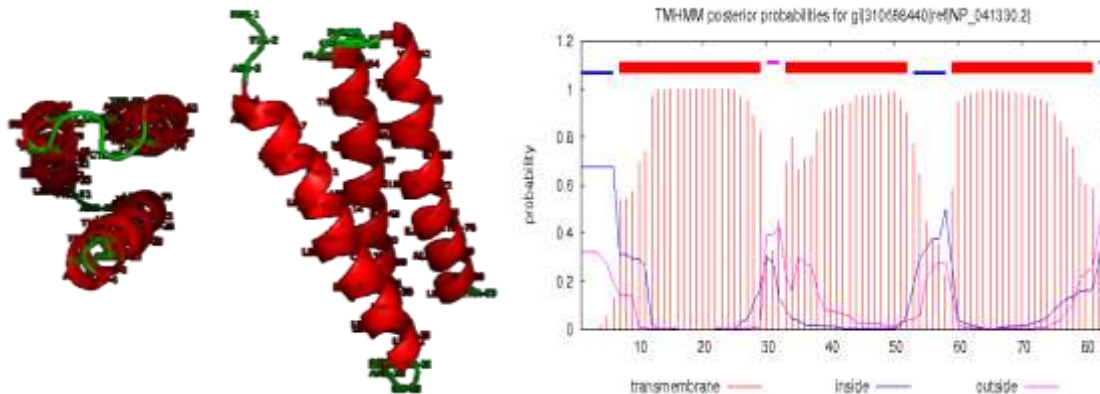


Figura 5. Estructura y regiones hidrofóbicas de la proteína HPV16 E5. A) Modelado de la estructura terciaria la cual contiene 3 hélices alfa altamente hidrofóbicas (39). B) Predicción de regiones hidrofóbicas de la proteína la cual indica que el amino-terminal está en el citosol (TMHMM Server v. 2.0).

esencial para el anclaje en la membrana plasmática, retículo endoplásmico y aparato de Golgi (55), pero las tres regiones permiten la homodimerización y oligomerización con diferentes proteínas (56).

El gen E5 de VPH-16 ha sido poco estudiado, sin embargo se le han atribuido diversas funciones que afectan múltiples funciones celulares (43,44,57). Se ha observado por ejemplo, que afecta la dinámica y composición de lípidos y proteínas de las membranas celulares (58,59), lo que posiblemente provoca una disminución al estrés osmótico (60). Por otro lado, una de las moléculas de superficie afectadas por E5 es el complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I), el cual es retenido en el retículo endoplásmico mediante la formación de un complejo ternario E5-calnexina-MHC-I (61). Esta disminución provoca una evasión de la respuesta inmune mediada por células T CD8 (61), lo que sugiere que E5 podría estar involucrada también en la infección persistente por el VPH-16. La comunicación celular también se ve disminuida por la regulación de E5 sobre la expresión y

activación de la conexina 43 (62,63). Los ejemplos anteriores muestran un panorama del impacto de E5 sobre los procesos celulares, sin embargo no son precisamente los más destacados por favorecer la progresión del cáncer.

E5 de VPH-16 por sí misma puede transformar líneas celulares de fibroblastos (64), y puede cooperar en el proceso de inmortalización de queratinocitos (65). Ensayos *in vivo* demuestran que E5 puede inducir hiperplasia (66), y la expresión prolongada de la proteína puede llegar a inducir neoplasia, mientras que al cooperar con las proteínas E6 y E7 promueve un forma de cáncer más agresiva (67). Estas evidencias demuestran la participación de E5 en los procesos de carcinogénesis inducidos por el VPH-16. Sin embargo, E5 por sí misma no puede promover estos efectos, ya que en todos los casos reportados se requiere de la presencia del EGFR y de su ligando el EGF.

Se ha sugerido que E5 de VPH-16 impacta en múltiples funciones celulares mediante la alteración de vías de señalización (44). La más importante y la más estudiada es la vía del EGFR. Se ha demostrado que E5 de VPH-16 puede incrementar la actividad del EGFR de manera dependiente de su ligando (46). Además, también se ha observado este efecto en heterodímeros de EGFR-ErbB2 a través de la actividad cinasa de EGFR, lo que indica que E5 puede modular la actividad de los receptores de la familia del EGF (68). Se ha descrito que la proteína E5 promueve el reciclamiento del EGFR, impidiendo su degradación por medio de su unión con la subunidad de 16kDa de la V-ATPasa la cual inhibe su actividad (44). Sin embargo, el mecanismo preciso por el cual el EGFR se recicla a la superficie es un tema de discusión, ya que se han sugerido diferentes mecanismos (69–71).

La fosforilación del EGFR puede activar múltiples vías de señalización, por lo cual E5 puede afectar también estas vías. Se ha demostrado que E5 de VPH 16 puede proteger a queratinocitos de la apoptosis provocada por radiación UV, mediante las vías de PI3K/Akt y MEK-ERK1/2. Estas vías inhiben blancos apoptóticos que incluyen a BAD, Caspasa 9, NF- κ B y CREB, así como también activan proteínas antiapoptóticos como Bcl- XL y Bcl-2 (72). E5 también contribuye a la progresión

del ciclo celular por medio de la vía de las MAPK (73) En un estudio realizado por Kim S.H. *et al*, se evidenció que los niveles de fosforilación del EGFR son directamente proporcionales a los niveles de E5, demostrando además que EGFR puede inducir un incremento en los niveles de proteína y mRNA del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF por sus siglas en inglés) por medio de la vía de señalización de MEK-ERK1/2 y PI3K/Akt (74). Los datos sugieren que E5 puede activar indirectamente otras vías de señalización que favorecen procesos de carcinogénesis (Figura 6).

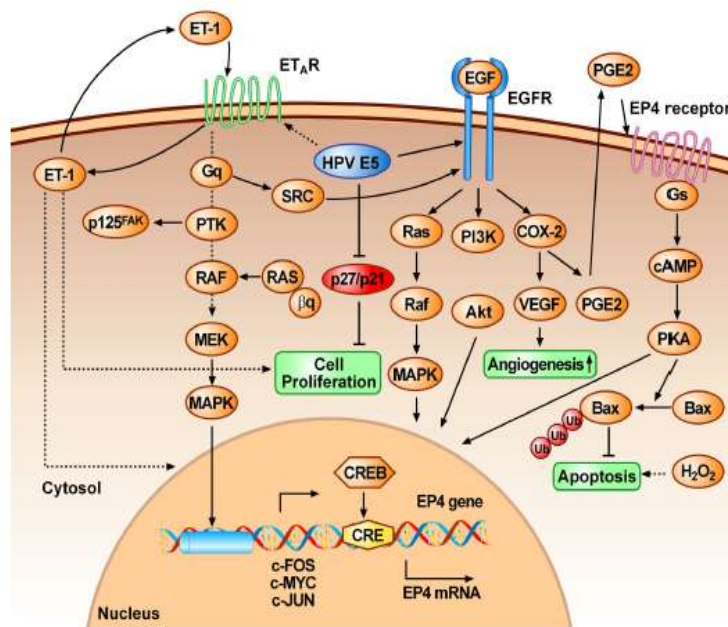


Figura 6. Vías de señalización afectadas por la proteína E5. La proteína E5 puede potenciar varias vías de señalización, relacionadas con proliferación, angiogénesis y resistencia a la apoptosis. En la imagen se muestran algunas de las vías afectadas por E5 siendo la más importante la vía del EGFR por su capacidad de regular diversos procesos celulares (44).

E5 de VPH-16 no solo afecta vías “rio abajo” del EGFR, también se ha descrito que E5 puede alterar vías de señalización relacionadas con el estrés del Retículo Endoplásmico como es el caso de la inhibición de ciclo-oxigenasa-2 (COX-2), XBP-1 e IRE1a que favorecen la replicación viral (75). Además, se ha visto que E5 puede inducir la expresión de uno de los receptores de prostanglandina E2 (PEG2) que se une a los factores de transcripción CREB/CRE, los cuales se unen al promotor del gen AP4 que activa a PI3K y el VEGF (44). Por otro lado como ya se mencionó E5

puede potenciar vías de señalización de receptores de la familia EGF a través de la formación de heteródimeros (68). También puede potenciar la señal de algunos receptores de la familia de los factores de crecimiento ligados a receptor endotelial acoplado a proteínas G (ET_A), un ejemplo de una patología de los efectos de la potenciación de estos receptores es la psoriasis que es un desorden inflamatorio y de hiperproliferación de los queratinocitos en la piel provocado por la activación crónica de receptor ET-1, esto sugiere que EGFR y ET_A pueden amplificar el efecto de la proliferación (44). Sin embargo, no todos los efectos de E5 impactan en los mecanismos que llevan a cáncer, también afecta cientos de genes involucrados con adhesión, proliferación, angiogénesis, diferenciación, etc. Muchos de ellos son regulados en gran parte por la vía del EGFR (Figura 6) (76).

1.7 Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

La familia de los Receptores Tirosina Cinasa (RTKs, por sus siglas en inglés) son componentes importantes para la comunicación celular y juegan un papel relevante en el desarrollo embrionario, homeostasis en adultos, diferenciación y movilidad celular. Los RTKs tienen intrínsecamente un dominio de proteína Tirosina Cinasa, el cual permite la autofosforilación. Los RTKs comúnmente se activan con la unión de un ligando, lo cual induce la formación de dímeros u oligómeros. Algunos de los receptores perteneciente a esta familia son: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), Receptor de Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas, Receptor de Factor de Crecimiento de Fibroblastos, Receptor de Factor de Crecimiento Vascular Endotelial, Receptor de Factor de Crecimiento de Hepatocitos, Receptor de Heparinas y Receptor de Insulina (77).

El EGFR es miembro de una subfamilia de los RTKs, en vertebrados conocida como ErbB y en humanos como Her; cuatro miembros componen esta familia: EGFR (ErbB1, Her1), Neu (ErbB2, Her2), ErbB3 (Her3), ErbB4 (Her4) (Figura 7). La estructura principal de estos receptores consta de un dominio extracelular, un dominio transmembranal único y un domino intracelular (78–80). Cada receptor puede ser activado por varios ligandos, los cuales pueden activar diferencialmente vías de traducción de señales (81).

El receptor de EGF es una proteína cuyo peso molecular se encuentra alrededor de 180 Kilo Daltones (KD). El amino terminal se encuentra la región extracelular, la cual contiene el dominio de unión al ligando, alrededor de doce sitios de glicosilación y 51 residuos de cisteína los cuales están organizados en dos regiones (aminoácidos en la posición (A.P.) 132-313, 446-612) que forman dos estructuras globulares con un bucle entre ellas el cual funciona como sitio de unión del ligando. La región transmembranal consta de 50 aminoácidos y el carboxilo terminal ubicado en la región citoplasmática presenta el dominio catalítico RTK (A.P. 694-940) (78), así como sitios de autofosforilación, siendo los más importantes las tirosinas 1068, 1148 y 1173 (82).

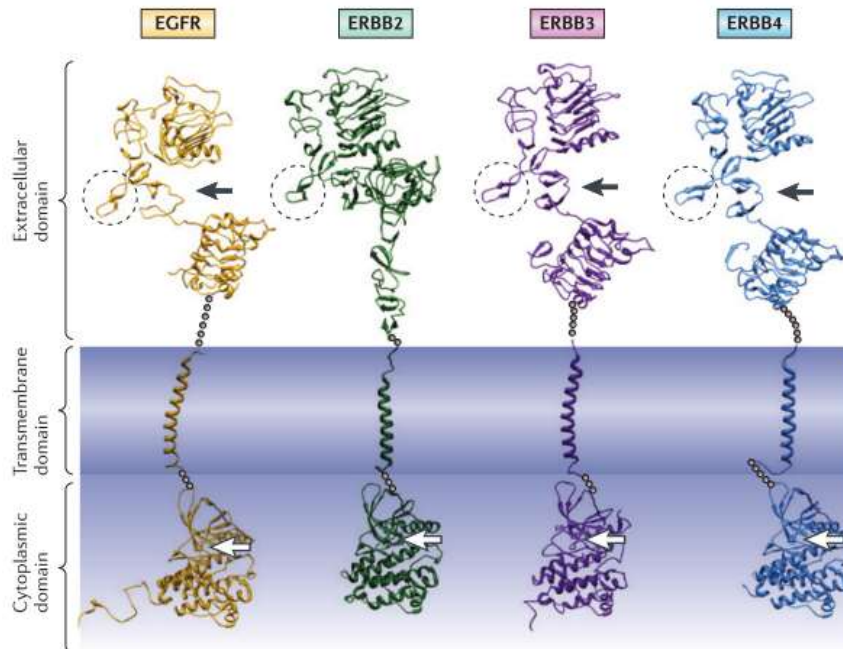


Figura 7. Receptores de la familia ErbB. Los cuatro miembros de esta familia EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3, ErbB4; conservan una estructura característica que consiste en tres dominios principales: Dominio extracelular, intracelular y citoplasmático. Con excepción de ErbB2 en el dominio extracelular se encuentra el sitio de unión al ligando (flechas negras), en círculos punteados se indica el sitio de dimerización para cada uno de los receptores. En la parte citoplasmática se encuentra el dominio RTK el cual necesita de ATP para su funcionamiento, las flechas indican el sitio de unión d ATP (80).

Existen seis ligandos conocidos del EGFR: neuregulina (NRG), amfiregulina (AR),

epiregulina (EPI), β -celulina (β -Cel), heparina-ligada-EGF (HB-EGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF); la unión de estas moléculas al EGFR inducen la formación de homodímeros o heterodímeros, que a su vez activan diferentes vías de señalización (83). Aunado a lo anterior, diferentes sitios de fosforilación sirven para el reclutamiento de proteínas de señalización “río abajo”, así como también de enzimas y proteínas adaptadoras, las cuales forman parte importante de la regulación de las cascadas de señalización que se generan con la activación del receptor (77).

1.7.1 Vías de señalización del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

Los receptores de la familia ErbB como el EGFR, pueden encender varias vías de señalización como la vía de las MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), PI3K (phosphatidylinositol-3-kinases)-Akt/PKB (Protein Kinase B) y PLC (Fosfolipasa C)-PKC (Protein-Cinasa C) las cuales regulan procesos celulares como proliferación, diferenciación, movilidad, adherencia y supervivencias celular (Figura 8) (84,85).

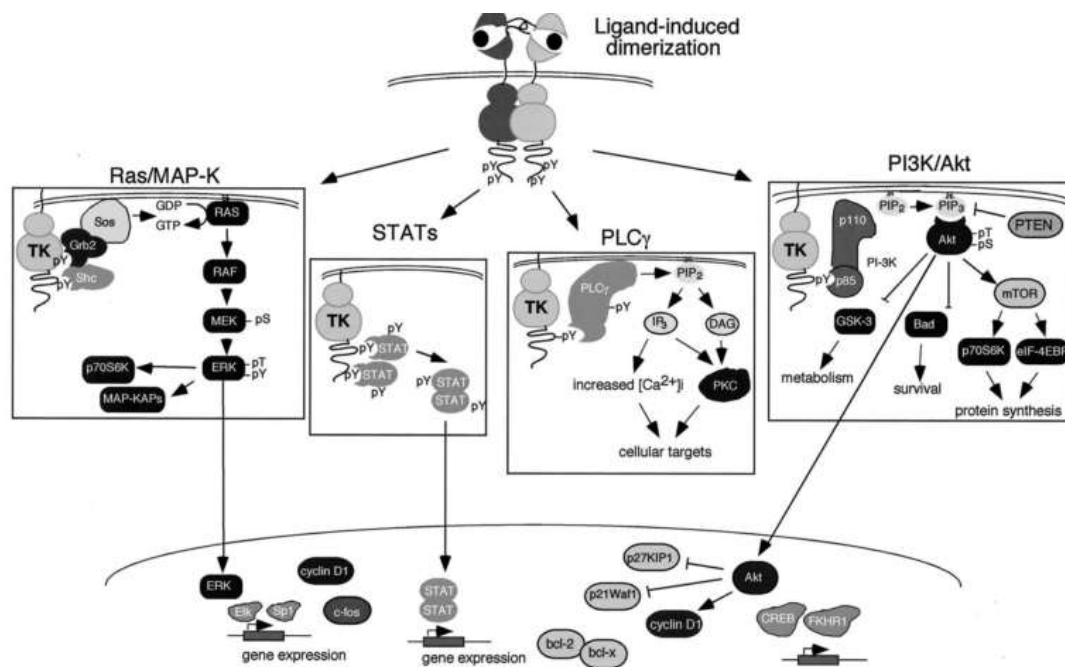


Figura 8. Vía de señalización del EGFR. La vía de señalización inicia con la unión del ligando al receptor, posteriormente el receptor puede formar un homodímero o un heterodímero, esto provoca múltiples fosforilaciones, las cuales reclutan diferentes proteínas que iniciarán cascadas de señalización de vías como las MAPK, STATs, PLC γ y PI3K (85).

La vía de las MAPK al igual que los receptores de la familia ErbB es altamente conservada en organismos eucariontes como levaduras, nemátodos, invertebrados y mamíferos. En mamíferos se han identificado cinco familias: Cinasas Reguladas por Señales Extracelulares (ERK1 y ERK2), Jun N-terminal Cinasas (JNK1, JNK2 y JNK3), P38 Isozimas Cinasas (p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ), ERK3/ERK4, y ERK5 (86). Las MAPK pueden ser activadas por diferentes estímulos, como factores de crecimiento, citocinas inflamatorias, agonistas de receptores acoplados a proteínas G y estrés; los cuales pueden activar tres niveles de diferentes cascadas de señalización que inicia con la activación de una MAPKKK (MAPK Kinase Kinase), que a su vez activa a una MAPKK (MAPK Kinase) y está a una MAPK (87).

El EGFR puede activar la vía clásica de ERK1/2 (MAPK) en respuesta a estímulos por factores de crecimiento los cuales permiten la autofosforilación del EGFR. La fosforilación de las tirosinas 992, 1068, 1086, 1148 y 1173 son indispensables para la activación de ERK1/2, su función es anclar a la proteína GRB2 mediante su dominio SH2 (88). La interacción ocurre de manera directa (GRB2-EGFR) en las tirosinas 1068 y 1086, siendo la primera el sitio de unión por excelencia; las tirosinas 992, 1148 y 1173 reclutan indirectamente a GRB2 por medio de otra proteína adaptadora llamada SHC (13). Posteriormente GRB2 mediante el dominio SH3 interactúa con SOS (un factor intercambiador de guanina) el cual consecutivamente es reclutado cerca de la membrana por una proteína G llamada Ras, promoviendo así el intercambio de GDP a GTP. En consecuencia Ras-GTP se une a Raf (MAPKKK), la cual una vez activa, puede fosforilar residuos de serina en el “loop” de activación de MEK1/2 (MAPKK). La forma activa de MEK1/2 puede fosforilar residuos de treonina y tirosina de ERK1/2 (MAPK). ERK1/2 fosforilado activa factores de transcripción que incluyen a Sp1, E2F, Elk-1, AP-1; los cuales regulan la expresión de genes involucrados en procesos celulares como proliferación, migración y diferenciación (Figura 8) (90).

La vía de PI3K/Akt ó PI3K/PKB es activada por estímulos como hormonas y factores de crecimiento mediante receptores de superficie como el EGFR (91). PI3K constituye una familia de cinasas de lípidos, la cual puede fosforilar anillos inositol

de fosfolípidos en el grupo 3'-OH. Los PI3Ks de clase 1 son heterodímeros, formados por una unidad catalítica p110 y una unidad adaptadora p85 (92). PKB o mejor conocida como Akt es una cinasa de serina y treonina, la cual pertenece a la superfamilia de las cinasas "AGC"; son proteínas evolutivamente conservadas, en mamíferos existen tres isoformas PKB (α , β , γ ; Akt1, 2, 3) (93). Las tres isoformas de PKB comparten los mismos dominios estructurales: un amino terminal con homología a pleckstrina (PH), un dominio central cinasa y un carboxilo terminal de regulación el cual contiene un motivo hidrofóbico (HM) (94).

En mamíferos la activación de la vía de PI3K/Akt es altamente regulada por múltiples pasos, y puede ser activada por el EGFR, como ocurre con las MAPK (95). La cascada de señalización inicia cuando PI3K se une al EGFR fosforilado mediante p85, lo que permite un cambio conformacional en la unidad catalítica p110, la cual posee un amino terminal con dominio de unión a Ras, que permite la interacción con el complejo Shc-Grb2-SOS-Ras, esto resulta en la potenciación de la vía PI3K/PKB; sin embargo en células quiescentes no ocurre esta interacción, y la vía esta activa de manera moderada (94,96). La forma activa de p110, puede convertir el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) a fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato (PIP3). Akt se une a PIP3 en la membrana y lo hace mediante el dominio PH; esta interacción permite el acceso de la cinasa dependiente fosfatidilinositol 1 (PDK1) al "loop" de activación de Akt, lo que resulta en la fosforilación de este y por consiguiente la activación de Akt (Figura 8) (92,93,95–97). La regulación de esta activación es dependiente de la disponibilidad de PIP3, la cual esta mediada por PTEN, una fosfatasa con la capacidad de retirar el grupo fosfato en la posición 5' del PIP3, de tal manera que se genera PIP2 y disminuye la capacidad de activación de Akt (94), que en su forma activa puede regular genes implicados en metabolismo, proliferación, crecimiento, angiogénesis, apoptosis (98).

1.7.2 Internalización del EGFR

La unión del ligando al EGFR resulta en la activación de múltiples cascadas de señalización, y posteriormente ocurre un mecanismo complejo de internalización que puede llevarlo a tres destinos diferentes: degradación, reciclamiento, y translocación

nuclear (Figura 9) (99). El proceso inicia con la fosforilación del EGFR en la tirosina 1045 (100), la cual es indispensable para el reclutamiento de la ubiquitin-ligasa Cbl, que puede ubiquitinar residuos de lisina (101). La ubiquitina sirve como señal de internalización y degradación. El destino que se tome depende de múltiples factores, como la estabilidad del complejo activo (83), la afinidad del tipo de ligando por el receptor (102,103), y la concentración del ligando (100,104).

Dos rutas procesan la endocitosis del EGFR, la más conocida es la endocitosis dependiente de clatras (EDC) la cual involucra la participación de las proteínas clatras, que son el componente principal de vesículas; la otra vía es la endocitosis independiente de clatras (EIC), que principalmente depende de balsas lipídicas ricas en colesterol (105). Se ha demostrado que la vía EDC favorece el reciclamiento del EGFR (100,104) y a su vez que la vía del EDC es favorecida por bajas concentraciones del ligando, por el contrario concentraciones altas de ligando inducen la degradación (104).

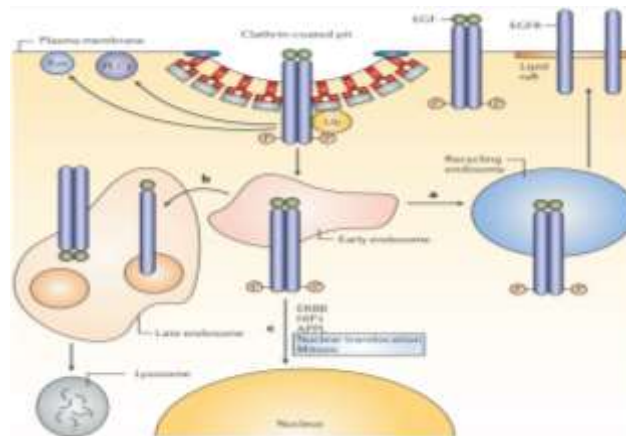


Figura 9. Proceso de internalización del EGFR. La activación del receptor conlleva a la internalización del EGFR, la cual una vez formado el endosoma puede tener 3 destinos diferentes: degradación, reciclamiento o translocación nuclear (99).

Por otro lado, hemos mencionado que el destino del receptor también depende de la afinidad del ligando al receptor. Lo anterior es debido a que una vez que comienza el proceso de internalización, el endosoma temprano se acidifica gradualmente y la afinidad de la interacción ligando-receptor es dependiente del pH. Una baja afinidad permite la disociación del complejo ligando-receptor en el endosoma temprano, esta

disociación promueve el reciclamiento del receptor a la superficie. Por lo contrario cuando la afinidad es muy alta, el complejo es difícil de disociar, promoviendo la maduración del endosoma temprano a uno tardío, lo que finalmente desencadena la degradación del receptor (106). Este proceso de degradación del EGFR está mediado por la enzima ATPasa (H^+) Vacuolar (V-ATPasa). Esta enzima es un complejo multiproteico, el cual produce el intercambio de iones hidronio al interior del endosoma. Cuando el EGFR se fosforila, además de liberar cascadas de señalización e iniciar su internalización, también recluta a las proteínas del complejo V-ATPasa (H^+) para iniciar el proceso de acidificación endosomal. Es por eso que el papel de la V-ATPasa (H^+) es esencial en la regulación de la activación de la vía del EGFR (107).

2 ANTECEDENTES

La proteína E5 de VPH 16 induce potencialmente la vía de señalización del EGFR dependiente de ligando. Uno de los mecanismos por los que lo hace es inhibiendo a la V-ATPasa (H^+), resultando en un incremento en el reciclamiento del EGFR a la membrana (44). Aunado a esto, se ha demostrado que el EGFR juega un papel importante en la homeostasis de las subpoblaciones celulares de la capa basal del epitelio escamoso estratificado por medio de vías de señalización “rio abajo”, por ejemplo PI3K/Akt y ERK1/2 (108). En el grupo de investigación Reveles Espinoza, observó un aumento en la población $\alpha 6$ -I^{Bri}CD71^{Dim} en cultivos de células HaCaT transducidas con el gen E5. Esto demuestra que E5 podría estar jugando un papel importante en la regulación del destino celular promoviendo la auto-renovación (Figura 10) (109).

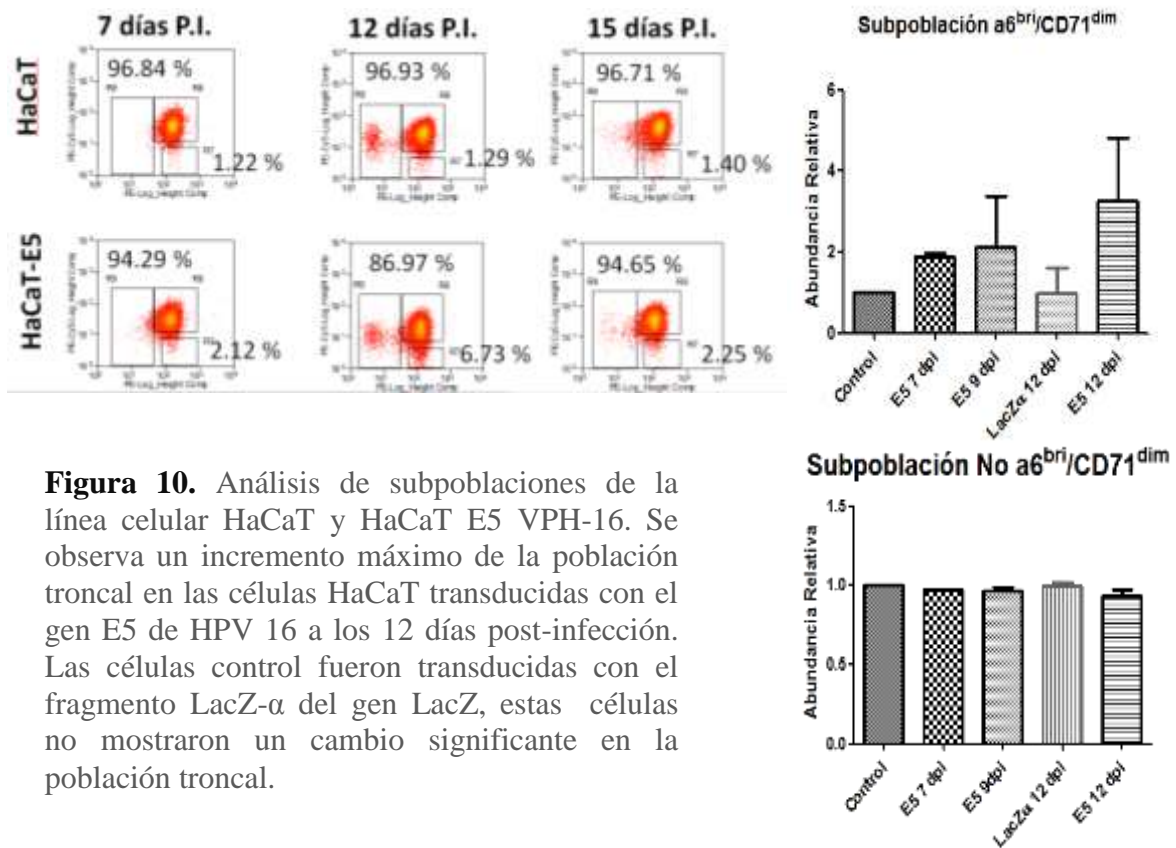


Figura 10. Análisis de subpoblaciones de la línea celular HaCaT y HaCaT E5 VPH-16. Se observa un incremento máximo de la población troncal en las células HaCaT transducidas con el gen E5 de HPV 16 a los 12 días post-infección. Las células control fueron transducidas con el fragmento LacZ- α del gen LacZ, estas células no mostraron un cambio significativo en la población troncal.

Un experimento en ratones transgénicos que expresan el gen E5 de VPH tipo 16, demostró que el EGFR es necesario para inducir hiperplasia, observándose además un incremento en el grosor de la capa basal del epitelio de estos ratones, lo que indica que E5 podría modificar la homeostasis de la capa basal del epitelio escamoso estratificado mediante la vía del EGFR (110).

PI3K es una molécula de señalización “rio abajo” del EGFR y está involucrada en procesos celulares de crecimiento, proliferación, autofagia etc. (111). Un estudio realizado en queratinocitos primarios de humano, demostró que la sobre-expresión de PI3K inhibe la fase temprana de la diferenciación, mientras que un decremento conduce a la pérdida de adhesión celular y una diferenciación temprana (112). Adicionalmente un estudio reciente, demostró por medio de un análisis por microarreglos que la proteína E5 de VPH 16 afecta la expresión de genes involucrados en la adhesión celular, movilidad y proliferación. En este análisis se observó la sobre-expresión de varias cinasas, incluyendo a la Fosfoinositol-3-Cinasa (PI3K por sus siglas en inglés) (76), lo que sugiere que E5 puede estar afectando procesos regulados por PI3K involucrados en la diferenciación.

En un ratón transgénico para Akt se demostró que la sobre-activación de esta vía (PI3K/Akt) provoca hiperplasia y proliferación de células progenitoras epidérmicas; en dicho reporte también se menciona que células embrionarias de ratón y primate con Akt que posee una mutante dominante positiva, mantienen su estado de troncalidad (113). Por otro lado se ha demostrado que en células HaCaT que expresan E5 de VPH 16 existe un incremento en la expresión y actividad de Akt, al igual que de PI3K (76); esto refuerza la idea de que E5 puede regular procesos de auto-renovación y diferenciación por medio de PI3K/Akt.

La proteína p63 es un homólogo de p53 y se ha demostrado que se expresa únicamente en la capa basal de epitelio escamoso estratificado, y juega un papel fundamental en procesos de auto-renovación (27). Además se ha observado que la actividad de p63 aumenta por la activación de la vía de señalización del EGFR a través de PI3K/Akt.

En células HaCaT que expresan E5 se ha demostrado una sobre-expresión de p63; dicho comportamiento le ha sido atribuido a la disminución del micro RNA miR-203 el cual inhibe la expresión de p63 (114). Sin embargo no se ha descrito el mecanismo preciso, ni se ha considerado la manera en que el EGFR puede contribuir al mantenimiento de la troncalidad por medio de p63.

El EGFR induce varias vías de señalización principalmente PI3K/Akt y MEK/ERK1/2. La activación de la vía de las MAPK tiene como resultado un reacomodo del citoesqueleto, el cual favorece la formación de colonias de holoclonas, que corresponden a células troncales. También se ha observado que la inhibición de esta vía promueve la expresión de marcadores de diferenciación, lo que indica que posiblemente esta vía juega un papel importante en el mantenimiento de la subpoblación troncal del epitelio (115).

La fuerte activación de la vía de señalización del EGFR provocada por E5 de VPH 16 puede activar diversas rutas relacionadas con el auto-renovación y diferenciación. Las evidencias mencionadas sugieren fuertemente que el aumento en la población troncal de células HaCaT E5 observada en nuestro grupo de trabajo, puede ser debido a la vía de señalización EGFR. Sin embargo el mecanismo por el cual sucede esto es aún desconocido, y existen otras vías de señalización que están involucradas en los procesos de diferenciación. Sin embargo interesantemente las evidencias indican fuertemente que el EGFR es el mejor candidato para explicar la expansión en la población troncal de células HaCaT transducidas con el gen E5.

3 JUSTIFICACIÓN

EL cáncer cérvico uterino (CaCU) es un problema de salud pública en México y en el mundo, más del 50% de los casos de CaCU es causado por el Virus de Papiloma Humano (VPH) tipo 16. El VPH necesita de la diferenciación del epitelio para generar progenie, por lo que inicia infectando células de la capa basal. Las células troncales forman parte de esta capa, y se ha sugerido que la infección de estas células podrían comenzar el proceso de carcinogénesis. La proteína E5 de VPH 16 es una oncoproteína que se expresa en células de la capa basal tras la infección, e incrementa la activación de múltiples vías de señalización involucradas en procesos de diferenciación y auto-renovación. Una de estas vías es la del EGFR la cual se sabe que E5 potencia mediante el reciclamiento del receptor. Observaciones en nuestro grupo de investigación indican, que E5 promueve un incremento de la población troncal en células HaCaT, sin embargo los mecanismos moleculares por los cuales E5 promueve la auto-renovación son desconocidos y es necesario dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales el VPH favorece el proceso de carcinogénesis.

4 HIPÓTESIS

La proteína E5 del Virus de Papiloma Humano tipo 16 afecta los procesos de auto-renovación y diferenciación en la línea celular de queratinocitos inmortalizados HaCaT, mediante la vía de transducción de señales del EGFR.

5 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la expresión del gen E5 de VPH16 sobre vías de señalización reguladas por el EGFR relacionadas con auto-renovación y diferenciación en la línea celular de queratinocitos inmortalizados HaCaT.

6 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Generar un sistema que permita la expresión estable del gen E5 de VPH16 en la línea celular HaCaT mediante el uso de un vector lentiviral.
2. Evaluar la participación del EGFR en los procesos de auto-renovación y diferenciación temprana en la línea celular HaCaT E5 VPH-16.

7 Estrategia Experimental

La estrategia experimental utilizada para el desarrollo del trabajo se esquematiza en el siguiente diagrama.

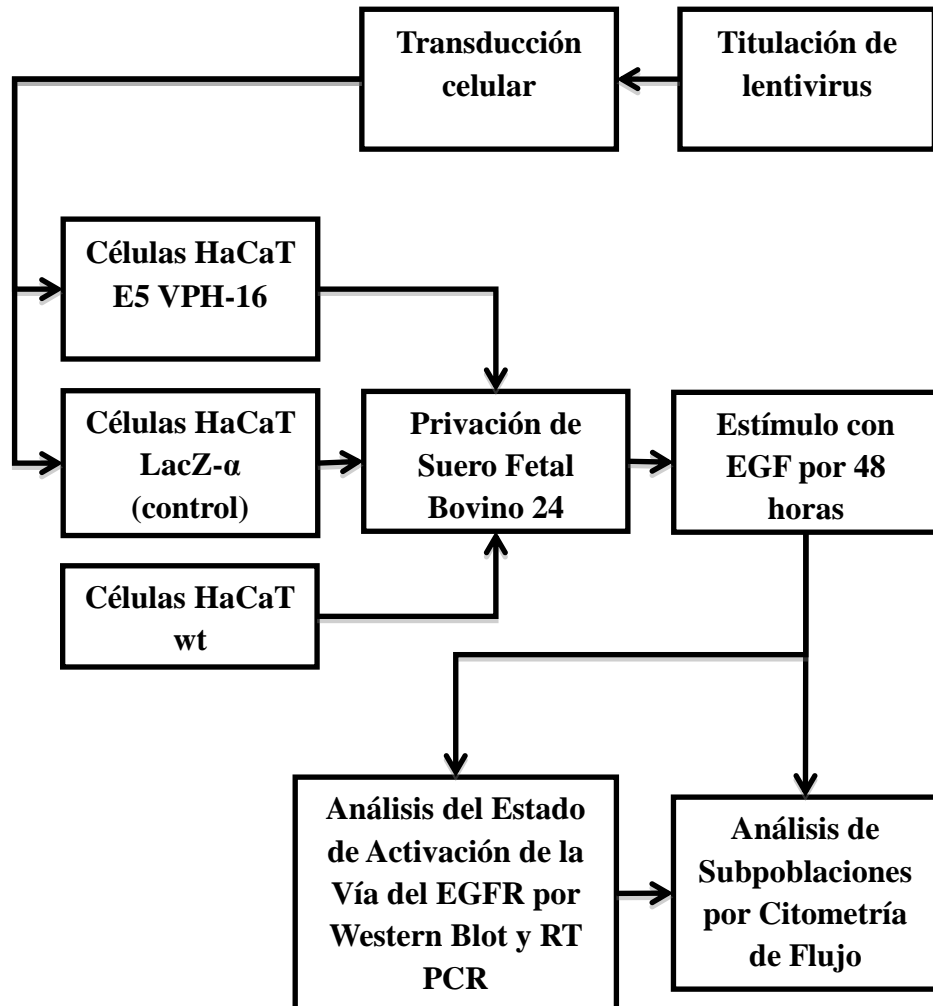


Figura 11. Estrategia experimental que se siguió para cubrir el objetivo general propuesto.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cultivo celular y tratamientos.

El modelo experimental utilizado para el presente trabajo fue la línea celular HaCaT, proporcionada por el Dr. Norbert Fusening, la cual es de origen epitelial extraída de una biopsia de la periferia de un melanoma localizado en la espalda de un paciente masculino de 62 años. Esta línea celular se sugiere que es de origen clonal, inmortalizada pero no transformada, no tumorigénica, libre de genomas de VPH y capaz de diferenciarse de manera terminal, por lo que es un buen modelo para el estudio de procesos de diferenciación celular (116). Además, esta línea celular expresa receptores de la familia del EGFR, tales como el EGFR, ErbB2 y ErbB3 los cuales pueden formar heteródimeros y responder a diferentes ligandos (117). Esta línea celular se cultivó en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) alto en glucosa (Sigma D5648-1L), el cual se suplementó con 44mM de carbonato de sodio (NaHCO₃) (Sigma) y 10 mM de HEPES (Sigma), a pH 7.2. Posteriormente, se suplementó una alícuota de uso continuo con 50U/ml de penicilina -50U/ml de estreptomicina (Gibco) 2mM de Glutamina (Sigma), 1mM de piruvato de sodio (Sigma), y se agregó 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco 16000-044) fresco directamente al cultivo. Las condiciones de incubación fueron 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Para los experimentos de sobre-activación de la vía del EGFR, las células HaCaT [wt, LacZ- α (control), E5 VPH-16] se cultivaron en medio DMEM estándar, con 10% de SFB, a una densidad aproximada de 7600cels/cm², las cuales al final del tratamiento alcanzaron el 80% de confluencia. Se incubaron 20-24 hrs a 37°C con atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Posteriormente, se retiró el medio con una trampa de vacío y se hicieron dos lavados con PBS, por último se agregó medio DMEM estándar fresco sin SFB. Se incubaron 24 hrs a 37°C con atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Después de la privación de SFB se utilizan dos condiciones de tratamiento las cuales se hicieron de forma paralela. Primero se retiró el medio y se lavó la monocapa con PBS, posteriormente a una caja de cultivo se agregó medio DMEM estándar sin SFB, por otro lado a otra caja se agregó medio DMEM estándar suplementado con 10ng/ml de Factor de Crecimiento Epidérmico recombinante

(rEGF) (Gibco 10450-013). Se incubó por 48 hrs a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

8.2 Transducción celular y titulación de lentivirus.

Un sistema lentiviral de tercera generación fue utilizado para transducir células HaCaT. Este tipo de vector lentiviral (tercera generación) tiene un nivel de bioseguridad muy alto, pues el diseño del vector elimina genes patógenos, involucrados con la replicación del virus e incapacita la reactivación del virus. Además algunas de las ventajas de usar un sistema lentiviral es la integración del transgen en el genoma de la célula huésped, creando así una expresión estable del mismo. Por otro lado poseen la proteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) en la cápside, la cual le da un mayor tropismo a las partículas virales. Por último los lentivirus son los únicos virus capaces de infectar células en reposo, a diferencia de los demás los cuales necesitan de células en división para poder transducir las células (118–124). Esta característica es muy importante cuando se requiere trabajar con células troncales, ya que se ha demostrado que se dividen de manera esporádica, y la mayor parte del tiempo están en quiescencia (23–25).

Las células HaCaT se infectaron con 1 MOI (Multiplicity of Infection). Una MOI es el número de partículas virales infectivas por número de células. Para determinar la cantidad necesaria de virus para infectar las células con una MOI, es necesario conocer el título viral, para lo cual se utilizó el siguiente protocolo:

Se sembraron células HaCaT a una densidad de 6,000 cels/cm², aproximadamente 57,700 células por pozo de una placa de 6 pozos. Se incubaron 24 hrs a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Se prepararon diluciones seriadas del stock del virus, partiendo de una dilución de 10⁻² hasta 10⁻⁶. Para realizar la primera dilución (10⁻²) se tomaron 10µl del stock de virus y se diluyeron en 990µl de DMEM estándar con 10% de SFB. Posteriormente se tomaron 100µl de la dilución 10⁻² y se diluyeron en 900µl de DMEM con 10% SFB para obtener una dilución final de 10⁻³. Las diluciones posteriores se hicieron de la misma manera que la anterior, hasta obtener una dilución 10⁻⁶ como se muestra en la Figura 12.

Una vez preparadas todas las diluciones se retiró el medio de las placas de 6 pozos y se dan dos lavados con PBS. Se retiró el PBS de último lavado y se agregó una dilución por pozo, y un pozo sin virus (control negativo). Al final se agregó polybrene, a una concentración final de $8\mu\text{g/ml}$. Se incubaron 24 hrs a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO_2 .

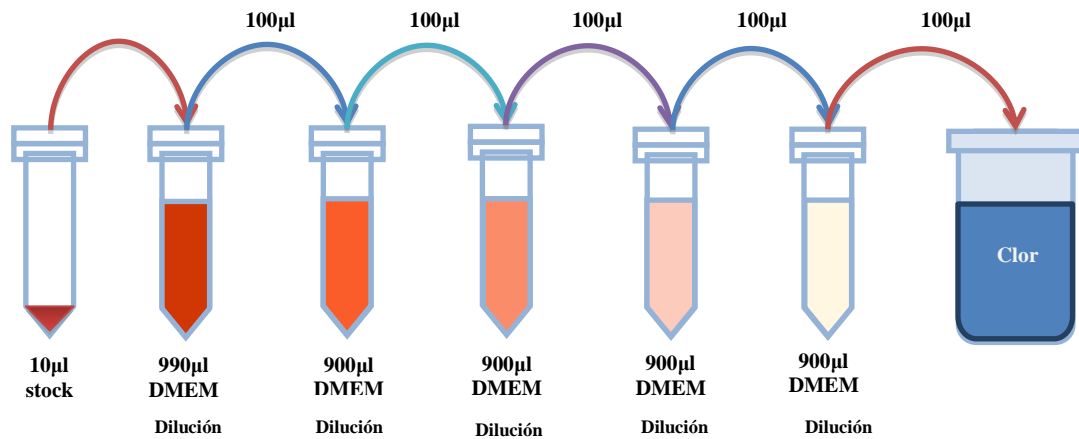


Figura 12. Procesos de diluciones seriadas utilizadas para titular los lentivirus.

Después de 24 hrs de incubación, se retiró la infección con el uso de una pipeta Pasteur con bulbo. El medio retirado se depositó en un recipiente con cloro. Se dieron dos lavados con PBS. Se agregó 1.5ml de medio DMEM estándar con 10% de SFB. Se incubaron 24 hrs a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 . 48 hrs post-infección se comenzó la selección con puromicina, puesto que el transcrito que contiene el transgen es polisistrónico, y contiene nuestro transgen y un gen de resistencia a la puromicina (Figura 13). Por lo tanto las células que hayan sido transducidas podrán resistir el tratamiento con puromicina. Se agregó puromicina a una concentración final de $0.35\mu\text{g/ml}$. Se incubaron 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 .



Figura 13. Estructura del transcrito polisistronico del transgen y el gen de resistencia a la puromicina.

La selección con puromicina se mantuvo alrededor de 5 días o hasta que las células del control negativo muriesen. Se cambió el medio cada 48 horas. Se mantuvieron condiciones de incubación a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Al terminar la selección únicamente se agregó medio DMEM estándar con 10% SFB y se mantuvieron las células hasta cumplir los 12 días post-infección, procurando cambiar el medio cada 48 horas. Al cumplir los 12 días post-infección las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron y tiñeron con colorante cristal violeta. Las células fijadas se encuentran organizadas en colonias, las cuales en teoría fueron generadas a partir de una célula transducida por una partícula viral. Partiendo de esa suposición se contaron las colonias de cada pozo y se utilizó la siguiente ecuación para estimar el número de unidades de transducción (TU) por ml:

$$\frac{TU}{ml} = \frac{\text{Número de colonias}}{\text{Factor de dilución} \cdot \text{Volumen de la dilución}}$$

Una vez obtenido el título viral se procedió a infectar las células con cantidades definidas. Para este trabajo, se eligió una MOI de 1.0. En donde:

$$MOI = \frac{TU}{\text{Número de células}}$$

Para generar las células HaCaT que expresaran el gen E5 de VPH tipo 16 y aquellas con el fragmento LacZ- α , se sembraron aproximadamente 200,000 células en una placa p100. Se incubaron 24 hrs a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Después se retiró el medio y se lavaron las monocapas dos veces con PBS, se agregaron 5ml medio fresco con 10% de SFB. Posteriormente, se tomó el volumen necesario de las alícuotas de virus para infectar las células con una MOI de 1.0 y se agregó directamente sobre la caja, e inmediatamente se agitó suavemente para dispersar uniformemente las partículas virales. Al final se agregó polybrene a una concentración final de 8 μ g/ml. Se incubaron 24 hrs a 37°C en atmósfera húmeda con

5% de CO₂. Al iniciar el segundo día post-infección se retiró la infección y se agregó medio fresco con 10% de SFB. Se incubaron 24 hrs a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. En el tercer día se inició la selección con puromicina ocupando una concentración final 0.35µg/ml. La selección se mantuvo hasta el día 7 post-infección, en este día el cultivo celular se considera que tiene únicamente células transducidas, y pueden iniciar los tratamientos de los experimentos.

8.3 Extracción de RNA de células HaCaT.

Las células HaCaT sembradas en una caja p100 se lavaron dos veces con 2ml de PBS 1X, posteriormente se agregó sobre la monocapa 500µl TRIzol (Ambion) y se dispersó por toda la superficie. Se incubó 5min a temperatura ambiente. Después se despegaron las células con ayuda de un fragmento de hule ó gendarme y la mezcla obtenida se transfirió a un tubo. Se agregaron 100µl de cloroformo y se agitaron vigorosamente para homogenizar las fases, se incubaron 5 min a temperatura ambiente. Enseguida se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. El resultado fue la obtención de dos fases, se recolectó la fase acuosa en un tubo nuevo. Después, se agregaron 2 volúmenes de isopropanol frío y se incubó a -20oC por 20 min. Pasado el tiempo se centrifugó por 45 minutos a 13000rpm a 4°C, terminando se desechó todo el sobrenadante y se dejó el tubo boca abajo, y después se agregó 500µl de etanol al 70% para lavar. Se centrifugó 10 minutos a 13000rpm a 4°C, y nuevamente al terminar se desechó el etanol. Se dejó secando 10 minutos a temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en 25µl de agua desionizada estéril y se agregaron 3µl de buffer de DNAsa RQ1 (10X) (Clontech) y 2µl de enzima DNAsa RQ1 (1u/µl) (Clontech). Se incubó 90 minutos a 37°C en termoblock (BOEKEL mod. 110001). Posteriormente, se agregó 2µl de solución de paro de la DNAsa RQ1 (Clontech) y se incubó a 65oC por 15 minutos. El RNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo SCIENTIFIC) y se almacenó a -80°C.

8.4 Reacción de RT PCR.

Para sintetizar cDNA a partir de RNA mensajero (mRNA), se empleó un oligonucleótido (Oligo (dT)), que hibrida en la regio poli-A del mRNA y se utilizó una enzima DNA polimerasa dependiente de RNA (M-MLV reverso transcriptasa). Para la reacción de síntesis de DNA se utilizaron los siguientes reactivos: 2µg de RNA, 1µl de Oligo (dT) (Promega), 5µl de buffer 5x de enzima M-MLV (Promega), 5µl de dNTPs mix (25mM), 0.6µl de RNAsin (Promega) y 1µl de la retrotranscriptasa M-MLV (1u/µl) (Promega). Se llevó a un volumen final de 25µl con agua desionizada estéril.

Inicialmente, únicamente se agregó el RNA, el oligo (dT) y el agua, esta mezcla se incubó a 70°C por 5 min, posteriormente a 4°C por 5 min. Inmediatamente se agregó el resto de los reactivos, se homogenizó y se incubó a 42°C por 2 horas, terminando este paso se incubó 5 minutos a 4°C. Este proceso se realizó en un termociclador. Al final el RNA se almacenó a -20°C.

8.5 PCR punto final.

Para los ensayos de PCR, se realizó la siguiente mezcla de reacción: Aproximadamente 100ng de cDNA, 1.25mM de dNTPs mix, 1X de Buffer de DNA Polimerasa (BioTherm), 1.25mM de MgCl₂, 0.05u/µl de DNA Polimerasa (BioTherm), 0.5µM oligonucleótido Fw, 0.5µM oligonucleótido Rv. Las condiciones de reacción para el gen de Actina fueron las siguientes: fase de inicio 94°C por 5 minutos (1 ciclo); segunda fase (30 ciclos), temperatura de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento a 60°C por 45 segundos, temperatura de elongación a 72°C por 1 minuto; tercera fase a 72°C por 7 minutos. Las condiciones para E5 y LacZ-α fueron las siguientes: fase de inicio 94°C por 3 minutos (1ciclo); segunda fase (30 ciclos), temperatura de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, temperatura de alineamiento a 60°C por 45 segundos, temperatura de elongación a 72°C por 45 segundos; tercera fase a 72°C por 5 minutos. Para JunB las condiciones fueron: fase de inicio 94°C por 10 minutos (1 ciclo); segunda fase (35 ciclos), temperatura de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, temperatura de

alineamiento a 60°C por 1 minuto, temperatura de elongación a 72°C por 1 minuto; tercera fase a 72°C por 7 minutos.

8.5.1 Oligonucleótidos.

Oligonucleótidos para PCR		
Nombre	Secuencia	Tm
ActinaFw	5'-TGACGGGGTACCCACACTGT GCCCATCTA-3'	82.9
ActinaRv	5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGAC GATGGAGGG-3'	79.7
EcoRIAU1E5VPH16Fw	5'-TTACATGAATTCATTGCCACCAT GGACACCTATCGCTATATAACAAATC TTGATACTGC-3'	82.2
BamH1E5VPH16Rv	5'-ATGTAAGGATCCTTATGTAATTA AAAAGCG-3'	64.6
EcoRILacZaFw	5'-GAGAGAATTCATGGACACCTATC GCTATATAGTCGTTTTACAACGTCGT GACT-3'	80.3
BamH1LacZaRv	5'-GAGAGGATCCTTAGTGCATCTGC CAGTTTGAGG-3'	76.8
JunBFw	5'-CCCCCTTCCACTTTTTTT-3'	63.8
JunBRv	5'-TGCGTGTTTCTTTTCCACA-3'	63.0

8.6 SDS-PAGE y Western Blot.

8.6.1 Lisis de células HaCaT, extracción de proteína total.

Para la extracción de proteínas totales se realizó lo siguiente: las cajas del cultivo celular se colocaron sobre una cama de hielo, se lavaron dos veces con 2ml de TBS (Tris Buffered Saline), y se agregaron 200µl de Bolen-Modified RIPA suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas (Apéndice). Se incubó 5 minutos sobre hielo

e inmediatamente se cosecharon las células con ayuda de un gendarme y el extracto se transfirió en un tubo de 1.6ml. Después, se sonicó con un equipo BRANSON SONIFIER 450, con una punta ThermoLabsSystems cat. 4500080. Las condiciones de sonicación fueron las siguientes: DutyCycle: 10%, Output: 2, 3 pulsos de 20 segundos y 20 segundos de reposo entre cada pulso, 3 pulsos es igual a un ciclo, aproximadamente se dan tres ciclos para obtener un lisado apropiado (sin restos de matriz extracelular visibles). Los extractos se almacenaron a -80°C .

8.6.2 Cuantificación de proteínas.

En una placa de lector de lisa (96 pozos), se adicionaron $5\mu\text{l}$ de la muestra o de la dilución de proteínas para hacer una curva calibradora (por triplicado). Posteriormente se agregó $25\mu\text{l}$ de la solución A' ($20\mu\text{l}$ de la solución S + $980\mu\text{l}$ de la solución A). Por último, se agregó $200\mu\text{l}$ de la solución B. Se incubó por 10 minutos en agitación a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se leyó la placa en un equipo Microplate Reader BenchMark BIO-RAD a una longitud de onda de 620nm.

8.6.3 SDS-PAGE.

Se preparó un gel de poliacrilamida-SDS de 1.5mm de espesor con las siguientes características: contiene dos capas de gel, el primero es un gel separador el cual contiene un 8% de Bis-Acrilamida (29:1) (Sigma), RGB 1X (Apéndice), 0.1% de APS (Persulfato de Amonio), TEMED 0.1%. El gel concentrador contiene 5% de Bis-Acrilamida (29:1), SGB 1X (Apéndice), 0.1% de APS y 0.1% de TEMED (SIGMA).

Se tomaron $20\mu\text{g}$ de proteína y se agregó buffer de carga o Laemmli (Apéndice), la mezcla se homogenizó suavemente con micropipeta, enseguida se incubaron por 5 minutos en agua en ebullición. Pasado el tiempo las muestras se cargaron en los pozos del gel, el cual ya se encontraba instalado en la cámara de electroforesis (BIO-RAD) con buffer de corrida (Apéndice). En un pozo se colocó $3\mu\text{l}$ de marcador de peso molecular (PAGERulerTMPlus Thermo SCIENTIFIC 26619). Se migró

electroforeticamente por aproximadamente 2 horas con amperaje constante de 25mAmp.

8.6.4 Electrotransferencia.

El gel en el cual fueron separadas las proteínas y una membrana de nitrocelulosa de 0.2µm (BIO-RAD 162-0097) del tamaño del gel, se equilibraron en buffer de transferencia (TB) (Apéndice), a temperatura ambiente, en agitación por 25 minutos. Posteriormente se preparó el cassette de transferencia de la siguiente manera: en un recipiente con buffer de transferencia se colocó una esponja humedecida con TB sobre la tapa negra del cassette, sobre esta se colocaron 2 fragmentos de papel Whatman (SIGMA 28419299) humedecidos con TB, después se colocó el gel de tal manera que no quedara ninguna burbuja entre el papel y gel, de la misma manera se colocó la membrana sobre el gel, y posteriormente se colocó nuevamente dos fragmentos de papel Whatman y una esponja. Se cerró el cassette y se colocó en la cámara de transferencia (BIO-RAD), a la cual se le colocó un agitador magnético y un gel refrigerante, por último se llenó la cámara con buffer de transferencia y se migró electroforeticamente a 90 volts constantes por 90 minutos a 4°C.

8.6.5 Bloqueo de la membrana.

Terminando la transferencia, se retiró la membrana del cassette y se colocó en un recipiente, inmediatamente se agregó una solución de rojo de Ponceau, el cual tiñe las proteínas adheridas a la membrana, indicando la calidad de la transferencia. Posteriormente se retiró el rojo de Ponceau con un lavado con TBS 1X por 10 minutos en agitación a temperatura ambiente. Por último, se agregó leche baja en grasa al 5% en TBS 1X y se dejó incubando en agitación por una hora a temperatura ambiente.

8.6.6 Adición de anticuerpos.

La membrana previamente bloqueada, se mantuvo en un recipiente con TBS 1X. Se prepararon las diluciones de anticuerpos (Ab) en TBS 1X en las siguientes

proporciones: Ab contra pEGFR (1:250), EGFR (1:200), Actina (1:350), pERK1/2 (1:250), ERK1/2 (1:200). Se incubaron de 12-16 horas a 4°C.

Terminado el tiempo de incubación con los anticuerpos primarios se retiró el exceso de anticuerpo y se realizaron tres lavados con TBS Tween20 (marca) al 0.2% (TBST) por 10 minutos en agitación a Temperatura ambiente. Se realizó un último lavado con TBS 1X, y se prosiguió a agregar los anticuerpos secundarios diluidos en TBS 1X con leche baja en grasas, las diluciones que se ocuparon fueron las siguientes: Ab anti-ratón (1:5000), anti-conejo (1:15000). Se incubaron por una hora a temperatura ambiente en agitación, y protegidos de la luz. Pasado este paso se lavó 3 veces con TBST por 10 min en agitación y protegiendo de la luz, y un último lavado con TBS. Las membranas se almacenaron en TBS 1X a 4°C protegidas de la luz.

8.6.7 Detección.

Las membranas previamente incubadas con anticuerpos se retiraron del TBS y se les eliminó el exceso del buffer, se colocaron sobre una superficie con la cara de la transferencia hacia arriba. Se preparó una solución con los reactivos quimioluminiscentes del kit Super Signal West Pico Chemiluminiscent Substrate (ThermoFisher), mezclando 500µl de Stable Peroxide Solution y 500µl de Luminol/Enhancer Solution, homogenizando perfectamente y con una micropipeta se agregaron sobre toda la membrana. Se incubó por 5 minutos. Después se retiró el exceso del reactivo y se colocó entre dos micas acomodadas en un cassette para revelado marca Kodak. En ausencia de luz se tomó un fragmento de película de autoradiográfica Kodak XO-Mat y se colocó sobre la membrana, se dejó en exposición en diferentes tiempos. Posteriormente se retiró la placa y se incubó en solución de revelado (marca Kodak) por 5 minutos, se enjuagó en agua potable, se retiró el exceso y se incubó en solución de fijado (marca Kodak) por 5 minutos. Por último, se enjuagó y se secó la película. En la película aparecieron reveladas las bandas correspondientes a las proteínas detectadas por el anticuerpo primario.

8.6.8 Anticuerpos para Western Blot.

Anticuerpos para Wester Blot	
Antígeno	Información del anticuerpo
Fosfo-EGFR (Tyr-1173)	Policlonal de conejo IgG sc-03
EGFR Carboxilo terminal	Policlonal de conejo IgG sc-101668
P44/42 MAPK ERK ½	Monoclonal de ratón IgG CS #4695
Fosfo-p44/42 MAPK ERK ½ (Thr-202/Tyr-204)	Monoclonal de ratón IgG CS #4370
β - Actina	Monoclonal de ratón. Donación del Dr. Manuel Hernández. Dep. Biol. Celular, CINVESTAV.
Anti-IgG de conejo acoplado a peróxidasa	Jackson Immuno Research 211-032-171
Anti-IgG de Ratón acoplado a peróxidasa	Jackson Immuno Research 115-035-003

8.7 Citometría de Flujo.

La citometría de flujo fue utilizada para estudiar la abundancia relativa de las subpoblaciones de las células HaCaT. Se retiró el medio de cultivo de una caja p100 con células HaCaT, lavó la monocapa dos veces con 2ml de PBS y se agregó 1ml de una dilución de tripsina 1X (gibco 25200-056) con PBS (3:7), se distribuyó por toda la caja con movimientos suaves y se incubó a 37°C por aproximadamente 5 minutos o hasta que se despegaran las células de la caja. Posteriormente se agregó 2ml de PBS y con ayuda de una micropipeta de 1ml se disgregaron las células, esto se hizo tomando 1ml de la suspensión celular y regresándolo sobre las células aún adheridas, el pipeteo debe ser lento para no maltratar las células. Después se tomó la suspensión celular y se colocó en un tubo cónico con tapón de rosca de 15ml, el cual contenía 1 ml de medio DMEM estándar, para ayuda a inactivar la tripsina, y de esta manera evitar dañar las células. El contenido se centrifugó por 5 minutos aproximadamente a 3500rpm, después se retiró el sobrenadante con trampa de vacío y la pastilla se

resuspendió en 1ml de medio DMEM estándar. Enseguida se tomó 50µl de la suspensión celular, y se diluyó en una solución que contenía 900µl de PBS y 50µl de una solución (stock) de colorante azul de tripano (Apéndice), se agitó por inversión para homogenizar la mezcla. Se tomaron 15µl de esta suspensión y se contaron las células con una cámara de Neubauer. Posteriormente se agregó 3ml de PBS a la suspensión celular en medio DMEM y se centrifugó por 5 minutos a 3500rpm. Terminando la centrifugación, la pastilla se resuspendió en solución de bloqueo (Apéndice) a una concentración final de un millón de células por ml. Se incubaron por 15 minutos, y se agitó suavemente por 7.5 minutos. Pasado el tiempo se tomó 500µl de la suspensión celular (aproximadamente 5×10^5 células) y se depositó en un tubo de 1.6ml, se utilizó un tubo para cada condición de la tinción. Se centrifugaron los tubos a 3500rpm a 4°C por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100µl de solución de marcaje (Apéndice). Después se prepararon las siguientes condiciones: un tubo sólo contenía los 100µl de solución de marcaje (Condición sin teñir), a un tubo se le agregó anticuerpo anti-integrina $\alpha 6$, acoplado a Ficoeritrina (PE) (BD 555736) a un factor de dilución 1:100 (condición tinción sencilla PE), a otro tubo se agregó anticuerpo acoplado a PE-cianina 5 (PE-Cy5) contra CD71 (BD 555575), a una dilución de 1:250. Para la última condición se agregaron los dos anticuerpos a las diluciones mencionadas. Se homogenizaron agitando suavemente con la mano y se incubaron en hielo, cubierto de la luz por 45 minutos, se agitaron los tubos en intervalos de 15 minutos. Una vez que concluyó el tiempo de incubación se agregó 900µl de PBS (+) (Apéndice) a cada tubo, y se centrifugaron a 3500rpm por 5min a 4°C, se repitió el proceso y por último la pastilla se resuspendió en 500µl de PBS (+). Las suspensiones se pasaron a un tubo para citometría. Las muestras se leyeron en un citómetro LSR FORTESSA (BD).

9 RESULTADOS

9.1 Transducción celular.

La transducción celular se realizó con ayuda de los vectores lentivirales Lenti-E5-VPH-16 y Lenti-LacZ- α , generados en el grupo de investigación por Reveles Espinoza. Uno de los vectores lleva integrada la secuencia del gen E5 de VPH-16 con la secuencia del epítipo AU1 adherida. El segundo vector lleva integrado un fragmento del gen LacZ, denominado lacZ- α (125) el cual tiene un tamaño semejante a la secuencia del gen E5 de VPH-16, y ha demostrado no tener efecto en células eucariontes, por lo que, fue utilizado como un control de la transducción.

Alícuotas de lentivirus de 10 μ l almacenadas a -80°C , fueron descongeladas sobre una cama de hielo, y se utilizaron para titular los lentivirus (métodos). Este proceso se repitió cada vez que se utilizaba una alícuota de un lote con fecha diferente. Una vez obtenido el título del virus se prosiguió a transducir las células HaCaT utilizando 1 MOI. La selección con puromicina se mantuvo aproximadamente por una semana después de la infección. Para el caso de las células HaCaT transducidas con el gen E5, después de la selección únicamente se utilizaron para los experimentos en el día 12 post-infección. Las células HaCaT transducidas con el fragmento LacZ- α , se utilizaron aproximadamente por dos meses a no más del pase 28. Estas células fueron ocupadas durante más tiempo debido a que únicamente son un control de la infección del vector, y los productos del gen son inertes en células eucariontes. Sin embargo, las células transducidas con E5 se utilizaron en un tiempo determinado (12 días post-infección), debido a que las observaciones de Reveles Espinoza demuestran que la expresión del gen a nivel proteico disminuye después del día 12 post-infección, y por otra parte el efecto más notable de la proteína sobre las subpoblaciones es a este tiempo.

Se evaluó la transducción de las células HaCaT en los tiempos post-infección mencionados, midiendo los niveles de expresión de los transgenes por RT-PCR. En la Figura 14 se muestra la expresión de los transcritos del gen E5 y LacZ- α , se puede observar que la expresión del transgen específico (E5 o LacZ- α) corresponde

únicamente a la línea celular que lo debe de expresar. Lo anterior indicó que no hubo contaminaciones entre líneas celulares y, por otro lado, que la transducción fue exitosa, es decir se obtuvieron células HaCaT que expresan establemente el gen E5 de VPH-16 (HaCaT E5 VPH-16) y células HaCaT que expresan establemente la secuencia de LacZ α (HaCaT LacZ- α). Una vez establecidos estos sistemas, se procedió a evaluar los efectos de E5 sobre las células HaCaT.

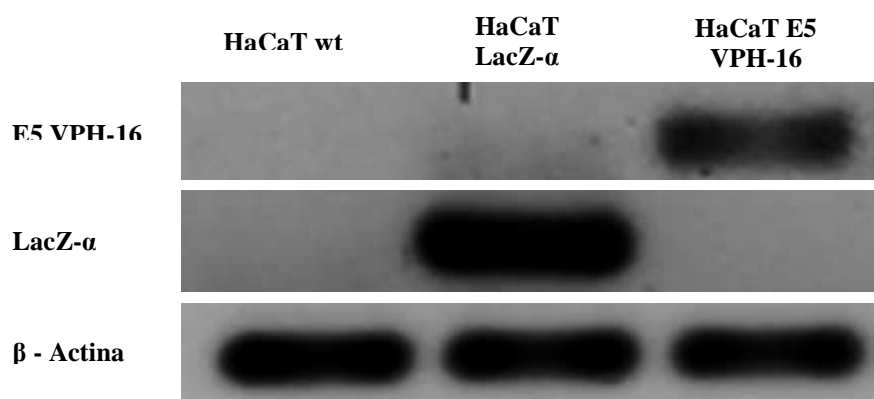


Figura 14. Productos de RT-PCR de E5, LacZ- α y β -Actina, de las células HaCaT transducidas con los vectores lentivirales respectivos.

9.2 Evaluación del efecto del EGF sobre la abundancia relativa de las subpoblaciones de células HaCaT E5 VPH-16.

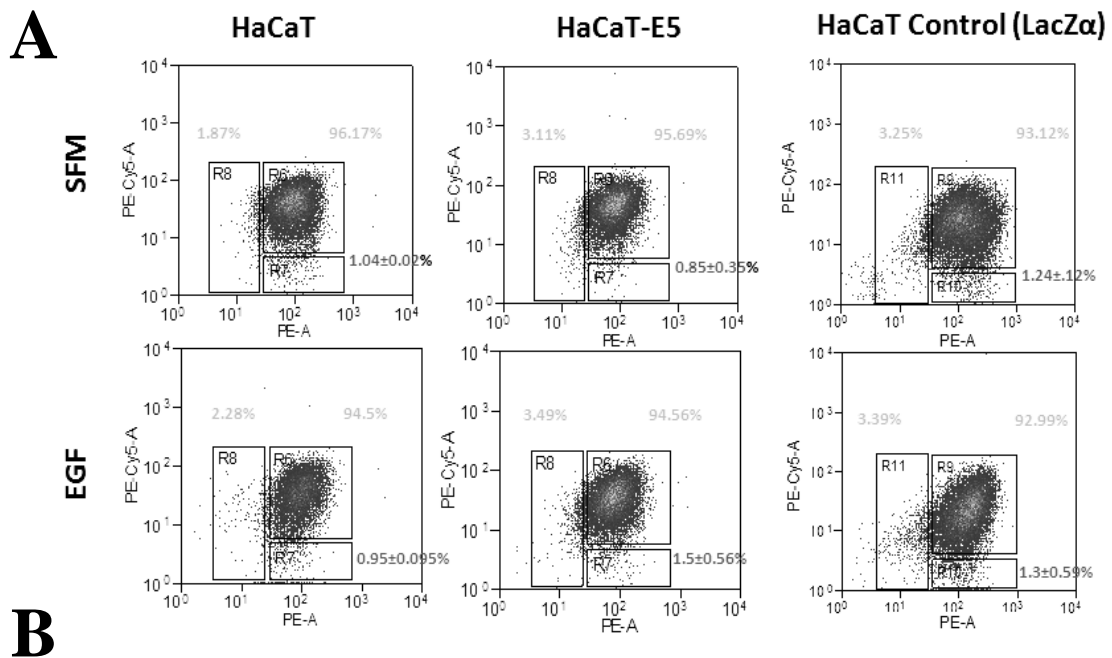
Como se mencionó en los antecedentes, la vía de señalización del EGFR modula múltiples funciones celulares, entre ellas la diferenciación y la auto-renovación de queratinocitos. Aunado a lo anterior, se sabe que la proteína E5 de VPH-16 potencia la vía de señalización del EGFR. Estas evidencias junto con los antecedentes del grupo, sugirieron que E5 puede afectar la auto-renovación por medio de la vía del EGFR.

Para evaluar el efecto del EGF, se comenzaron los tratamientos de los cultivos (métodos) cuando las células transducidas con E5 de VPH-16 tenían 8 días post-infección. Por otro lado, las células HaCaT y HaCaT LacZ- α , antes de los tratamientos se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo. La estimulación con EGF se mantuvo por 48 horas, debido a que las células troncales realizan su ciclo de

manera más lenta. Además, la limitación del tiempo para el uso de las células transducidas (12 dpi) nos limitó a 48 horas como tiempo máximo a utilizar para el estímulo con EGF.

Los ensayos se realizaron de forma paralela, es decir, las células con o sin estímulo fueron cultivadas el mismo día y a partir de una sola caja de cultivo. Las cajas de cultivo de los experimentos se llevaron al 80% de confluencia y los tratamientos se realizaron a la par. Para los experimentos con células transducidas, para ambas condiciones (con o sin factor) se utilizaron células obtenidas de la misma infección. Esta estrategia nos permitió controlar de manera muy precisa las posibles variables del sistema que pudieran influir en el resultado. Una vez controladas todas las variables y concluido el tiempo de tratamiento, se decidió evaluar las subpoblaciones de la línea celular HaCaT por citometría de flujo. Se utilizaron los marcadores integrina $\alpha 6$ y CD71 para distinguir las subpoblaciones.

Los ensayos de citometría de flujo demuestran que la abundancia relativa de la subpoblaciones $\alpha 6$ -I/CD71 de las células HaCaT E5 VPH-16 se modifica con el estímulo de EGF comparadas con aquellas células cultivadas en ausencia de suero (SFM). Por lo contrario, las células HaCaT y HaCaT LacZ- α no muestran cambios significativos con el estímulo de EGF (Figura 15A). Los resultados de estos ensayos fueron los esperados, demostrando que E5 puede incrementar 1.8 veces la subpoblación $\alpha 6$ -I^{bri}CD71^{dim} de la línea celular HaCaT mediante un estímulo con EGF (Figura 15B). Sin embargo, únicamente se observó el efecto a nivel fisiológico evaluado mediante la abundancia relativa de la población troncal putativa. Para demostrar que este efecto era debido a la vía de señalización del EGFR se decidió evaluar el estado de activación de esta ruta mediante, el estado de fosforilación del EGFR, el estado de fosforilación de ERK1/2, y del transcrito de JunB, el cual es un gen de expresión temprana de la vía del EGFR.



Efecto del EGF en la abundancia relativa de la subpoblación $\alpha 6\text{-I}^{\text{Bri}}/\text{CD71}^{\text{Dim}}$

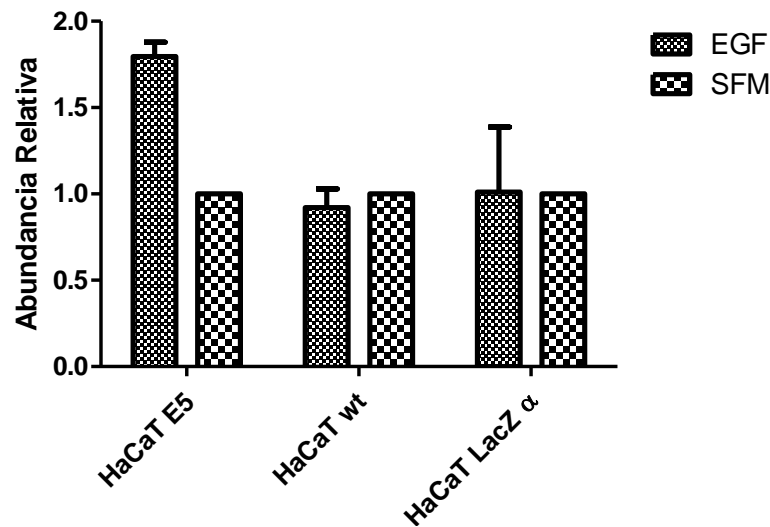


Figura 15. Ensayos de abundancia relativa de las subpoblaciones de células HaCaT. Células HaCaT, HaCaT E5 VPH-16 y HaCaT LacZ- α , en presencia o ausencia de EGF se analizaron por citometría de flujo. (A) Gráficos de densidad típicos de citometría de flujo, los cuales en el eje de las X mide la fluorescencia de PE acoplada al anticuerpo anti $\alpha 6\text{-I}$, en el eje de las Y se mide la intensidad de PE-Cy5 acoplada al anticuerpo contra CD71. (B) Gráfico obtenido de duplicados de los ensayos de citometría de flujo en los que se determinó el efecto del EGF en la abundancia relativa de las subpoblaciones en las diferentes líneas celulares.

9.3 Evaluación del estado de activación de la vía del EGFR.

El objetivo del presente trabajo consistió en demostrar que E5 afecta las subpoblaciones por medio de la vía del EGFR. En los resultados anteriores se demuestra que la expresión de E5 en presencia de EGF si afecta las subpoblaciones celulares, por lo que nos enfocamos en demostrar que estos efectos suceden por la acción de E5 sobre la vía del EGFR. Para demostrarlo, se detectaron por Western blot (WB) proteínas componentes de la vía. Posteriormente se realizó el análisis densitométrico de las bandas observadas en las placas autoradiográficas, lo que nos provee un dato semicuantitativo relativo, con el cual se pueden analizar los estados de activación de la vía. El análisis fue realizado de manera independiente con cada línea celular, y se tomó como referencia para la normalización de los datos, el estado de activación de las proteínas de las células en presencia de SFB. El análisis se realizó de esta manera para no obtener una variación debido al fondo de la línea celular que tomamos como referencia, sino utilizar como referencia un tratamiento en común en cada línea celular. De esta manera es más confiable obtener resultados que demuestren el efecto del tratamiento en la vía del EGFR, y el efecto del transgen sobre la vía.

Como se ha comentado, la vía de señalización comienza cuando el ligando (EGF) se une al receptor (EGFR), posteriormente forma un dímero y el receptor se autofosforila. Para demostrar esta fosforilación se realizó un WB utilizando un anticuerpo contra EGFR total y otro contra la forma fosforilada del EGFR en la tirosina 1173 (Figura 16A). De esta manera podemos detectar la proporción del receptor que se encuentra activa. En la Figura 16B se presenta este análisis, en donde se observa una tendencia de activación SFB>EGF>SFM, lo cual corresponde a lo esperado. Sin embargo, esta tendencia únicamente ocurre en las células HaCaT E5 VPH-16 y HaCaT LacZ- α , mientras que en las células HaCaT se observa un pico de activación cuando son estimuladas únicamente con EGF. Debido a estas variaciones, se decidió analizar el estado de activación en otro punto de la vía, por lo cual se detectaron los estados de activación de ERK1/2 por WB (Figura 16A). Posteriormente, se realizó la densitometría al igual que con EGFR y se analizaron los

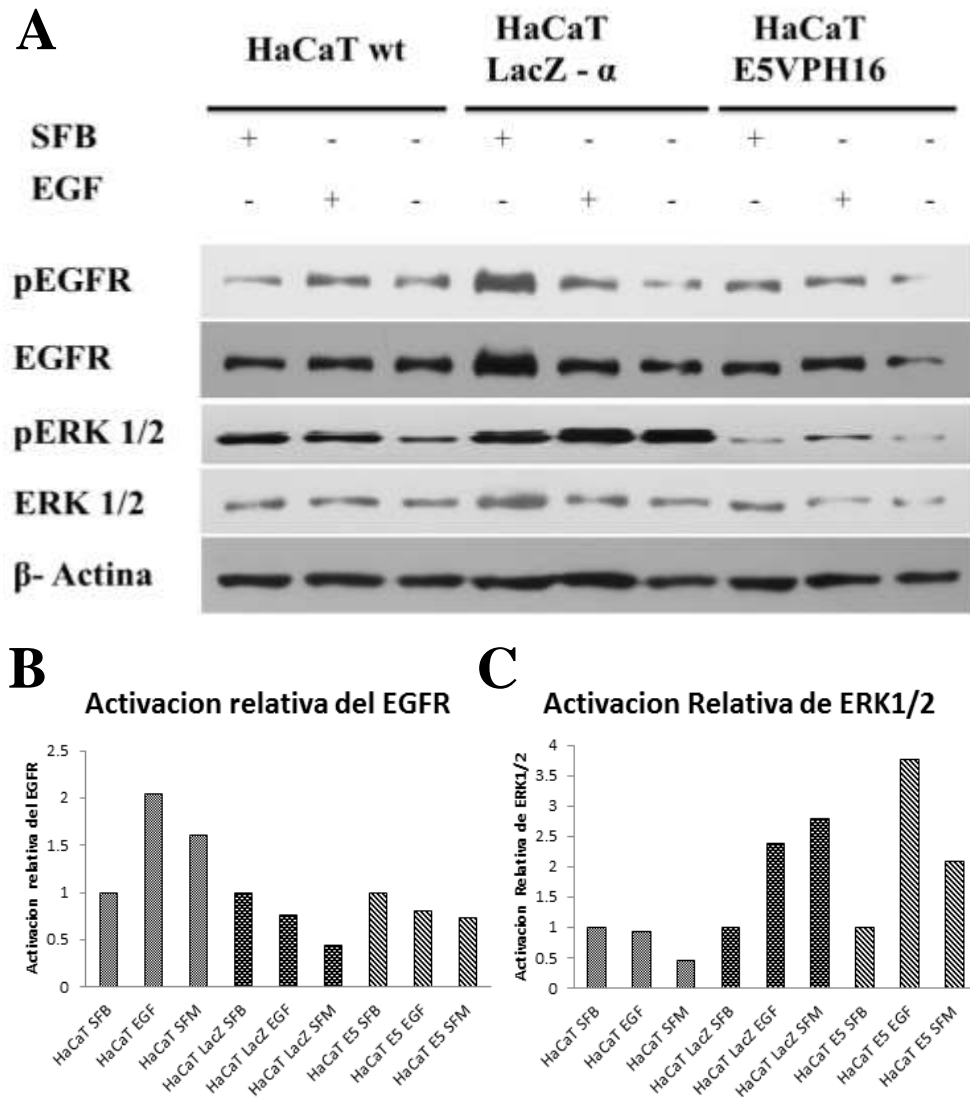


Figura 16. Análisis de activación de la vía del EGFR. A) Western Blot de extractos de proteínas de células HaCaT (wt, E5 VPH-16, LacZ- α) con tres tratamientos diferentes, con SFB, EGF y SFM. Se detectaron las proteínas totales EGFR y ERK1/2 y sus formas fosforiladas, se utilizó β -Actina como control de carga. B) Análisis densitométrico del WB. Se comparó el nivel de fosforilación del EGFR en las diferentes líneas celulares. Se normalizó tomando como referencia el estado de activación de las células tratadas con SFB. Esta normalización se realizó de manera independiente para cada línea celular. C) Análisis densitométrico para ERK1/2. Se analizó de manera independiente cada línea celular. Se tomó como referencia el estado de activación de ERK1/2 en las células tratadas con SFB y se comparó con el estado de activación de la vía con estimulada con EGF y en privación de suero.

estados de activación de la MAPK. En la Figura 16C se muestra la activación relativa de ERK1/2, en la que se observan tendencias diferentes de activación. Interesantemente, se observa un incremento en la activación de ERK1/2 en las células HaCaT LacZ- α , privadas de suero. De manera inesperada el resultado indica que el estado de fosforilación de ERK1/2 en las células HaCaT E5 VPH-16 es mucho menor comparado con el de las otras líneas celulares. Sin embargo, cuando las células son estimuladas con EGF muestran una activación aproximadamente 3.8 veces mayor que el control con SFB. Además, la activación de la vía por EGF, únicamente se observa más incrementada cuando está presente E5.

Las fluctuaciones en la fosforilación de las proteínas involucradas en la vía del EGFR pueden generar incertidumbre y no permitir plantear una conclusión del experimento. Por esta razón se decidió analizar la expresión de uno de los genes de expresión temprana que se conoce responden transcripcionalmente al estímulo de EGF. Se analizó la expresión del factor de transcripción JunB por RT-PCR en las diferentes líneas celulares y sus diferentes condiciones (Figura 17A). Posteriormente, se analizó por densitometría la expresión relativa de este gen. Al igual que en la expresión relativa de las proteínas de la vía (EGFR y ERK1/2), la expresión de JunB se normalizó en cada línea celular de manera particular. En la Figura 17B se muestra que la expresión de JunB es mayor cuando las células son estimuladas con SFB con respecto al estímulo con EGF y SFM, además, la expresión es un poco mayor en la condición SFM. Sin embargo, lo anterior solamente ocurre en las líneas HaCaT y HaCaT LacZ- α . Por lo contrario, en la línea celular HaCaT E5 VPH-16 se observa un incremento aproximadamente de 9 veces cuando la vía está estimulada con EGF. Un aspecto interesante es que la expresión de JunB en esta línea parece estar suprimida cuando no hay EGF, dado que la expresión del gen en esta condición es poco apreciable. No obstante, la expresión de JunB por EGF en las células transducidas con E5 es comparable con la activación provocada por el SFB en las otras dos líneas celulares (Figura 17A). Aunado a lo anterior, es claro que E5 potencia la vía mediante la estimulación con EGF, ya que en las otras líneas el efecto no se logró observar.

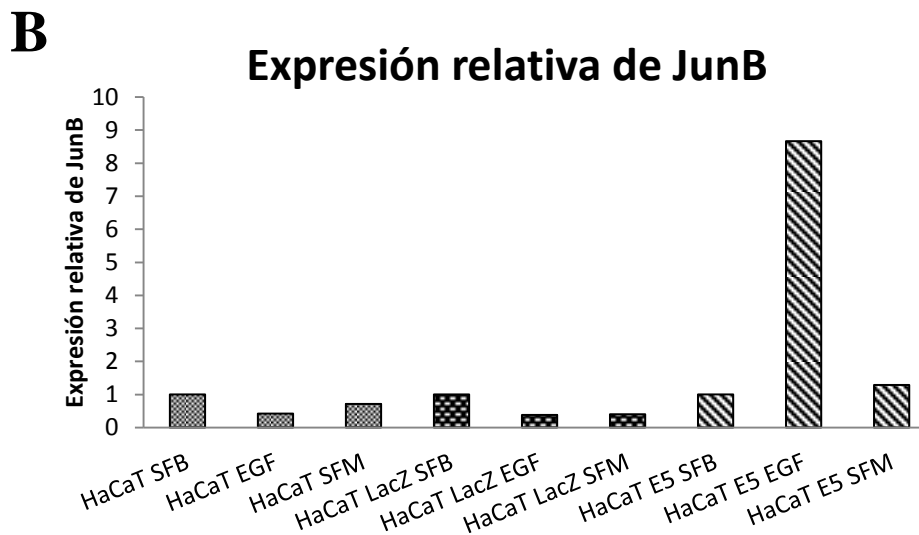
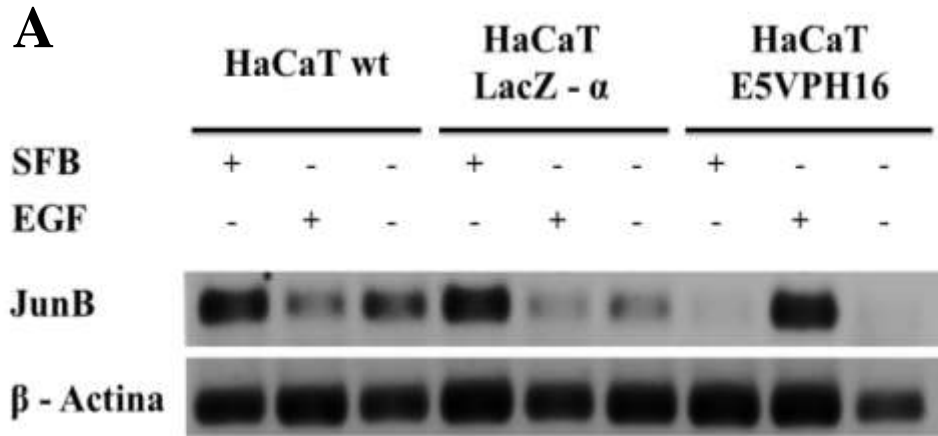


Figura 17. Expresión de JunB, un producto de expresión temprana de la vía del EGFR. A) Corrimiento electroforético de los productos de PCR de JunB y β -Actina. Se muestra la expresión de este gen en diferentes condiciones en las tres líneas celulares. B) Análisis densitométrico de la expresión relativa del gen JunB. El análisis se realizó de manera independiente para cada línea celular.

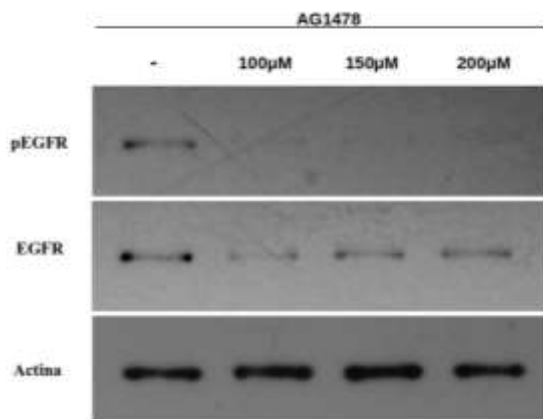


Figura 18. Ensayo de inhibición de la fosforilación del EGFR. Se analizó el estado de fosforilación del EGFR en células HaCaT tratadas con el inhibidor (AG1478) de la tirosina cinasa del EGFR. Las células fueron tratadas por 12 horas.

Un dato interesante fue que a pesar de que las células fueron privadas de suero por 72 horas, el EGFR siempre se mantuvo fosforilado (Figura 16A). Otros ensayos no mostrados evidencian la presencia de fosforilación en el EGFR aún después de 120 horas de privación de suero. Estos resultados son discordantes con lo reportado, por lo que se decidió realizar un ensayo utilizando un inhibidor específico de la tirosina cinasa del EGFR para descartar una posible fosforilación del receptor por otra vía. Se realizó una curva dosis respuesta y se analizó el estado de fosforilación del EGFR por WB. En la Figura 18 se muestra el WB del ensayo, se probaron tres concentraciones del inhibidor AG1478 (Sigma) (100, 150 y 200 μ M) y un control con DMSO/Metanol (1:1). Las células fueron privadas de suero 24 horas previas al tratamiento con el inhibidor, y se incubaron 12 horas en presencia el inhibidor. Los resultados indican que las tres concentraciones del inhibidor utilizadas, fueron capaces de inducir una disminución total de la fosforilación, sin afectar la cantidad de receptor total. Sin embargo las concentraciones que se utilizaron del inhibidor son muy altas comparadas con las utilizadas en otros trabajos reportados en la literatura. Las posibles causas de esta fosforilación persistente se discutirán más adelante.

10 DISCUSIÓN

El cáncer de cuello uterino (CaCU) es un problema de salud pública en México y el mundo. El agente etiológico del CaCU es el VPH, y el tipo 16 está asociado con más del 50% de los casos. El virus infecta células de la capa basal del epitelio entre las cuales se encuentran células troncales. Uno de los requerimientos de la infección por VPH, es que las células blanco se encuentren en proliferación activa, “ciclando” (11), y las células de la capa basal se dividen rápidamente. Sin embargo, las células troncales que se encuentran ahí, ciclan de manera esporádica (23–25) y solo algunos estímulos específicos pueden sacarlas del reposo; por ejemplo el daño al epitelio (126), el cual se ha sugerido que es necesario para la entrada del virus a la capa basal del epitelio cervical (40). Recientemente se ha sugerido que las células troncales podrían ser precisamente el punto en el que se inician los procesos de transformación inducidos por el VPH (10).

En nuestro grupo de investigación, Reveles Espinoza demostró que la expresión de E5 induce en células HaCaT un incremento en la abundancia relativa de la población $\alpha 6\text{-I}^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{dim}}$, la cual esta enriquecida en células troncales (109). Sin embargo, el mecanismo por el cual E5 afecta la población troncal era desconocido. En el presente trabajo se confirmó que la proteína E5 del VPH tipo 16, modifica las subpoblaciones de la línea celular HaCaT, pero además, se demuestra que este efecto es dependiente de la vía de señalización del EGFR.

La proteína E5 del VPH tipo 16 afecta una gran cantidad de vías de señalización (44). Una de estas vías es la del EGFR. Se sabe que E5 potencia su actividad mediante la inhibición de la degradación del receptor y el reciclamiento del mismo a la superficie (64). Esta potenciación de la vía puede afectar procesos celulares como proliferación, motilidad y diferenciación. En este trabajo demostramos que E5 incrementa la subpoblación troncal putativa $\alpha 6\text{-I}^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{dim}}$, mediante la vía del EGFR. En la Figura 15 se muestran los ensayos en donde las células analizadas se mantuvieron en condiciones de privación de suero y posteriormente fueron estimuladas únicamente con EGF. Esta estrategia nos permitió activar favorablemente esta vía, y eliminar el

fondo de las múltiples vías que son activadas con el suero fetal bovino. Los resultados obtenidos fueron interesantes, puesto que se esperaba que el estímulo incrementara la población troncal de las tres líneas celulares, y que favoreciera aún más a las células HaCaT E5 VPH-16. Sin embargo, los resultados presumen un aumento causado por el EGF únicamente en las células que expresan E5. Esto sugiere fuertemente que el incremento de la subpoblación $\alpha 6\text{-I}^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{dim}}$ de las células HaCaT E5 VPH-16 observado por Reveles Espinoza (109), puede ser debido a la potenciación de la vía del EGFR por la proteína E5. Esto correlaciona con las observaciones de Rheinwald y Green, en donde queratinocitos humanos cultivados con EGF incrementan su tiempo de vida sin afectar la velocidad de crecimiento. Ellos sugieren que esto es debido a que el EGF es esencial para el mantenimiento de las células troncales del cultivo (127). Además, se ha observado en este y otros trabajos que en ausencia del EGF los queratinocitos comienzan a diferenciarse y el tiempo de vida del cultivo disminuye, lo que sugiere un agotamiento de la población troncal (127–129). Aunado a esto se ha sugerido que E5 puede desregular la homeostasis del epitelio mediante modificación de receptores de factores de crecimiento (130). Además, se ha demostrado en un modelo murino que E5 mediante la vía del EGFR desregula la diferenciación de la epidermis, mediante un incremento de las células de la capa basal (66). Interesantemente, el incremento de la capa basal correlaciona con el aumento de la expresión del EGFR en células de la capa basal que expresan E5 (131). Todos estos reportes correlacionan con nuestros resultados. Para asegurarnos que el efecto observado era debido a la vía del EGFR decidimos analizar el estado de activación de la vía evaluando proteínas involucradas en ella.

Considerando que el punto inicial de la vía es la fosforilación del receptor del EGF, decidimos evaluar la activación del EGFR midiendo su forma total y fosforilada (Figura 16). El resultado indicó fluctuaciones en los niveles de fosforilación que no parecen tener ningún sentido. Sin embargo la vía del EGFR está muy regulada a múltiples niveles (132), y posiblemente este efecto oscilatorio es debido a esta regulación.

Además, sorprendentemente el EGFR se encontró fosforilado en células con la condición SFM, aun cuando las células fueron privadas de suero por 72 horas. Este

hallazgo no se había descrito en la literatura, puesto que en células HaCaT, el EGFR se apaga en privación de suero (68). Una posible explicación a esto, es la capacidad de los queratinocitos para producir Factor de Crecimiento Transformante α (TGF- α) (133), el cual es una proteína homóloga al EGF que puede activar fuertemente al EGFR y además promover su reciclamiento (134,135). Aunado a lo anterior, también se he descrito que el EGF puede inducir la producción de TGF- α y este de manera autócrina estimular su producción (136). En células HaCaT se ha reportado que además del TGF- α , pueden sintetizar HB-EGF y Anfiregulina, siendo el TGF- α , el ligando que puede activar de manera preferente al EGFR (117). Otra observación interesante es el hecho de que la subpoblación de células comprometidas a diferenciación, parece no ser afectada por la privación del suero, que en teoría debería inducir diferenciación (128,129). No obstante, considerando que en nuestro caso el EGFR sigue activado en condiciones de privación de suero, posiblemente esto se deba a la estimulación autócrina con TGF- α de las células HaCaT. En contraste con esto, es posible que esta activación autócrina del EGFR impida la fase temprana de la diferenciación. En relación a esto se ha descrito que TGF- α se expresa fuertemente en células de la capa basal (133), lo que sugiere que puede estar jugando un papel en su mantenimiento.

El análisis de activación del EGFR parece no ser un buen indicador del estado de activación de la vía, puesto que los niveles de la fosforilación parecen no tener una tendencia clara. Por tal razón, también se analizó una vía “rio abajo” del EGFR. Se midió la activación de ERK1/2 mediante la detección de su forma total y fosforilada (Figura 16). ERK1/2 es el punto final de la cascada de señalización de las MAPK, y su activación depende de las proteínas “rio arriba”. Por lo que, posiblemente, dado que el EGFR no se desactivó, ERK1/2 tampoco lo haría. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos en la activación del EGFR, dado que no se encuentra una tendencia de fosforilación en común. De hecho la activación de las MAPKs por el EGF es mucho menor que la que induce el SFB, en las células HaCaT y HaCaT LacZ- α . Sin embargo, y de acuerdo a lo que esperábamos, las células HaCaT E5 VPH-16 incrementan la forma fosforilada de ERK1/2 en presencia del EGF (137), el incremento es mayor que con el estímulo con SFB. Este incremento en la

fosforilación de las MAPK nos indica que el estímulo con EGF, si está repercutiendo en cascadas de señalización “rio abajo” del EGFR. Sin embargo, podemos observar que aunque la activación de ERK1/2 sea mayor con el estímulo de EGF que con el de SFB, no es mucho mayor con respecto a las otras líneas celulares. De hecho, ni siquiera se compara con la fosforilación de ERK1/2 en las otras líneas celulares privadas de suero. Estos resultados indican una inhibición de la activación de ERK1/2 por parte de E5.

La vía de las MAPK está altamente regulada por múltiples factores, entre ellos los factores de crecimiento y sus receptores. Se ha demostrado que la activación constante de las MAPKs genera la síntesis de represores de la vía, lo que ha sugerido que la vía se auto-regula por retroalimentación (90). Esto correlaciona con nuestros resultados, puesto que E5 potencia la vía de las MAPKs, y es posible que se auto-regule de manera negativa. Por otro lado la vía de las MAPK y la vía de PI3K/Akt, se activan de manera paralela, sin embargo, pueden regular procesos que se contraponen, o cooperar de manera unilateral. Esto es posible debido a que la vía de PI3K/Akt puede inhibir a la vía de las MAPK y viceversa. De tal manera que bajo ciertas condiciones una vía puede ser inhibida para favorecer los procesos celulares que están regulados por la otra (138,139). En células HaCaT se ha reportado que la activación de las MAPK induce la expresión de p21, que es necesaria para iniciar el arresto celular y posteriormente la diferenciación. Sumado a lo anterior también se demostró que las MAPKs inhiben a la vía de PI3K/Akt para favorecer el arresto celular y la diferenciación (140). Por otro lado, se sabe que el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) induce arresto celular en queratinocitos, incluyendo a las células HaCaT. Se ha señalado que este mecanismo es dependiente de la activación de la vía de las MAPK, las cuales a su vez promueven la expresión de p21 (141). En contraste con nuestros datos, y como un posible mecanismo por el cual E5 atenúa la activación de ERK1/2, se ha reportado que E5 afecta de manera negativa la expresión del receptor de TGF- β tipo II, lo que repercute en la atenuación de las vías de señalización “rio abajo” del receptor, incluyendo a las MAPKs (142). Aunado a esto se ha observado que E5 inhibe a p21 y p27, sin embargo, el mecanismo no ha sido dilucidado, pero se ha sugerido que la proteína GRB2 juega un papel importante

(73,143). No obstante, recordemos que GRB2 es una proteína adaptadora necesaria para iniciar la vía de señalización de las MAPKs a través del EGFR (89). Posiblemente GRB2 no juegue un papel en la inhibición de p21, y el efecto se deba a la inhibición de una de las proteínas de la vía de las MAPK en algún punto “rio abajo” de la proteína Ras. Para complementar nuestros resultados sería interesante medir el estado de activación de la vía de PI3K/Akt, ya que como mencionamos con anterioridad esta vía puede inhibir a la vía de las MAPK. Sumado a esto, estudios previos han demostrado que la vía de PI3K, impide la fase temprana de la diferenciación en queratinocitos humanos (112); “rio abajo” la activación de Akt promueve la auto-renovación de células troncales de la epidermis de ratón (113). Además, se ha demostrado en células de cáncer de pulmón, que Akt regula la expresión de Sox2, lo que resulta en un incremento de la auto-renovación de las células troncales de pulmón (144). Realizar estos ensayos de la activación de esta vía, proporcionaría un indicio de la posible vía por la cual EGFR está induciendo un incremento en la población troncal de células HaCaT E5 VPH-16.

La vía del EGFR a través de las MAPKs puede activar factores de transcripción de la familia AP-1, que incluyen a Jun y Fos, y pueden formar homodímeros o heterodímeros, para regular múltiples funciones tejido específicas (145). Los genes de la familia *jun* (*c-jun*, *junB*, *junD*) son genes de respuesta temprana de la vía del EGFR, y se ha reportado que su expresión constante contribuye a la progresión de la carcinogénesis en múltiples tejidos (146). Dado que *junB* es un gen de respuesta temprana decidimos analizar el estado de activación de la vía midiendo sus niveles de expresión (Figura 17). Los resultados muestran que en las células HaCaT y HaCaT LacZ- α . JunB se expresa más abundantemente cuando las células son estimuladas con SFB, y sus niveles disminuyen cuando únicamente se estimulan con EGF o son privadas de suero. Estos resultados eran esperados puesto que JunB es regulado por múltiples factores y vías de señalización, las cuales pueden ser activadas por múltiples ligandos que posiblemente contiene el SFB (146). Sin embargo, observamos una disminución en la expresión de *junB* en células HaCaT E5 VPH-16 cuando son estimuladas por SFB y cuando son privadas de suero. Además, interesantemente encontramos una expresión muy incrementada cuando las células

son estimuladas con EGF, comparadas con las estimuladas con SFB y SFM. Estos resultados son consistentes con el perfil de activación de ERK1/2 en estas mismas células, lo que indica que efectivamente se está sobre-activando una cascada de señalización que va de EGFR→MAPKs→JunB. Además, correlaciona con lo reportado por Chen, *et al* 1996, en donde demuestran que E5 de VPH-16 incrementa la expresión de *c-jun* y *junB*, en queratinocitos humanos cultivados con SFB y EGF (143).

Nuestros resultados indican un incremento de la expresión de JunB en células HaCaT E5 VPH-16 estimuladas con EGF. El factor de transcripción JunB se ha reportado como un inductor de la diferenciación y arresto celular (147). No obstante, se ha reportado que E5 promueve la expresión de JunB, c-Jun y c-Fos; JunB induce la expresión de p21, pero c-Jun y c-Fos promueven la progresión del ciclo celular. Aunado a esto E5 puede atenuar los niveles de expresión de p21, lo que permite abatir el efecto de JunB, e inducir mitogénesis por la activación de factores de transcripción de la familia AP-1 (148). Por otro lado, se ha demostrado que estos factores de transcripción son potenciadores de la región promotora de VPH-16, y se ha sugerido que este mecanismo mediado por E5 podría jugar un papel muy importante en el ciclo replicativo del virus (149).

Una observación interesante en nuestro trabajo fue la fosforilación constante del EGFR en las células HaCaT. Una posible explicación es la activación autócrina por medio de la producción de los ligandos de este receptor. Sin embargo, las células HaCaT expresan a los receptores ErbB1 (EGFR), ErbB2 y ErbB3 y se ha demostrado que pueden formar todas las combinaciones posibles de heterodímeros (117). Estas combinaciones sugieren que puede existir activación cruzada entre los receptores. Realizamos ensayos en donde inhibimos a la tirosina cinasa del EGFR mediante el fármaco AG1478 utilizando inicialmente la concentración más reportada en la literatura para células HaCaT de 10μM (150–152), sin embargo, no observamos ningún cambio en la fosforilación pero sí efectos muy drásticos en una disminución en la tasa de proliferación celular, lo que nos sugirió que el inhibidor estaba actuando a nivel fisiológico pero por alguna razón no a nivel molecular (datos no mostrados).

Sin embargo, utilizando concentraciones más altas del inhibidor se observó una inhibición de la fosforilación a partir de 100 μ M (Figura 18). Una explicación posible, es la transactivación del EGFR por ErbB2 y ErbB3, que sumada a la activación autócrina por otros ligandos (117), puede dificultar la inhibición de la fosforilación por el inhibidor. Aunado a lo anterior, se sabe que la formación de heterodímeros reduce la sensibilidad de ambos receptores hacia su ligandos (117). Esto se complementa con el hecho de que no logramos observar cambios en las células HaCaT y HaCaT LacZ, posiblemente debido a esta pérdida de afinidad por la formación de heterodímeros. No obstante, logramos observar cambios en la línea celular HaCaT E5 VPH-16 cuando son estimuladas con EGF, que es el ligando de mayor afinidad al EGFR (153), este incremento sugiere que E5 preferentemente actúa sobre el reciclamiento de homodímeros y afecta principalmente al EGFR.

Por último, se ha demostrado que la proteína E5 de VPH-16 puede modificar la actividad de la vía del EGFR. Esta vía juega un papel medular en la homeostasis del epitelio. Por lo que era de esperarse que E5 pudiera modificar las subpoblaciones de la línea celular HaCaT. Nuestros resultados sugieren un panorama celular, en donde E5 puede incrementar la auto-renovación de las células troncales, mediante la posible activación de la vía de PI3K/Akt, la cual está estrechamente relacionada con la inhibición de la diferenciación temprana y la auto-renovación (112,113). Además, se ha reportado que esta vía puede inhibir a la vía de las MAPKs (139), la cual es necesaria para el inicio de la diferenciación temprana (140). Sumado a lo anterior, la vía de las MAPKs induce la expresión del gen *junB*, el cual puede estimular la acción de p21 e iniciar un arresto celular(148), sin embargo, E5 induce la expresión de *c-jun* el cual puede suprimir la expresión de *p21*(143). Para finalizar, estos mecanismos se ven favorecidos en nuestro modelo experimental (células HaCaT), por la activación constante del EGFR. Esta activación probablemente se deba a la activación autócrina del EGFR, mediante la generación de ligando como el TGF- α ; la formación de heterodímeros puede dar lugar a la activación del EGFR por otros ligandos (117), por lo que puede ser un mecanismo por el cual las células HaCaT mantienen activa la vía de manera constante. En la Figura 19 se muestra un modelo, el cual representa los

mecanismos moleculares mencionados que pueden estar involucrados en el incremento de la subpoblación troncal de las células HaCaT.

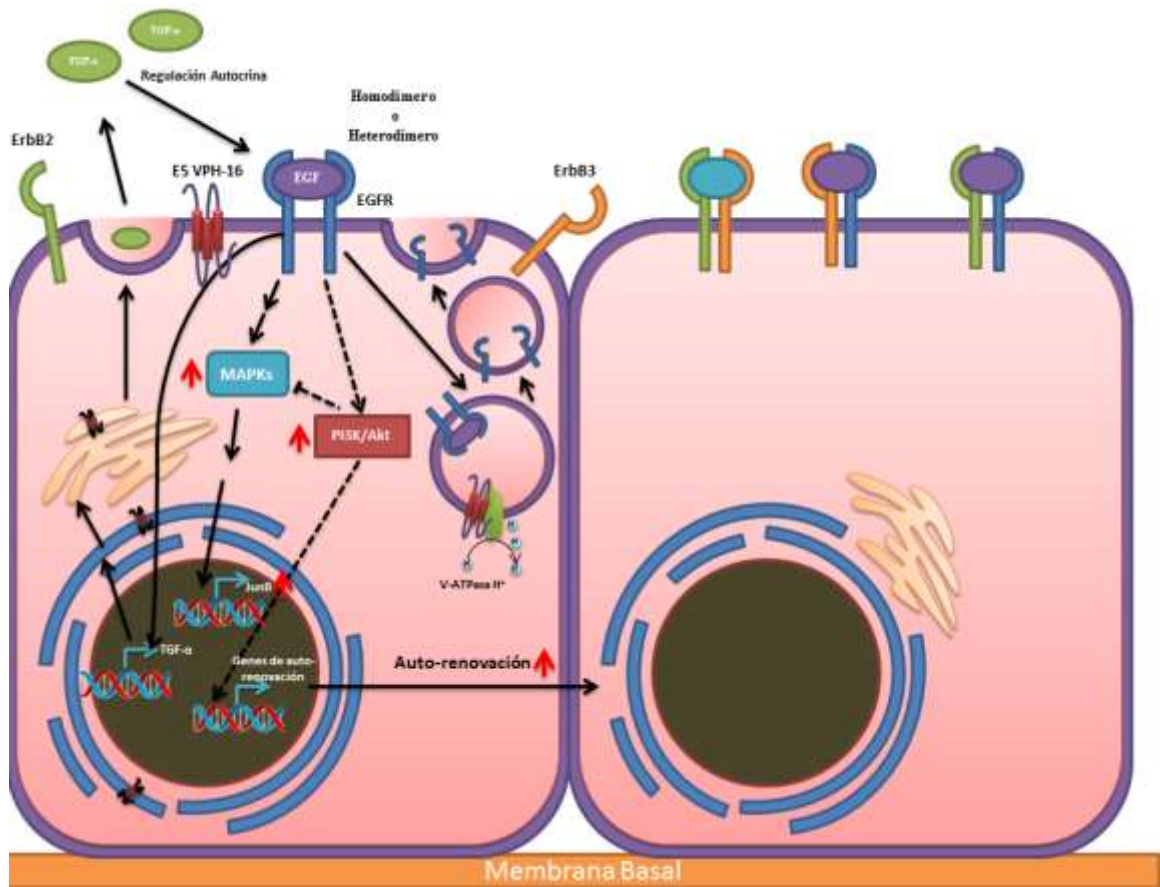


Figura 19. Posible mecanismo por el cual la proteína E5 del virus del papiloma humano tipo 16 afecta la vía de señalización del EGFR y modifica las subpoblaciones de la línea celular HaCaT.

11 CONCLUSIONES

Se evidenció que la expresión de la proteína E5 del VPH-16 en la línea celular de queratinocitos inmortalizados HaCaT, puede modificar la abundancia relativa de las subpoblaciones celulares. Aunado a esto se demostró que este efecto está regulado directamente por la vía del EGFR.

Se demostró que la activación de la vía de las MAPKs se encuentra atenuada en las células que expresan E5. Es posible que la vía de PI3K/Akt esté regulando negativamente la vía de las MAPKs, y de esa manera favorecer la auto-renovación, ya que se ha observado que la vía de la PI3K/Akt está más involucrada en la auto-renovación de queratinocitos.

Se demostró que en la línea celular HaCaT existe una fosforilación persistente del EGFR. Sin embargo, el mecanismo por el cual ocurre esto es desconocido. Especulamos que posiblemente se deba a la activación autócrina del EGFR, puesto que se ha reportado que las células HaCaT son capaces de sintetizar otros ligandos. Sin embargo, las altas concentraciones de inhibidor utilizadas, sugieren que existe una transactivación por la formación de heterodímeros de EGFR.

En nuestro grupo de investigación, Reveles Espinoza observó un aumento relativo de la subpoblación troncal de células HaCaT que expresan E5 de VPH-16, mucho mayor que el observado en este trabajo. No obstante las condiciones de cultivo son diferentes a las ocupadas en este trabajo, ya que se utilizó suero fetal bovino, el cual contiene diversos factores de crecimiento. Por lo que es posible que existan otras vías de señalización involucradas en el mantenimiento de células troncales, que estén siendo afectadas por la proteína E5.

12 PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos de este trabajo demuestran que la proteína E5 puede modificar las subpoblaciones de la línea celular HaCaT mediante la sobreactivación de la vía del EGFR. El mecanismo por el cual E5 incrementa esta vía es inhibiendo a la enzima V-ATPasa H^+ , la cual está encargada de acidificar los endosomas. Esta inhibición promueve el reciclamiento del EGFR a la superficie de la célula y de esta manera se potencia la vía. Sin embargo, este mecanismo no es específico del EGFR; la V-ATPasa H^+ se encarga de acidificar los endosomas de múltiples proteínas de superficie, entre ellos el receptor de Notch y Wnt/ β -Catenina. Estos receptores juegan un papel fundamental en el mantenimiento de las células troncales de muchos tejidos. De acuerdo con nuestros resultados la vía del EGFR, no es la única que puede estar induciendo auto-renovación. Es posible que E5 esté afectando más vías de señalización involucradas en el mantenimiento de la homeostasis, como las vías Wnt/ β -Catenina y Notch. Por lo que sería muy interesante estudiar si E5 está modificando la expresión de otras vías de señalización que cooperen con la vía del EGFR en los procesos de auto-renovación.

Las células troncales salen de su reposo bajo ciertos estímulos, por lo cual el nicho en donde se encuentran es muy importante. Nuestros estudios se realizaron con la línea celular HaCaT, por lo que no es posible estudiar la influencia del nicho de las células troncales, en el proceso de auto-renovación. Un estudio en un modelo animal permitiría estudiar mejor el efecto de la proteína E5 en la subpoblación celular. Estos estudios proporcionarían un panorama más amplio sobre los mecanismos moleculares y celulares, por lo cuales esta proteína puede desequilibrar la homeostasis del epitelio y cooperar en los procesos de carcinogénesis inducidos por VPH.

13 APÉNDICE

Dulbecco's PBS (Phosphate Buffered Saline)

NaCl	136.9mM
KCl	2.67mM
NaH ₂ PO ₄	1.47mM
KH ₂ PO ₄	1.47mM

Ajustar el pH a 7.4

TBS (Tris Buffered Saline)

Tris-HCl	50mM
NaH ₂ PO ₄	150mM

Ajustar el pH a 7.6

Buffer de lisis (Modified Bolen RIPA)

Mops	20mM
NaCl	150mM
EDTA	1.0mM
NonidetP-40	1.0%
Na-Deoxicolato	1.0%
SDS	0.1%

Ajustar el pH a 7.4

Buffer de carga (Laemmli Loading Buffer)

Glicerol	20%
SDS	2%
Azul Bromofenol	0.0025%
SGB 4X	25%
β – Mercapto.	5%

Buffer de Corrida (Laemmli Electrophoresis Running Buffer)

Glicina	191.8mM
Tris-Base	24.7mM
SDS	0.1%

El pH debe ser cercano a 8.3, no ajustarlo.

Buffer de transferencia

Glicina	191.8mM
Tris-HCl	24.7mM
Metanol	20%

RGB4X (Running Gel Buffer)

Tris Base	150mM
SDS	0.4%

Ajustar el pH a 8.8

SGB4X (Stacking Gel Buffer)

Tris Base	50mM
SDS	0.4%

Ajustar el pH a 6.8

PBS (+) Citometría

- PBS 1X
- 2% SFB
- 10mM HEPES

Solución de Bloqueo

- PBS 1X
- 2% de albumina sérica bovina (BSA)
- 2% SFB

Solución de Marcaje

- PBS 1X
- 1% de BSA

Solución de Azul de Tripano

- PBS 1X
- 0.4% Azul de Tripano

14 BIBLIOGRAFÍA

1. De Villiers E-M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* [Internet]. 2013 Oct;445(1-2):2-10. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682213002456>
2. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2007 Jan [cited 2014 May 13];7(1):11-22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17186016>
3. Cubie H a. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology* [Internet]. Elsevier; 2013 Oct [cited 2014 May 23];445(1-2):21-34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23932731>
4. Note WHO. Comprehensive cervical cancer prevention and control : a healthier future for girls and women.
5. Asia W, Europe W. Cervical Cancer Estimated Incidence , Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. 2014;1-5.
6. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* [Internet]. 2006 Aug 31 [cited 2014 May 23];24 Suppl 3:S3/1-10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949995>
7. Lazarczyk M, Cassonnet P, Pons C, Jacob Y, Favre M. The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2009 Jun [cited 2014 May 13];73(2):348-70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2698414&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
8. Faridi R, Zahra A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virol J* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011 Jan [cited 2014 May 13];8(1):269. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3118362&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
9. Stubenrauch F, Laimins L a. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol*. 1999;9(6):379-86.
10. López J, Ruíz G, Organista-Nava J, Gariglio P, García-Carrancá A. Human papillomavirus infections and cancer stem cells of tumors from the uterine cervix. *Open Virol J* [Internet]. 2012 Jan;6:232-40. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3547319&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
11. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog*. 2009;5(2).

12. Fuchs E. Skin stem cells: Rising to the surface. *J Cell Biol.* 2008;180(2):273–84.
13. Potten CS. The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. *Cell Tissue Kinet.* 1974;7(1):77–88.
14. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 1987 Apr 1 [cited 2014 Dec 15];84(8):2302–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/content/long/84/8/2302>
15. Terskikh V V. *Epidermal Stem Cells.* 2001;28(6):624–9.
16. Potten CS, Booth C. Keratinocyte stem cells: a commentary. *J Invest Dermatol [Internet].* 2002 Oct;119(4):888–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12406335>
17. Alcolea MP, Jones PH. Lineage analysis of epidermal stem cells. *Cold Spring Harb Perspect Med [Internet].* 2014 Jan [cited 2014 Sep 22];4(1):a015206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384814>
18. Ito K, Suda T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol [Internet].* 2014 Mar 21 [cited 2014 Apr 28];15(4):243–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24651542>
19. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature.* 2006;441(7097):1068–74.
20. Bongso A, Richards M. History and perspective of stem cell research. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol [Internet].* 2004 Dec [cited 2014 Jun 17];18(6):827–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15582541>
21. Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer [Internet].* Nature Publishing Group; 2013 Oct [cited 2014 Jul 13];13(10):727–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24060864>
22. Tani H, Morris RJ, Kaur P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 2000 Sep 26;97(20):10960–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.97.20.10960>
23. Morris RJ, Fischer SM, Slaga TJ. Evidence That a Slowly Cycling Subpopulation of Adult Murine Epidermal Cells Retains Carcinogen. 1986;3061–6.
24. I.C. Mackenzie and J.R. Bickenbach (Institute for Dental Research, college of Dentistry U of I. Label-retaining keratinocytes and Langerhans cells in mouse epithelial. *Cell Tissue Res.* 1985;242:551–6.
25. Morris RJ, Potten CS. Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells in vitro. *Cell Prolif.* 1994;27(5):279–89.

26. Senoo M, Pinto F, Crum CP, McKeon F. p63 Is Essential for the Proliferative Potential of Stem Cells in Stratified Epithelia. *Cell*. 2007;129(3):523–36.
27. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, et al. P63 Identifies Keratinocyte Stem Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 Mar 13;98(6):3156–61. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=30623&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
28. Reinisch CM, Uthman A, Erovic BM, Pammer J. Expression of BMI-1 in normal skin and inflammatory and neoplastic skin lesions. *J Cutan Pathol*. 2007;34(2):174–80.
29. Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*. 2004;118(5):635–48.
30. Bose A, Teh MT, Mackenzie IC, Waseem A. Keratin K15 as a biomarker of epidermal stem cells. *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):19385–98.
31. Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*. 1993;73(4):713–24.
32. Wan H, Yuan M, Simpson C, Allen K, Gavins FNE, Ikram MS, et al. Stem/progenitor cell-like properties of desmoglein 3dim cells in primary and immortalized keratinocyte lines. *Stem Cells*. 2007;25(5):1286–97.
33. Wan H, Stone MG, Simpson C, Reynolds LE, Marshall JF, Hart IR, et al. Desmosomal proteins, including desmoglein 3, serve as novel negative markers for epidermal stem cell-containing population of keratinocytes. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 20):4239–48.
34. Li a, Simmons PJ, Kaur P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(7):3902–7.
35. Kaur P, Li a. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2000 Mar;114(3):413–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10692098>
36. Schlüter H, Paquet-Fifield S, Gangatirkar P, Li J, Kaur P. Functional characterization of quiescent keratinocyte stem cells and their progeny reveals a hierarchical organization in human skin epidermis. *Stem Cells*. 2011;29(8):1256–68.
37. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* [Internet]. 2005 Mar [cited 2014 May 26];32 Suppl 1:S7–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753007>

38. Sonnex C. Human papillomavirus infection with particular reference to genital disease. *J Clin Pathol*. 1998;51(9):643–8.
39. Raff AB, Woodham AW, Raff LM, Skeate JG, Yan L, Da Silva DM, et al. The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *J Virol* [Internet]. 2013;87(11):6062–72. Available from: <http://jvi.asm.org/content/87/11/6062.long>
40. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Nov 20 [cited 2014 May 26];30 Suppl 5:F55–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199966>
41. Johansson C, Schwartz S. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2013 Apr [cited 2014 Jun 8];11(4):239–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23474685>
42. Pedroza-saavedra A, Plett-torres T, Chihu-amparán L, Maldonado-gama M, González-jaimés AM, Esquivel-guadarrama F. Molecular Bases of Human Papillomavirus Pathogenesis in the Development of Cervical Cancer. *InTech*. 2012;249–90.
43. DiMaio D, Petti LM. The E5 proteins. *Virology* [Internet]. 2013 Oct [cited 2014 May 13];445(1-2):99–114. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23731971>
44. Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011 Jan [cited 2014 May 6];10(1):140. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3248866&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
45. Suprynowicz F a, Disbrow GL, Simic V, Schlegel R. Are transforming properties of the bovine papillomavirus E5 protein shared by E5 from high-risk human papillomavirus type 16? *Virology* [Internet]. 2005 Feb 5 [cited 2014 Jun 9];332(1):102–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15661144>
46. DiMaio D, Mattoon D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* [Internet]. 2001 Nov 26;20(54):7866–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11753669>
47. Drummond-Barbosa D a, Vaillancourt RR, Kazlauskas a, DiMaio D. Ligand-independent activation of the platelet-derived growth factor beta receptor: requirements for bovine papillomavirus E5-induced mitogenic signaling. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1995 May;15(5):2570–81. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=230487&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

48. Martin P, Vass WC, Schiller JT, Lowy DR, Velu TJ. The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1 receptors. *Cell*. 1989;59(1):21–32.
49. Goldstein DJ, Finbow ME, Andresson T, McLean P, Smith K, Bubb V, et al. Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16K component of vacuolar H(+)-ATPases. *Nature*. 1991. p. 347–9.
50. Cohen BD, Goldstein DJ, Rutledge L, Vass WC, Lowy DR, Schlegel R, et al. Transformation-specific interaction of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein with the platelet-derived growth factor receptor transmembrane domain and the epidermal growth factor receptor cytoplasmic domain. *J Virol*. 1993;67(9):5303–11.
51. Suprynowicz F a. E5 Oncoprotein Mutants Activate Phosphoinositide 3-Kinase Independently of Platelet-derived Growth Factor Receptor Activation. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Feb 18 [cited 2014 Aug 6];275(7):5111–9. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.275.7.5111>
52. Schapiro F, Sparkowski J, Adduci a, Suprynowicz F, Schlegel R, Grinstein S. Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein. *J Cell Biol* [Internet]. 2000 Jan 24;148(2):305–15. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2174292&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
53. Kmgdom U, September R. DNA Sequence of the HPV-16 E5 ORF and the Structural. 1988;246:243–6.
54. Yang D-H, Wildeman AG, Sharom FJ. Overexpression, purification, and structural analysis of the hydrophobic E5 protein from human papillomavirus type 16. *Protein Expr Purif* [Internet]. 2003 Jul [cited 2014 May 13];30(1):1–10. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592803000494>
55. Lewis C, Baro MF, Marques M, Grüner M, Alonso A, Bravo IG. The first hydrophobic region of the HPV16 E5 protein determines protein cellular location and facilitates anchorage-independent growth. *Virology* [Internet]. 2008 Jan [cited 2014 Jun 9];5:30. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2266914&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
56. Gieswein CE, Sharom FJ, Wildeman AG. Oligomerization of the E5 protein of human papillomavirus type 16 occurs through multiple hydrophobic regions. *Virology* [Internet]. 2003 Sep [cited 2014 Aug 6];313(2):415–26. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682203002964>
57. Tsai T-C, Chen S-L. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol* [Internet]. 2003 Aug [cited 2014 Jul 24];148(8):1445–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12898324>
58. Leykauf K. Identification of membrane proteins differentially expressed in human papillomavirus type 16 E5-transfected human keratinocytes by nano-electrospray

- ionization mass spectrometry. *J Gen Virol* [Internet]. 2004 Jun 1 [cited 2014 Jun 9];85(6):1427–31. Available from:
<http://vir.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/vir.0.79844-0>
59. Bravo IG, Crusius K, Alonso a. The E5 protein of the human papillomavirus type 16 modulates composition and dynamics of membrane lipids in keratinocytes. *Arch Virol* [Internet]. 2005 Feb [cited 2014 Aug 6];150(2):231–46. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15503216>
 60. Kabsch K, Alonso A. The human papillomavirus type 16 (HPV-16) E5 protein sensitizes human keratinocytes to apoptosis induced by osmotic stress. 2002;16(October 2001):947–53.
 61. Campo MS, Graham S V, Cortese MS, Ashrafi GH, Araibi EH, Dornan ES, et al. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology* [Internet]. 2010 Nov 10 [cited 2014 Jul 17];407(1):137–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20813390>
 62. Oelze I, Kartenbeck J, Crusius K, Alonso a. Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line. *J Virol* [Internet]. 1995 Jul;69(7):4489–94. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=189191&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 63. Tomakidi P, Cheng H, Kohl a., Komposch G, Alonso a. Connexin 43 expression is downregulated in raft cultures of human keratinocytes expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2000 Jul 19 [cited 2014 Aug 6];301(2):323–7. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s004410000231>
 64. Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol* [Internet]. 1993 Aug;67(8):4521–32. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=237836&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 65. Straight SW, Tsao G, Sto MC, Schlegel R, Mccance DJ. SHORT COMMUNICATION The E5 Gene of HPV-16 Enhances Keratinocyte Immortalization by Full-Length DNA. 1996;254:251–4.
 66. Genter Williams SM, Disbrow GL, Schlegel R, Lee D, Threadgill DW, Lambert PF. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Aug 1 [cited 2014 Jul 24];65(15):6534–42. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16061632>
 67. Maufort JP, Shai A, Pitot H, Lambert PF. A Role for HPV 16 E5 in Cervical Carcinogenesis. 2011;70(7):2924–31.

68. Crusius K, Auvinen E, Steuer B, Gaissert H, Alonso a. The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT. *Exp Cell Res* [Internet]. 1998 May 25;241(1):76–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9633515>
69. Briggs MW, Adam JL, McCance DJ. The human papillomavirus type 16 E5 protein alters vacuolar H(+)-ATPase function and stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology* [Internet]. 2001 Feb 15 [cited 2014 Jul 19];280(2):169–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11162831>
70. Rodríguez MI, Finbow ME, Alonso a. Binding of human papillomavirus 16 E5 to the 16 kDa subunit c (proteolipid) of the vacuolar H+-ATPase can be dissociated from the E5-mediated epidermal growth factor receptor overactivation. *Oncogene* [Internet]. 2000 Aug 3;19(33):3727–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10949926>
71. Supryniewicz F a, Krawczyk E, Hebert JD, Sudarshan SR, Simic V, Kamonjoh CM, et al. The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein inhibits epidermal growth factor trafficking independently of endosome acidification. *J Virol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2014 Jul 21];84(20):10619–29. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2950579&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
72. Zhang B, Spandau DF, Roman A. E5 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Protects Human Foreskin Keratinocytes from UV B-Irradiation-Induced Apoptosis. *Oncogene* [Internet]. 2002;76(1):220–31.
73. Pedroza-Saavedra A, Lam EW-F, Esquivel-Guadarrama F, Gutierrez-Xicotencatl L. The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein synergizes with EGF-receptor signaling to enhance cell cycle progression and the down-regulation of p27(Kip1). *Virology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010 Apr 25 [cited 2014 Jun 9];400(1):44–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20144468>
74. Kim S-H, Juhn Y-S, Kang S, Park S-W, Sung M-W, Bang Y-J, et al. Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ ERK1,2 and PI3K/Akt. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2006 Apr [cited 2014 Jun 10];63(7-8):930–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16596339>
75. Sudarshan SR, Schlegel R, Liu X. The HPV-16 E5 protein represses expression of stress pathway genes XBP-1 and COX-2 in genital keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010 Sep 3 [cited 2014 Aug 6];399(4):617–22. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2934880&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
76. Kivi N, Greco D, Auvinen P, Auvinen E. Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene* [Internet]. 2008 Apr 17 [cited 2014 Jun 9];27(18):2532–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982485>

77. Hubbard SR, Miller WT. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(2):117–23.
78. Hunter, Tony(The molecula Biology and Virology Laboratory at the Salk Institute, San Diego C 92138. The epidermal growth factor receptor gene and its product. *Nat Publ Gr.* 1984;311:414–6.
79. Bogdan S, Klämbt C. Epidermal growth factor receptor signaling. *Curr Biol.* 10(8):292–5.
80. Levi-montalcini R, Cohen S. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. 2012;12(August):553–64.
81. Sweeney C, Iii KLC. Ligand discrimination by ErbB receptors : differential signaling through differential phosphorylation site usage. 2000;5568–73.
82. J. Downward, P. Parker & M.D. Waterfield (Departamento of Protein Chemistry, Imperial Cancer Research Fund, Lincolns Inn Fields, London WC2A 3PX U. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nat Publ Gr.* 1984;311:483–5.
83. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer : signalling mechanisms and therapeutic opportunities. 2001;37:3–8.
84. Scaltriti M, Baselga J. The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway : A Model for Targeted Therapy The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway : A Model for Targeted Therapy. 2006;5268–72.
85. Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol* [Internet]. 2004 Mar [cited 2015 Apr 13];58(3):903–13. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360301603020972>
86. Qi M, Elion E a. MAP kinase pathways. *J Cell Sci* [Internet]. 2005 Aug 15 [cited 2015 Jan 29];118(Pt 16):3569–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16105880>
87. Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2012 Nov;4(11):1–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3536342&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
88. Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer a. G, Li W, Margolis B, Lammers R, et al. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* [Internet]. 1992 Aug;70(3):431–42. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009286749290167B>
89. Batzer AG, Rotin D, Urena JM, Skolnik EY, Schlessinger J. Hierarchy of Binding Sites for Grb2 and Shc on the Epidermal Growth Factor Receptor. 1994;14(8):5192–201.

90. Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2007 Aug [cited 2015 May 3];1773(8):1161–76. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2758354&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
91. Woodgett JR. Recent advances in the protein kinase B signaling pathway. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2005 Apr [cited 2015 May 17];17(2):150–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15780591>
92. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2004 Apr [cited 2014 Oct 3];30(2):193–204. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15023437>
93. Scheid MP, Woodgett JR. Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett* [Internet]. 2003 Jul [cited 2015 May 6];546(1):108–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014579303005623>
94. Hanada M, Feng J, Hemmings B a. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2004 Mar 11 [cited 2015 May 15];1697(1-2):3–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15023346>
95. Hemmings B a, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2012 Sep;4(9):a011189. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3428770&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
96. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* [Internet]. 2002 May 31;296(5573):1655–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12040186>
97. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* [Internet]. 2002 May;14(5):381–95. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656801002716>
98. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* [Internet]. 2007 Jun 29 [cited 2014 Jul 16];129(7):1261–74. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2756685&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
99. Massie C, Mills IG. The developing role of receptors and adaptors. 2006;6(May):403–9.
100. Sigismund S, Woelk T, Puri C, Maspero E, Tacchetti C, Transidico P, et al. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. 2005;102(8).

101. Marmor MD, Yarden Y. Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Oncogene* [Internet]. 2004 Mar 15 [cited 2015 Jun 24];23(11):2057–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15021893>
102. Decker J. Epiderma Growth Factor and Transforming Growth Factor-alpha Induce Differential Processing of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;(30):615–21.
103. Henriksen L, Grandal MV, Knudsen SLJ, van Deurs B, Grøvdal LM. Internalization mechanisms of the epidermal growth factor receptor after activation with different ligands. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Oct 20];8(3):e58148. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3589378&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
104. Sigismund S, Argenzio E, Tosoni D, Cavallaro E, Polo S, Di Fiore PP. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev Cell* [Internet]. 2008 Aug [cited 2014 Sep 7];15(2):209–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18694561>
105. Aguilar C, Wendland B. Endocytosis of membrane receptors : Two pathways. 2005;102(8):2679–80.
106. Marshansky V, Rubinstein JL, Grüber G. Eukaryotic V-ATPase: Novel structural findings and functional insights. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;1837(6):857–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.01.018>
107. Xu Y, Parmar A, Roux E, Balbis A, Dumas V, Chevalier S, et al. Epidermal growth factor-induced vacuolar (H⁺)-ATPase assembly: A role in signaling via mTORC1 activation. *J Biol Chem*. 2012;287(31):26409–22.
108. Nanba D, Toki F, Barrandon Y, Higashiyama S. Recent advances in the epidermal growth factor receptor/ligand system biology on skin homeostasis and keratinocyte stem cell regulation. *J Dermatol Sci* [Internet]. Japanese Society for Investigative Dermatology; 2013 Nov [cited 2014 May 30];72(2):81–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23819985>
109. Espinoza AR. Datos no publicados. Centro de Investigacion y Estudios Avanzados; 2014.
110. Genter Williams SM, Disbrow GL, Schlegel R, Lee D, Threadgill DW, Lambert PF. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Aug 1 [cited 2014 Jun 10];65(15):6534–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16061632>
111. Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. 2012;13(March):195–204.

112. Sayama K, Yamasaki K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Ijuin T, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is a key regulator of early phase differentiation in keratinocytes. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Oct 25 [cited 2014 Jun 9];277(43):40390–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183446>
113. Murayama K, Kimura T, Tarutani M, Tomooka M, Hayashi R, Okabe M, et al. Akt activation induces epidermal hyperplasia and proliferation of epidermal progenitors. *Oncogene* [Internet]. 2007 Jul 19 [cited 2014 Jun 10];26(33):4882–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17297448>
114. Greco D, Kivi N, Qian K, Leivonen S-K, Auvinen P, Auvinen E. Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs. *PLoS One* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 May 13];6(7):e21646. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3128596&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
115. Nanba D, Toki F, Matsushita N, Matsushita S, Higashiyama S, Barrandon Y. Actin filament dynamics impacts keratinocyte stem cell maintenance. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2013 Apr [cited 2014 May 29];5(4):640–53. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3628097&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
116. Fusenig NE. Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized. 1988;106(March):761–71.
117. Marqués M, Martí N, Alonso A. EGFR family-mediated signal transduction in the human keratinocyte cell line HaCaT. *Exp Cell Res* [Internet]. 1999 [cited 2015 Feb 23];438:432–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482799946347>
118. Ramezani A, Hawley RG. Overview of the HIV-1 Lentiviral Vector System. *Curr Protoc Mol Biol*. 2002;Chapter 16:Unit 16.21.
119. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay M a. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2003 May [cited 2014 Jul 12];4(5):346–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12728277>
120. Park F. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiol Genomics* [Internet]. 2007 Oct 22 [cited 2015 May 29];31(2):159–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17684037>
121. Federico M. From Lentiviruses to Lentivirus Vectors. 229:3–15.
122. Bouard D, Alazard-Dany D, Cosset F-L. Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2009 May [cited 2015 Feb 6];157(2):153–65. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2629647&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

123. Biology B. Lentiviral Vectors Information and Biosafety Considerations. 2000;(Figure 1).
124. Borok Z, Harboe-schmidt JE, Steven L, Borok ZEA, Brody SL, You Y, et al. Vesicular Stomatitis Virus G-Pseudotyped Lentivirus Vectors Mediate Efficient Apical Transduction of Polarized Quiescent Primary Alveolar Epithelial Cells Vesicular Stomatitis Virus G-Pseudotyped Lentivirus Vectors Mediate Efficient Apical Transduction of. 2001;
125. Moosmann P, Rusconi S. Alpha complementation of LacZ in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(6):1171–2.
126. Watt FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1998;353(1370):831–7.
127. Green JGR & H. Epidermal growth factor and the multiplication of culture human epidermal keratinocytes. *Nature.* 1977;265:421–4.
128. Dominik Peus, Lyn Hamacher MRP. EGF-receptor tyrosine kinase inhibition induces keratinocyte growth arrest and terminal differentiation..pdf. *J Invest Dermatol.* 1997;109(6):751–6.
129. Gazel A, Blumenberg M. Transcriptional effects of inhibiting epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *Dermatologica Sin [Internet]. Elsevier;* 2013 Sep [cited 2015 Jan 20];31(3):107–19. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1027811712001048>
130. Ranieri D, Belleudi F, Magenta A, Torrisi MR. HPV16 E5 expression induces switching from FGFR2b to FGFR2c and epithelial-mesenchymal transition. *Int J Cancer [Internet].* 2015;137(1):61–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.29373>
131. Tomakidi P, Cheng H, Kohl a, Komposch G, Alonso a. Modulation of the epidermal growth factor receptor by the human papillomavirus type 16 E5 protein in raft cultures of human keratinocytes. *Eur J Cell Biol [Internet].* 2000 Jun;79(6):407–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10928456>
132. Burke P, Schooler K, Wiley HS. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Mol Biol Cell.* 2001;12(6):1897–910.
133. Partridge M, Green MR, Langdon JD, Feldmann M. Squamous Cell Carcinomas - Potential Autocrine Regulation of Normal and. 1989;548(January):542–8.
134. Guo L, Kozlosky CJ, Ericsson LH, Daniel TO, Cerretti DP, Johnson RS. Studies of ligand-induced site-specific phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *J Am Soc Mass Spectrom [Internet].* 2003 Sep [cited 2015 Feb 12];14(9):1022–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12954170>

135. Ebner R, Derynck R. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α : differential intracellular routing and processing of ligand-receptor complexes. 1991;2(August):599–612.
136. Coffey RJ, Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin a S, Moses HL, et al. Production and auto-induction of transforming growth factor- α in human keratinocytes. *Nature*. 1987;328(6133):817–20.
137. Gu Z, Matlashewski G. Effect of human papillomavirus type 16 oncogenes on MAP kinase activity . These include : Effect of Human Papillomavirus Type 16 Oncogenes on MAP Kinase Activity. 1995;69(12).
138. Menges CW, McCance DJ. Constitutive activation of the Raf-MAPK pathway causes negative feedback inhibition of Ras-PI3K-AKT and cellular arrest through the EphA2 receptor. *Oncogene*. 2008;27(20):2934–40.
139. Westbrook TF, Nguyen DX, Thrash BR, McCance DJ. E7 abolishes raf-induced arrest via mislocalization of p21(Cip1). *Mol Cell Biol*. 2002;22(20):7041–52.
140. Schmidt M, Goebeler M, Posern G, Feller SM, Seitz CS, Bröcker EB, et al. Ras-independent activation of the Raf/MEK/ERK pathway upon calcium-induced differentiation of keratinocytes. *J Biol Chem*. 2000;275(52):41011–7.
141. Hu PPC, Shen X, Huang D, Liu Y, Counter C, Wang XF. The MEK pathway is required for stimulation of p21(WAF1/CIP1) by transforming growth factor- β . *J Biol Chem*. 1999;274(50):35381–7.
142. French D, Belleudi F, Mauro MV, Mazzetta F, Raffa S, Fabiano V, et al. Expression of HPV16 E5 down-modulates the TGFbeta signaling pathway. *Mol Cancer* [Internet]. 2013 Jan;12:38. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3661392&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
143. S.-L. Chen, C.-H. Huang, T.-C. Tsai, K.-Y. Lu and Y-PT. The regulation mechanism of c-jun and junB by human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. *Arch Virol*. 1996;141:791–800.
144. Singh S, Trevino J, Bora-Singhal N, Coppola D, Haura E, Altiock S, et al. EGFR/Src/Akt signaling modulates Sox2 expression and self-renewal of stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* [Internet]. *Molecular Cancer*; 2012 Jan [cited 2014 Oct 20];11(1):73. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3497614&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
145. Connelly JT, Gautrot JE, Trappmann B, Tan DW-M, Donati G, Huck WTS, et al. Actin and serum response factor transduce physical cues from the microenvironment to regulate epidermal stem cell fate decisions. *Nat Cell Biol* [Internet]. *Nature Publishing Group*; 2010 Jul [cited 2015 Aug 3];12(7):711–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20581838>

146. Angel P, Szabowski a, Schorpp-Kistner M. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*. 2001;20(19):2413–23.
147. Han B, Rorke E a, Adhikary G, Chew YC, Xu W, Eckert RL. Suppression of AP1 transcription factor function in keratinocyte suppresses differentiation. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Aug 3];7(5):e36941. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3359321&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
148. Nath R, Mant C a, Kell B, Cason J, Bible JM. Analyses of variant human papillomavirus type-16 E5 proteins for their ability to induce mitogenesis of murine fibroblasts. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2006 Jan [cited 2015 Aug 3];6:19. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1569872&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
149. Bouvard V, Matlashewski G, Gu ZM, Storey a, Banks L. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology*. 1994. p. 73–80.
150. He Y-Y, Huang J-L, Gentry JB, Chignell CF. Epidermal growth factor receptor down-regulation induced by UVA in human keratinocytes does not require the receptor kinase activity. *J Biol Chem*. 2003;278(43):42457–65.
151. Lewis D a., Zweig B, Hurwitz S a., Spandau DF. Inhibition of erbB receptor family members protects HaCaT keratinocytes from ultraviolet-B-induced apoptosis. *J Invest Dermatol*. 2003;120(3):483–8.
152. Nakai K, Yoneda K, Hosokawa Y, Moriue T, Presland RB, Fallon PG, et al. Reduced expression of epidermal growth factor receptor, E-cadherin, and occludin in the skin of flaky tail mice is due to filaggrin and loricrin deficiencies. *Am J Pathol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;181(3):969–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.005>
153. Krall J a, Beyer EM, MacBeath G. High- and low-affinity epidermal growth factor receptor-ligand interactions activate distinct signaling pathways. *PLoS One* [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 Jan 23];6(1):e15945. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3018525&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>