



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

**“Estudio de la relevancia del estado del gen p53  
sobre los efectos regulatorios de E2 de VPH-16 en  
promotores celulares dependientes de TAF-1”**

**TESIS**

Que presenta

**QFB. IRMA ALEXANDRA LÓPEZ VÁZQUEZ**

Para obtener el grado de

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

Director de Tesis

**Dr. JOSÉ EFRAÍN GARRIDO GUERRERO**

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 fondos del proyecto 336396

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Efraín Garrido Guerrero**, por hacerme aceptado en su grupo de trabajo, ya que no hubiera podido trabajar en otra línea de investigación que no hubiera sido la de usted, muchas gracias por su apoyo, comprensión, paciencia, pero sobretodo por su confianza.

**Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega y al Dr. Federico Centeno Cruz**, por su tiempo, apoyo y dedicación en la realización de este trabajo.

**Al Biólogo Pedro Chavez**, por enseñarme de técnicas de Biología Molecular y de la vida, su experiencia y sabiduría es inmensa.

**Al Dr. Glustein Pozo y a la Dra. Janet Sánchez Ramos**, por todas sus enseñanzas, por compartir toda su experiencia y tiempo conmigo, sin ustedes esto no hubiera sido posible.

**A mis compañeros de Laboratorio**, Chío, Alice, Beto, Bianca, por todos esos buenos momentos que pase a su lado, por tantas risas, tantas platicas, tantos consejos, palabras de aliento, tazas de café, gracias por hacerme parte de esta gran familia.

**A mis grandes amigos de la Maestría**, Maya y Juan Carlos, por sus platicas consejos, por estar siempre al pendiente de mi, apoyándome, los quiero mucho y gracias por formar parte de mi vida.

**A Gaby Mora**, por todo su apoyo en la realización de los trámites requeridos a lo largo de mi estancia en la Maestría.

## DEDICATORIAS

**A mis Padres**, por permitirme alcanzar mis sueños en todo momento y siempre tener su apoyo incondicional, por su amor, por sus consejos, por darme a los mejores amigos que tengo, mis dos hermanos, los amo demasiado, no hubiera podido tener mejores padres que ustedes, sí existiera otra vida y pudiera elegir, los elegiría una y mil veces más.

**A mis Hermanos Carlos y Lalo –Ton**, por ser los mejores hermanos, los más lindos, amorosos e inteligentes, por ser mi gran ejemplo a seguir, por regalarme la hermosa experiencia de ser tía.

**A mi familia**, a todas y cada una de mis tías por todo su amor y apoyo; a mis primos por siempre estar al pendiente de mi; a mi cuñada Carmen porque a pesar de la distancia nunca me faltaron palabras de aliento y apoyo; a mi abuelita Oli por siempre darme su bendición; a mis sobrinos, pero en especial a mis dos grandes amores Lalito y Marco.

**A mis mejores Amigos**, Pado, Cardoso, Mari, Chino, Betito y Omarcin, porque a pesar de todo este tiempo lejos de ustedes siempre conté con su apoyo y comprensión, gracias por ser mis mejores amigos.

**A mi hermana-amiga-comadre More**, gracias por tanto amor, por estar siempre a mi lado, por ser la más comprensible, por soportarme por tanto tiempo, por ser la hermana que nunca tuve.

**Al amor de mi Vida Mau**, gracias chaparro por compartir tu vida a mi lado, por apoyarme en todas las decisiones de mi vida, por nunca soltar mi mano, por ser la persona que siempre me entenderá, por ser mi mejor amigo y el amor de mi vida, no existen palabras para describir lo hermosa que es la vida a tu lado. Te amo.

**Para mi Abuelito Elevi, con todo mi Amor**

## RESUMEN

El Virus del Papiloma Humano (VPH) está ligado directamente con la infección de las mucosas, siendo además el principal agente etiológico del cáncer cérvico-uterino. El genoma del VPH codifica para ocho proteínas esenciales que son necesarias para el progreso de su ciclo. Una de las proteínas cuya expresión comienza en etapas tempranas de la infección es E2; ésta proteína tiene múltiples funciones, ya que es necesaria para el mantenimiento del genoma del virus en la célula huésped, en la regulación de la expresión de sus genes y en la replicación viral. Adicionalmente a sus funciones sobre el ciclo replicativo viral, también se ha observado que su presencia en la célula modifica globalmente la expresión génica. Se han propuesto diversos mecanismos mediante los cuales E2 modifica las funciones celulares, pero de manera muy importante se considera la capacidad de la proteína para interactuar con una diversidad de factores celulares. Entre las proteínas celulares con las que E2 interactúa, destacan las involucradas en el proceso de Transcripción. Dentro de este grupo de proteínas celulares se encuentra la subunidad más grande de TFIID, TAF-1. En nuestro grupo de trabajo se observó que la presencia de E2 de VPH-16 en la célula, modifica la función de regulador transcripcional de TAF-1 a través de cambios sutiles en su unión a promotores, generando modificaciones en su expresión.

Considerando además que la proteína E2 de VPH16 también interactúa con la proteína supresora de tumor p53, resulta importante conocer si el estado de p53 en la célula (normal, mutada y ausente) tendría un efecto diferencial sobre la manera en que la expresión de genes dependientes de TAF-1, es modificada por la proteína E2 de VPH-16. Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de E2 provoca un incremento en la unión de TAF-1 a los promotores y una activación transcripcional en la mayoría de los genes en presencia de p53<sup>wt</sup> y, por el contrario, provoca una represión en ambientes en los que p53 se encuentra mutada p53<sup>mut</sup> o ausente. Sin embargo, en mayor medida, estos cambios no se correlacionan de manera proporcional con la unión de TAF-1, como se había observado en trabajos previos de nuestro grupo de trabajo, sugiriendo que a tiempos prolongados de expresión de E2 (mayores de 48h), otros mecanismos independientes a TAF-1, están involucrados en la regulación transcripcional de estos genes.

## ABSTRACT

The Human Papilloma Virus (HPV) is linked directly with the infection of the mucosal tissues, being also the main etiological agent of cervical cancer. HPV genome encodes eight essential proteins, which are necessary in the progress of its cycle. One of the proteins whose expression begins in early stages in the infection is E2; this protein contains multiple functions, due to its necessity for the maintenance of the genome of the virus in the host cell, regulation of the gene expression and viral replication. Besides their functions in the replicative viral cycle, also its presence in the cell globally change the gene expression. Different mechanisms have been proposed by which E2 modifies cell function, but in a very significant manner the protein capacity to interact with a diversity of cellular factors. Among this cellular protein group are very relevant those involved in the Transcription process. In this group of cellular proteins, the largest subunit of TFIID, TAF-1 is present.

Our working group reported that the presence of HPV-16 E2 in the cell, modifies the transcriptional regulator function of TAF-1, through subtle changes in its union to promoters, generating changes in their expression.

Considering also that the HPV-16 E2 protein interacts also with the tumor suppressor protein p53, it is very important to know whether the p53 status in the cell (normal, mutated and absent) would have a differential effect on the way that TAF-1 gene expression is modified by the HPV-16 E2 protein. The results obtained in this work showed that the presence of E2 caused an increase in the TAF-1 binding to the promoters and its transcriptional activation in most of the genes in the presence of p53<sup>wt</sup> and, conversely, provoked a repression in cellular environments, where p53 is mutated or absent. However, in a greater extent, these changes in expression do not correlate in a proportional way with the TAF-1 binding, as noted previously in our working group, suggesting that E2 expression for extended times (longer than 48 hours), additional TAF-1 independent mechanisms are involved in the transcriptional regulation of these genes.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Virus del Papiloma Humano (VPH).....	10
1.1.1 Generalidades.....	10
1.1.2 Cáncer Cérvico-Uterino.....	11
1.1.3 Características del Genoma del VPH y de sus productos proteicos...	12
1.1.4 El ciclo vital de VPH y la Progresión a Cáncer.....	13
1.2 Características de la Proteína E2.....	18
1.2.1 Importancia de las funciones de la Proteína E2 en el Ciclo de Vida de VPH.....	19
1.2.2 Relevancia de E2 en Funciones Celulares.....	20
1.2.3 Impacto de E2 sobre la Transcripción Celular.....	21
1.3 El Factor de Transcripción TAF-1.....	24
1.4 Propiedades y Funciones de p53.....	27
1.4.1 Generalidades de p53.....	27
2. ANTECEDENTES.....	31
3. JUSTIFICACIÓN.....	35
4. HIPÓTESIS.....	35
5. OBJETIVO GENERAL.....	36
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	36
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	37
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
8.1 Clonación de 3xHA-E216.....	38
8.1.1 Clonación en pGEM®-T Easy.....	39
8.1.2 Transformación de Bacterias JM109 y DH5 $\alpha$ .....	39
8.1.3 Selección de Colonias Candidatas por PCR y Extracción de DNA plasmídico.....	40
8.1.4 Purificación por Fenol/Cloroformo.....	41
8.1.5 Selección de Colonias Candidatas mediante Restricción Enzimática.....	41
8.1.6 Construcción del plásmido pSin-3xHA-EF2-Pur.....	41
8.1.7 Construcción del plásmido pTracer™-CMV/Bsd vector.....	42
8.2 Cultivos Celulares.....	44
8.3 Transfecciones Estables Celulares.....	45
8.4 Extracción de RNA de las líneas celulares.....	45
8.5 Síntesis de cDNA.....	46
8.6 Reacción de RT-PCR y PCR punto Final.....	46
8.7 Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP).....	47
8.8 PCR en Tiempo Real.....	49
8.9 Oligonucléotidos.....	50



9. RESULTADOS.....	51
9.1 Generación del Sistema Celular Estable 3xHA-E216.....	51
9.2 Efecto de la presencia de E2 de VPH-16 sobre la unión de TAF-1 en el promotor de HLA-A.....	55
9.3 Efecto de la presencia de E2 de VPH-16 sobre la unión de TAF-1 a promotores de genes involucrados en ciclo celular.....	57
9.4 Efecto de la presencia de E2 de VPH-16 sobre la unión de TAF-1 a promotores de genes involucrados en crecimiento celular y proliferación..	60
9.5 Efecto de la presencia de E2 de VPH-16 sobre genes regulados por TAF-1 y p53.....	63
9.6 Efecto de la presencia de E2 de VPH-16 sobre el gen Topoisomerasa I...	65
10. DISCUSIÓN .....	68
10.1 Análisis de la unión de TAF-1 en blancos transcripcionales de p53 en presencia de E2 de VPH-16.....	69
10.2 Análisis de la unión de TAF-1 en promotores carentes de elementos de respuesta a p53 en presencia de E2 de VPH-16.....	71
10.3 Análisis de la unión de TAF-1 al promotor de Ciclina A1 en presencia de E2 de VPH-16.....	72
10.4 Análisis de la unión de TAF-1 al promotor de Ciclina D1 en presencia de E2 de VPH-16.....	73
10.5 Genes en donde existe una correlación entre la unión de TAF-1 y su Expresión en un ambiente p53wt en presencia de E2 de VPH-16.....	74
10.6 Genes en donde existe una correlación entre la unión de TAF-1 y su Expresión en ambientes p53 mutado y ausente, en presencia de E2 de VPH-16.....	75
11. CONCLUSIONES.....	77
12. PERSPECTIVAS.....	78
13. BIBLIOGRAFÍA.....	79

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Virus del Papiloma Humano (VPH)

### 1.1.1 Generalidades

El Virus del Papiloma Humano (VPH) contiene un genoma de DNA circular, de doble cadena, de aproximadamente 8 kb; es un virus no envuelto que infecta a los queratinocitos de la capa basal de los epitelios.

Existen diferentes tipos de Papilomavirus los cuales se han dividido en 5 géneros con base en el análisis de su secuencia de DNA (Alfa, Beta, Gamma, Mu y Nu), y cada uno de ellos tiene algunas características particulares en su ciclo vital y se asocian a distintas enfermedades (Bernard et al. 2010; Bosch et al. 2008; Doorbar et al. 2012).

En humanos, los tipos de papilomavirus que causan papilomas visibles son generalmente los de mayor interés, especialmente cuando estos ocurren en sitios orales o genitales, o cuando se encuentran de forma persistente (Lacey, Lowndes & Shah 2006). Estos virus se adaptan a su huésped, y en muchas ocasiones pueden completar su ciclo vital y mantenerse en la población sin causar alguna enfermedad aparente (Ekström et al. 2011; Forslund 2007), por lo que se puede decir que existe un balance entre la replicación viral y la tolerancia inmune del huésped (Woolhouse & Gaunt 2007).

Durante su evolución, los VPHs se han adaptado a diferentes nichos epiteliales específicos (Gottschling et al. 2009) sin embargo, el tipo más estudiado es el Alfa ya que infecta mucosas y es uno de los principales agentes etiológicos del cáncer cérvico-uterino.

### 1.1.2 Cáncer Cérvico-Uterino

Según la OMS al menos 13 de los más de 100 genotipos de VPH conocidos pueden causar cáncer de cérvix, y se han asociado con otros tipos de cáncer como el anogenital, el de cabeza y cuello.

El Virus del Papiloma Humano se estima que causó por lo menos medio millón de casos y 250,000 muertes de cáncer cervical en 2012, de las cuales más del 80% ocurrieron en países en desarrollo.

Los 2 genotipos más comunes de “alto-riesgo”, VPH 16 y 18, causan aproximadamente el 70% de todos los cánceres de cérvix. Tras la infección, el virus existe como un episoma autónomo al núcleo de la célula huésped; sin embargo, en este tipo de cánceres, el genoma del VPH se encuentra comúnmente integrado en el genoma del huésped y expresa los dos oncogenes virales E6 y E7 (Johannsen & Lambert 2013).

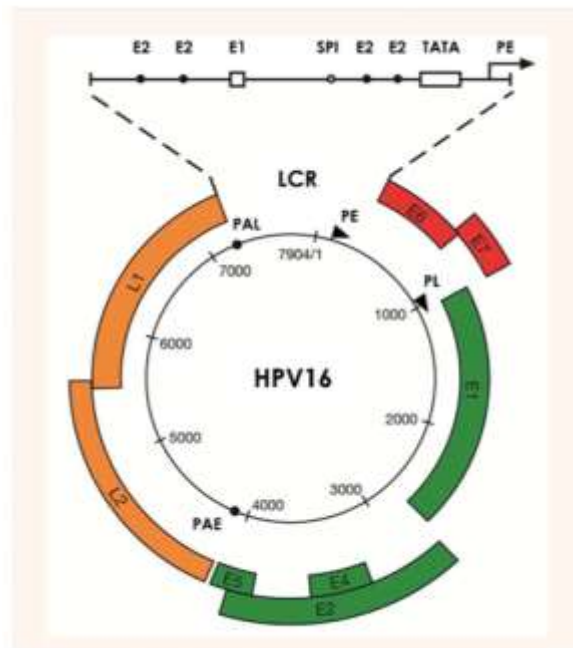
Por otro lado, los genotipos de “bajo-riesgo” VPH 6 y 11 causan verrugas genitales, lo cual es una condición benigna común de los genitales externos que causan morbilidad significativa.

El VPH es altamente transmisible, con una incidencia máxima poco después del inicio de la actividad sexual, y la mayoría de las personas adquieren la infección en algún momento de sus vidas (información tomada de la página Oficial de la OMS: [http://www.who.int/biologicals/areas/human\\_papillomavirus/en/](http://www.who.int/biologicals/areas/human_papillomavirus/en/)).

### 1.1.3 Características del Genoma del VPH y de sus productos proteicos

Los Virus de Papiloma Humano cuentan con un genoma de DNA el cual 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 (Muñoz N, et al. 2006; Lazarczyc et al. 2009), con aproximadamente 72 capsómeros y mide alrededor de 55nm de diámetro (Muñoz N, et al. 2006; Faridi R, et al. 2011).

Tanto la estructura como la función del genoma del VPH están, conservados en toda la familia Papillomaviridae (**Figura 1**) y están ampliamente divididos en tres componentes generales:



**Fig. 1** Organización genómica del VPH 16 (Doorbar et al. 2012).

1) La región de genes tempranos, denotado por la letra “E”, consiste de 6 marcos de lectura abiertos (ORFs, por sus siglas en inglés): E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Los genes tempranos codifican para proteínas no estructurales que funcionan en la replicación viral, en la adaptación al medio celular, en la transactivación de la transcripción viral, en la transformación celular y proliferación.

2) La región de genes tardíos, denotados por la letra “L”, consiste de los ORFs correspondientes a L1 y L2. Ambos genes codifican para proteínas estructurales, que son las proteínas mayores y menores de la cápside, respectivamente (Harari, Chen & Burk 2014).

3) La Región Larga de Control (LCR, por sus siglas en inglés), es una región no codificante que se encuentra entre el final del ORF L1 y el codón de inicio de E6, comprendiendo aproximadamente el 10% del genoma del virus (Harari, Chen & Burk 2014; Johannsen & Lambert 2013).

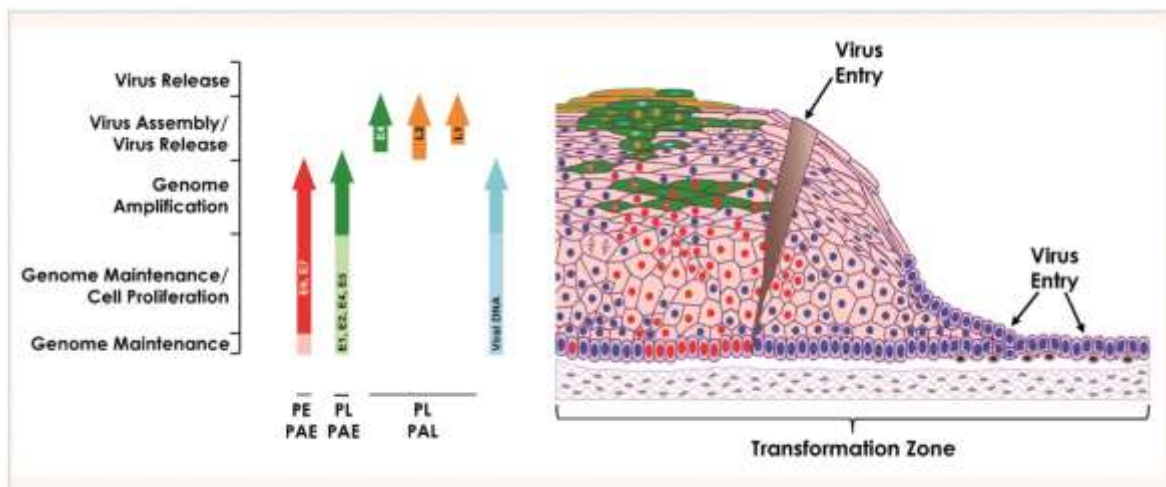
La LCR también contiene sitios de unión para factores de transcripción celular (por ejemplo, SP1, AP1, Oct1), así como para las proteínas virales E1 y E2 que controlan la replicación viral y la expresión génica (Harari, Chen & Burk 2014).

#### 1.1.4 El ciclo vital de VPH y la Progresión a Cáncer

El potencial maligno de algunos VPHs se debe probablemente a la adaptación del virus al nicho, como un proceso indeseable tanto para el virus como para el huésped.

El virus causa infecciones en el ectocérvix, y es en la zona de transformación donde se desarrolla la mayoría de los cánceres cervicales asociados a este virus (**Figura 2**) (Doorbar et al. 2012).

El ciclo de vida del VPH está estrechamente relacionado con la diferenciación del epitelio del huésped que infecta (Johannsen & Lambert 2013). En el epitelio estratificado de múltiples capas, como en el ectocervix, se piensa que la infección requiere de la presencia de micro-heridas que permitan el acceso de los viriones infecciosos a la capa basal (Schiller, Day, & Kines 2010). Las células basales infectadas forman un reservorio para la infección, y es en estas células en donde el genoma viral se mantiene de forma episomal en un número bajo de copias, se ha propuesto que el número de copias en la lámina basal de las lesiones es de alrededor de 200 copias por célula (Pyeon et al. 2009).



**Fig. 2|** Ciclo Viral del VPH Alto-Riesgo en el Epitelio Cervical (Doorbar et al. 2012).

A medida que las células se dividen, comienzan a producir células hijas que son empujadas hacia la superficie epitelial. Durante esta migración, se desencadenan diferentes eventos del ciclo de vida del virus.

Las primeras proteínas virales en expresarse son E1 y E2, estas son esenciales para la fase inicial de amplificación, pero también pueden ser necesarias para la replicación y mantenimiento episomal, una vez que el número de copias se haya establecido (Angeletti et al. 2002; Egawa et al. 2012).

La proteína E2, también regula la transcripción viral y tiene múltiples sitios de unión en la LCR viral, durante la replicación del DNA viral, recluta a la helicasa viral E1 a su motivo de unión en el origen de replicación viral. Se ha especulado que el uso de una helicasa de DNA viral, la cual es muy distinta a las helicasas de replicación celular (las proteínas MCM), permite que la replicación del DNA viral se realice de forma desconectada a la replicación del DNA celular, durante el establecimiento del genoma y la amplificación (Doorbar et al. 2012).

Además de E1 y E2, se piensa que las proteínas E4 y E5 contribuyen indirectamente a una amplificación exitosa del genoma mediante la modificación del ambiente celular.

La proteína E5 es de tipo transmembranal y atraviesa la membrana 3 veces, posee un C-terminal citoplasmático (Krawczyk et al. 2010) y se piensa que tiene la capacidad de formar poros, interferir con la apoptosis (Kabsch et al. 2004) y el tráfico intracelular de vesículas endocíticas (Supryniewicz et al. 2010). Se cree

también que contribuye de manera importante a una amplificación exitosa del genoma a través de su habilidad de estabilizar al Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFR). Además, la proteína E5 de los virus de alto-riesgo puede interferir con el procesamiento de las moléculas clásicas de MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) en la superficie celular, y compromete la presentación de los péptidos virales en la superficie de la célula epitelial infectada (Ashrafi et al. 2006).

Por otro lado E4 es una proteína viral que se acumula en altos niveles en las células que mantienen la síntesis viral (McIntosh et al. 2008) y es muy probable que su función primaria sea en muchos aspectos, la liberación o la transmisión del virus (Q. Wang et al. 2004), así como la optimización de la amplificación del genoma, todo esto ocurriendo indirectamente (Gulliksen et al. 2012).

Por otro lado, la expresión de las proteínas E6 y E7 en las capas epiteliales superiores permite a la célula infectada re-entrar a la fase S y así elevar el número de copias del genoma viral.

En cuanto a las proteínas E6 de alto-riesgo, éstas se caracterizan tanto por su capacidad de sobre-regular la actividad de la telomerasa (Galloway et al. 2005), y con esto mantener la integridad de los telómeros durante las repetidas divisiones celulares, así como su habilidad para mediar la degradación de p53 dentro de la célula. Tanto las proteínas de los virus de bajo- como de alto-riesgo inactivan aspectos funcionales de p53, lo cual sugiere una importante función en el ciclo celular; pero solamente son los tipos de alto-riesgo los que estimulan su ubiquitinación y degradación dependiente del proteosoma (Zanier et al. 2012).

Por otro lado, las diferencias funcionales de las proteínas E7 de alto y bajo-riesgo se centran en gran medida en su capacidad diferencial de asociarse con miembros de la familia de proteínas de Retinoblastoma (pRb) (Barrow-Laing, Chen & Roman 2010). Las proteínas E7 de los virus de alto-riesgo tienen la habilidad de estimular la inestabilidad genómica del huésped, particularmente a través de la desregulación del ciclo del centrosoma en las células basales que se encuentran proliferando (McLaughlin-Drubin & Münger 2009).

De hecho, los tipos de alto-riesgo usan vías de degradación que señalan muchos de sus sustratos. Para E7, se involucran los componentes del complejo de ubiquitin-ligasa CUL2, mientras que para E6 se involucra la E6AP ubiquitin-ligasa (Tomaić, Pim & Banks 2009).

Una vez incrementada la abundancia de las proteínas tempranas, en especial E1 y E2, se sobre-regula el promotor tardío o dependiente de diferenciación (Bodily & Laimins 2011). Por lo tanto la célula epitelial que soporta la amplificación genómica viral está sujeta a señales de diferenciación y pueden expresar marcadores bien definidos de diferenciación, mientras que al mismo tiempo expresan marcadores de entrada al ciclo celular (Banerjee et al. 2011).

En cuanto se inicia la transcripción por parte del promotor tardío, se producen las proteínas involucradas en la encapsidación.

La encapsidación del genoma involucra la expresión de L1, el ensamblaje de la cápside icosaédrica en el núcleo y posteriormente el reclutamiento de L2 a las regiones de replicación a través de E2 (Holmgren et al. 2005). La maduración del virus ocurre en lo más superficial, en queratinocitos altamente diferenciados, los cuales pierden su capacidad de fosforilación mitocondrial oxidativa, por lo que el ambiente cambia de reducido a oxidado, lo que trae como consecuencia la liberación del virus. Esto permite que la acumulación progresiva de puentes disulfuro entre las proteínas L1 conlleven a la producción de viriones infecciosos altamente estables (Buck et al. 2005).

El ciclo vital productivo del virus es exclusivamente intraepitelial, no existe viremia, no hay citólisis inducida por los virus o muerte celular, y tanto la replicación como la liberación no se asocia con la inflamación (Stanley 2012).

En lesiones causadas por VPH de alto-riesgo, como es el caso de VPH-16, las células de las capas inferiores expresan E6 y E7, y son guiadas a través del ciclo celular y estimuladas para dividirse. En las capas intermedias, se expresan niveles elevados de las proteínas necesarias para la amplificación del genoma, permitiendo que ésta ocurra. Estas células expresan la proteína viral E4 y se encuentran normalmente en las fases S y G2 del ciclo celular. En las capas epiteliales superiores, las células permiten la transición del ciclo celular, y en un



subconjunto de éstas se producen las proteínas virales L2 y L1, permitiendo el empaquetamiento de los genomas virales amplificados.

Sin embargo; las lesiones de alto-riesgo son infecciones abortivas, en las cuales se perturban los patrones de expresión de genes tempranos normales (Middleton et al. 2003). Un ejemplo típico de esto es la desregulación de la expresión de los genes que codifican para las proteínas E6 y E7, y esto trae como consecuencia directa la acumulación de errores genéticos en las células infectadas, y la eventual integración de los episomas virales en el cromosoma de la célula huésped; todo esto se ha observado en diferentes cánceres cervicales (Thorland et al. 2003).

En diferentes estudios también se ha observado, primordialmente en VPH de alto-riesgo (VPH16), que el estado de la metilación del genoma viral cambia no solamente en el contexto del ciclo de vida viral sino también en el contexto de la enfermedad neoplásica progresiva que culmina en cáncer (Johannsen & Lambert 2013).

## 1.2 Características de la Proteína E2

La proteína E2 tienen una función crucial en el ciclo de vida del VPH, siendo una proteína de unión al DNA multifuncional y un factor de transcripción prototípico, con un dominio conservado de transactivación N-terminal (TAD) de aproximadamente 200 aminoácidos, que juegan un papel muy importante en la activación transcripcional, la represión y la replicación. También cuenta con un dominio conservado C-terminal de unión al DNA (DBD) de aproximadamente 85-100 aminoácidos, que permite una dimerización estable de la proteína.

Ambos dominios se encuentran separados por una región denominada *Bisagra*, la cual es variable entre las proteínas E2 de los diferentes VPHs; esta región es no estructurada y forma una unión flexible entre el TAD y el DBD (Giri & Yaniv, 1988)

### **Figura 3.**

E2 del virus del Papiloma Humano tiene una importante función regulatoria en la transcripción viral (Giri & Yaniv 1988), en la replicación, el mantenimiento del genoma, así como en la correcta segregación del virus a las células hijas durante la mitosis (Blachon & Demeret 2003).



**Fig. 3|** Estructura Tridimensional de la proteína E2 de VPH-16 representando los tres Dominios: El Dominio de Transactivación en la parte N-terminal (TAD); el Dominio no estructurado de Bisagra en el centro, y el Dominio de Unión a DNA en la parte del C-terminal (DBD) (Muller & Demeret 2012).

E2 se encuentra normalmente como homodímero, y es así como se une a sus secuencias consenso o mejor conocidas como “Sitios de Unión a E2” (E2BSs) en la Región Larga de Control (LCR).

El sitio de unión de la proteína E2 es una secuencia palindrómica de 12-pb, ACCN<sub>6</sub>GGT, la cual está presente en múltiples copias en el genoma de los Papilomavirus (Androphy, Lowy & Schiller 1987).

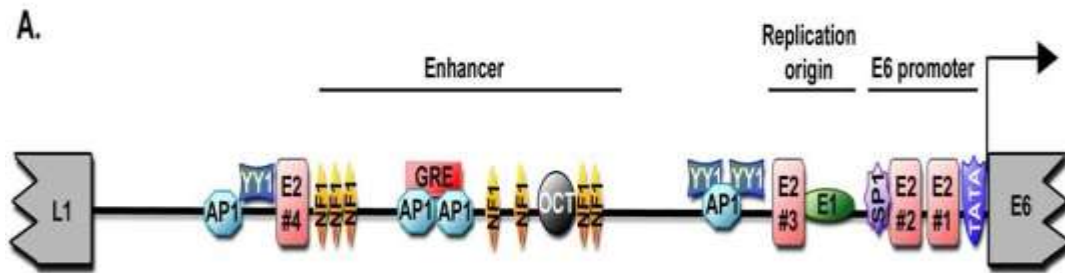
En general, las proteínas E2 tienen un tiempo de vida media corto. Su mecanismo de degradación es principalmente mediante el proteosoma a través de su Dominio N-Terminal y muchas proteínas E2 pueden ser estabilizadas por la asociación de este dominio con una proteína celular; por ejemplo, mediante su unión con Brd4 o Tax1BP1.

### **1.2.1 Importancia de las funciones de la Proteína E2 en el Ciclo de Vida de VPH**

En la LCR del genoma viral existe un promotor temprano, un origen de replicación, un potenciador o *enhancer upstream*, una Región No Traducida Tardía 3' (3'UTR) y varios sitios de poliadenilación. Los VPHs de tipo mucoso contienen cuatro E2BSs en su LCR, dos se encuentran próximos al promotor temprano, otro se localiza en el origen de replicación de DNA y el último de los cuatro se encuentra en la Región Enhancer **Figura 4**.

Cuando E2 se une a E2BSs distales al promotor dentro de la LCR se activa la transcripción, sin embargo cuando la unión se lleva a cabo en sitios proximales al promotor ocurre el efecto contrario, la represión de la transcripción (Lee & Chiang 2009; Thierry 2009). Este comportamiento se debe principalmente a que, al unirse, impide la unión de factores de transcripción como lo son Sp1 y TFIID/TBP a sus secuencias y por lo tanto no se puede llevar a cabo el correcto Ensamblaje del Complejo de Iniciación de la Transcripción (PIC).

Diversos estudios han demostrado que además del mecanismo anteriormente descrito, E2 puede reprimir la transcripción mediante maneras distintas, como son el reclutamiento de factores que remodelan la cromatina, la competición a sus sitios de unión o por medio del reclutamiento de complejos represores.



**Fig. 4|** Mapa Esquemático de la Región Larga de Control de VPH tipo (Muller & Demeret 2012). Por otro lado, la proteína E2 también participa en la replicación del genoma viral. Existen tres formas de replicación en el ciclo de vida de los Papillomavirus. La primera es una amplificación limitada del genoma, la cual ocurre cuando recién entra una partícula viral en la célula huésped. La segunda fase comprende cuando el genoma viral es mantenido en un número de copias constante en las células basales proliferativas de una lesión (papiloma), esta requiere tanto de una división celular como de una replicación del genoma. En la tercera fase, los genomas son amplificados en las células diferenciadas para producir progenie viral. El origen de replicación contiene un sitio de unión E1, una región rica en A/T y al menos un sitio de unión a E2. Al unirse E2 a su sitio aumenta la especificidad y afinidad de la proteína E1 por el origen de replicación, para así formar el Complejo de Inicio de la Replicación (Kuo et al. 1994; Stenlund 2003).

Otra de las funciones de E2 es unir los genomas virales a través de sus sitios de unión en los cromosomas de la célula huésped durante la mitosis para facilitar la retención, el mantenimiento y segregación del genoma viral (Bastien & McBride, 2000). Uno de los blancos de enlace de E2 en los cromosomas mitóticos, es la proteína adaptadora de cromatina, Brd4 (Ilves et al., 2006).

### 1.2.2 Relevancia de E2 en Funciones Celulares

Se ha observado que la expresión de E2 inhibe el crecimiento tanto en líneas celulares VPH positivas, como en células VPH negativas. Sin embargo, se ha observado que algunas líneas (CHO, CV1, C-33A, U2OS) son capaces de tolerar bajos niveles de expresión de E2. El mecanismo por el cual E2 induce arresto en el crecimiento y senescencia en las células positivas a VPH, es mediante la

represión del promotor viral temprano, provocando una baja regulación de la expresión de E6 y E7. Muchas de las células cancerígenas positivas a VPH, como es el caso de HeLa, son dependientes de estos oncogenes virales para su crecimiento sostenido (Goodwin & DiMaio, 2000).

El mecanismo por el cual E2 induce apoptosis en células VPH negativas es más controversial ya que involucra vías dependientes e independientes de p53, así como la interacción de E2 con la Caspasa 8 (Bellanger, et al., 2011).

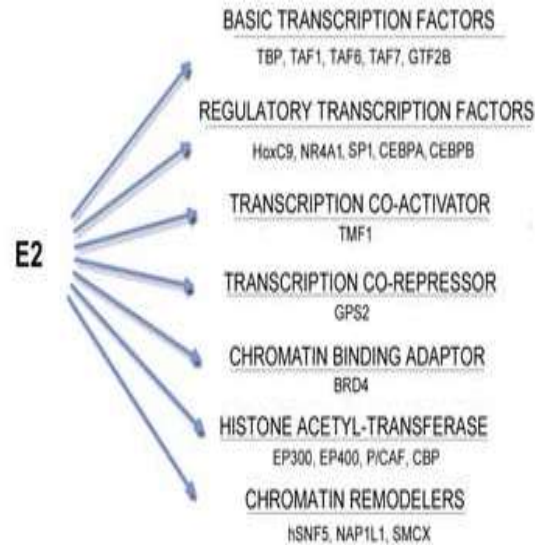
Sin embargo, en keratinocitos que han sido capaces de sobrevivir a la expresión de E2, se ha observado un fenotipo de células diferenciadas, sugiriendo que E2 puede actuar para promover funciones virales tardías (Burns et al., 2010).

La proteína E2 ejerce sus diferentes funciones mediante dos mecanismos generales: su unión directa a sitios particulares en el genoma viral, o mediante el reclutamiento de proteínas celulares requeridas para cada una de esas funciones. La diversidad de proteínas blanco de la interacción con E2, incluyen algunas involucradas en procesos como: regulación transcripcional, procesamiento del RNA, apoptosis, ciclo celular, importe nuclear y degradación proteica.

Para que E2 ejerza algunas de estas funciones debe de sufrir algunas modificaciones post-traduccionales como son su Fosforilación (Sekhar & McBride, 2012), o bien la Acetilación mediante la interacción con acetiltransferasas celulares, como p300, CBP y pCAF, provocando un aumento en la activación transcripcional mediada por E2 (Kruppel et al., 2008);

### **1.2.3 Impacto de E2 sobre la Transcripción Celular**

Entre las proteínas que interactúan con E2, se encuentran algunas que participan activamente en el proceso de transcripción. Dentro de este amplio grupo se encuentran factores basales de la transcripción y factores relacionados con la cromatina; sugiriendo que la proteína E2 puede ser capaz de interferir con el proceso de transcripción en múltiples niveles.



**Fig. 5]** Interacciones de E2 con componentes del proceso de Transcripción y las funciones de estas proteínas en dicho proceso celular (Muller & Demeret 2012).

Se ha visto que proteínas con propiedades de activación transcripcional interactúan parcialmente, manipulando la estabilidad y el ensamblaje del Complejo de Preinicio de la Transcripción (Desaintes & Demeret 1996). TFIID es un componente clave de este complejo, que está compuesto por TBP (Proteína de Unión a Caja TATA) y por Factores Asociados a esta proteína (TAFs) (You et al., 2004).

Es bien conocido que la regulación del proceso de transcripción, requiere la participación de factores de transcripción secuencia-específicos que se unen a regiones en el promotor permitiendo así un eficiente reclutamiento del complejo de preiniciación a través de co-activadores, mediante interacciones proteicas entre factores reguladores de la transcripción y factores de la maquinaria basal. Entre la diversidad de factores con los que se ha observado que la proteína E2 puede interactuar, se encuentran factores de la maquinaria basal de transcripción (TAF, TBP, GTF2B), factores regulatorios (SP1, HOXC9, NR4A1, C/EBP), así como co-activadores (TMF), indicando que los efectos que E2 tiene sobre la actividad transcripcional dependen al menos parcialmente, de la modulación de la formación del complejo de preiniciación en promotores específicos **Figura 5**.

Recientemente se ha documentado que algunos blancos de E2 actúan a nivel de cromatina para poder regular la transcripción. Entre estos casos, su interacción con BRD4 es sin duda la mejor caracterizada para la transcripción dependiente de E2. Esta proteína se une a histonas acetiladas y estimula la transcripción dependiente de la RNA Polimerasa-II, mediante el reclutamiento de diferentes reguladores transcripcionales (Sekhar et al., 2010)

Otro mecanismo mediante el cual la proteína E2 modifica la cromatina y modula la transcripción, es mediante su interacción con factores de marcaje de histonas; como las acetiltransferasas de histonas PCAF, EP300, EP400 o CBP.

### 1.3 El Factor de Transcripción TAF-1

Como se ha comentado, un amplio e importante grupo de proteínas con las que interactúa E2 se encuentran involucradas en el proceso de Transcripción. Este proceso comprende múltiples pasos, los cuales son dependientes unos de otros para una correcta regulación.

El primer paso de la Transcripción es el reconocimiento del núcleo del promotor mediante los miembros de la familia del complejo TFIID (TFIID, TFIID-like) o de los miembros del complejo SAGA (ej. TFTC, PCAF, SAGA) (Grant et al. 1998; Ogryzko et al. 1998; Wieczorek et al. 1998).

El proceso de Transcripción depende de la integración temporal y espacial del ensamblaje del Complejo de Preiniciación (PIC), y de diferentes pasos sucesivos que permiten la Iniciación, la Elongación y la Terminación. La precisa regulación de la transición del ensamblaje del Complejo de Preiniciación, hacia la Iniciación y posteriormente a la Elongación, es necesaria para asegurar la velocidad apropiada de una transcripción productiva.

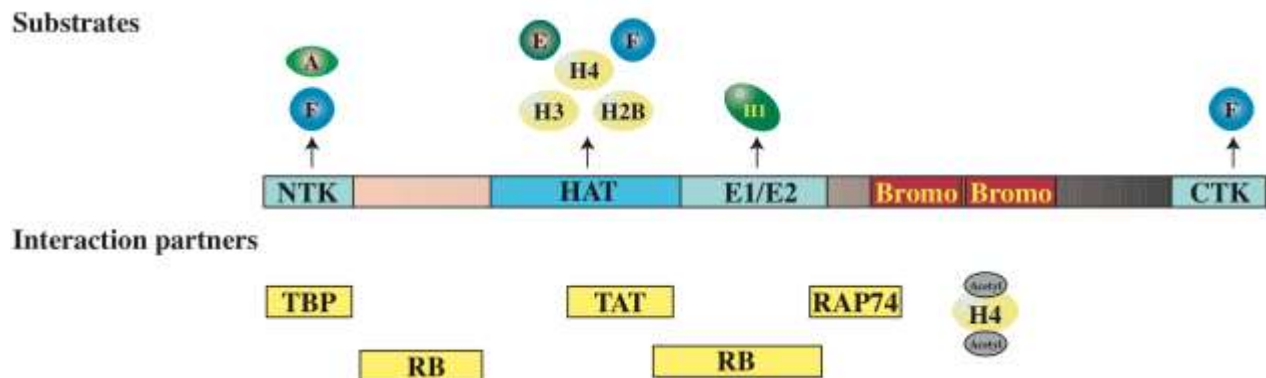
El ensamblaje de PIC está nucleado por TFIID, un complejo proteico compuesto por multi-subunidades, entre las que se encuentran la proteína de unión a caja TATA (TBP) y una serie de factores asociados a TBP, conocidos como TAFs.

TAF-1 ó también llamado TFI<sub>1</sub>250, es el TAF de mayor tamaño y es de suma importancia en el inicio de la transcripción, ya que es el que contacta al núcleo del promotor, en promotores que contienen caja TATA (C. H. Wu et al. 2001). Sin embargo, en promotores que no poseen caja TATA, existe un elemento de secuencia conservado que abarca el sitio de inicio de la transcripción, este elemento es conocido como iniciador (Inr). Se ha observado que TFI<sub>1</sub>250 junto con TFI<sub>1</sub>150 median la unión de TFIID al Inr y que TBP es dispensable para esta actividad (Wassarman & Sauer 2001).

Ya que TAF-1 es inmovilizado en el núcleo del promotor sirve como andamio para el ensamblaje de subcomplejos TFIID y subunidades recombinantes de holo-TFIID, lo cual sugiere que el ensamblaje y la integridad de TFIID dependen de TAF-1 (Wassarman & Sauer 2001).



TAF-1 contiene dos dominios protein-cinasa treonina/serina, uno de ellos se localiza en su N-terminal (NTK) y el otro en su C-terminal (CTK) y es en su dominio central en donde se encuentra su actividad de Histona-Acetil-Transferasa o HAT (O'Brien & Tjian 2000). TAF-1 también posee la capacidad de unirse a múltiples histonas acetiladas, como es el caso de la histona H4 acetilada en la Lys5 y 12 (K5 y K12), esto mediante sus bromodominios en tándem localizados en la región C-terminal (Jacobson et al. 2000) **Figura 6**.



**Fig. 6|** Diagrama esquemático de TAF-1. Localización de los dominios enzimáticos (Dominio cinasa N-terminal (NTK), Dominio cinasa C-terminal (CTK), Dominio Acetiltransferasa de Histonas (HAT), y un dominio de Conjugación/Activación-Ubiquitina (E1/E2) y los Bromodominios que están indicados dentro de la proteína lineal TAF-1). Los sustratos para las actividades enzimáticas se indican arriba de la proteína TAF-1 y las proteínas con las que interactúa se indican debajo de la proteína (Wassarman & Sauer 2001).

Un componente crítico para los mecanismos de reclutamiento y regulación de la Transcripción son las interacciones físicas entre TAF-1 y factores activadores.

TAF-1 se une a activadores virales, entre los que destacan Tat de HIV (Weissman et al. 1998), E1A de Adenovirus (Geisberg, Chen & Ricciardi 1995), ICP4 de Herpes Simple tipo 1 (Carrozza & DeLuca 1996); y a activadores celulares como Jun (Lively et al. 2001), Rb (Siegert & Robbins 1999), el proto-oncogén MDM2 (Léveillard & Wasylyk 1997) y la Ciclina D (Siegert et al. 2000).

Existen diferentes consecuencias de la unión de TAF-1 con los diferentes activadores transcripcionales. Los factores JUN y TFIIA compiten con TAF-1 por la unión a TBP, por lo tanto alteran las propiedades de unión de TFIID al DNA (Lively et al. 2001). Por otro lado, algunos represores inhiben las actividades

enzimáticas de TAF-1 promoviendo el ensamblaje de PIC mediante la modificación de la estructura de Factores Generales de Transcripción (GFTs) y de la cromatina. La unión de Tat, un activador y represor de la transcripción génica viral de VIH, a TAF-1, inhibe la actividad HAT de TAF-1 (Weissman et al. 1998). De forma similar, la unión de Rb a TAF-1 inhibe su actividad cinasa N-terminal (Siegert & Robbins 1999).

Por otro lado la unión de TAF-1 con E1A o con la Ciclina D provoca un efecto positivo sobre la transcripción, ya que esta interacción elimina el efecto inhibitorio producido por la actividad cinasa de TAF-1 cuando se une con Rb (Siegert et al. 2000). Por lo tanto, la regulación de las actividades de TAF-1 por interacciones con activadores y GTFs es integral para el proceso de activación de la transcripción.

Se ha reportado que la expresión de al menos el 18% de los genes celulares es absolutamente indispensable de TAF-1. Muchos de estos genes codifican proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular y en el control de crecimiento (O'Brien & Tjian 2000).

En genes que son independientes de TAF-1, un factor importante de regulación es TAF-7, ya que se une al dominio acetiltransferasa de TAF-1 e inhibe así su actividad enzimática, este acontecimiento es indispensable para que se inicie la transcripción (Gegonne, Weissman & Singer 2001). Posteriormente TAF-7 se libera del complejo TAF1-TFIID tras el término del ensamblaje del complejo de iniciación, permitiendo así el inicio de la transcripción (Gegonne et al. 2006). Sin embargo en estudios recientes se ha concluido que TAF-7, hasta ahora considerado solamente un componente más de TFIID y regulador de la transcripción dependiente de TAF-1, también regula la transcripción independiente de TAF-1 (Devaiah et al. 2010).

## 1.4 Propiedades y Funciones de p53

La proteína E2 de VPH-16 interactúa también de manera directa con la proteína celular p53. Esta interacción se lleva a cabo mediante los dominios de oligomerización y de unión al DNA de p53, con el dominio C-terminal de E2. Interesantemente se ha observado que las mutantes de p53 que no pueden interactuar con E2, son defectivas en su capacidad para inhibir la replicación del DNA (Massimi et al. 1999).

### 1.4.1 Generalidades de p53

La proteína p53 fue descubierta en el año de 1979 por Lane y colaboradores, pero fue hasta 1989 que se caracterizó como un supresor de tumor (Kruse & Gu 2009). Esta proteína es considerada un factor de transcripción, ya que regula la expresión de diferentes genes que codifican para proteínas y microRNAs, que después regulan la respuesta de p53 (Vousden & Prives 2009).

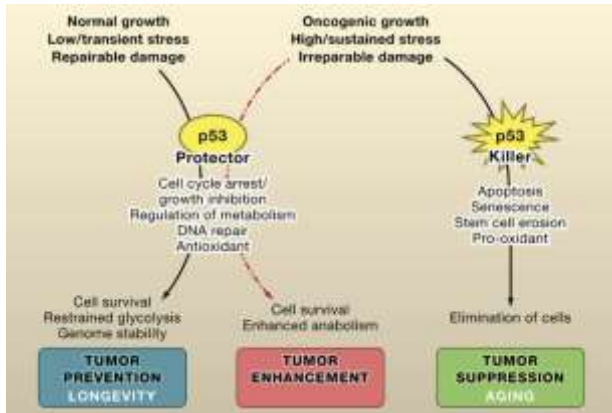
Un gran avance en el campo de estudio de p53, fue conocer que ésta es una proteína de unión al DNA y que reconoce una secuencia específica (Kern et al. 1991). La secuencia de DNA consenso de los elementos de respuesta a p53, fue identificada por ensayos *in vitro* (el-Deiry et al. 1992) y después fue refinada por CHIP-seq en células humanas (Wei et al. 2006). La secuencia consenso contiene dos secuencias pentaméricas invertidas con el patrón 5'-RRRC(A/T)|(A/T)GYYY-3' separadas por 0-13 pb.

Para que p53 pueda llevar a cabo todas sus funciones celulares requiere de su activación. La activación de p53 está dada por una gran variedad de señales de estrés, a las cuales se puede enfrentar una célula durante una progresión maligna, una pérdida de contactos celulares o una hipoxia (Vousden & Prives 2009).

La mayoría de los modelos clásicos que describen su activación se enfocan en tres pasos simples y limitantes, la estabilización de p53 inducida por la



reparables, p53 actúa como un agente protector; por otro lado, cuando existen altos niveles de estrés sostenido, que conllevan a daños irreparables, p53 provoca muerte celular o senescencia **Figura 8**.



**Fig. 8|** Mecanismos duales de la función de p53 en la supresión de tumor y el envejecimiento (Vousden & Prives 2009).

Sin embargo, ensayos de qChIP muestran que aún en condiciones celulares normales p53 se encuentra unido a varios promotores de genes blanco, como p21 y mdm2 (Kaeser and Iggo, 2002; Szak et al., 2001).

Otra forma de regulación transcripcional por parte de p53 es mediante la simple interacción con factores de la maquinaria transcripcional basal, como TFIID/TAFs o con algunos componentes de los complejos mediator/SRB (Yao and Breiding, 1998).

Por otro lado, la interacción de p53 con represores y activadores específicos inducen la transactivación de algunos promotores. Es posible que esta interacción sea regulada por modificaciones post-traduccionales de p53 (Appella & Anderson, 2001), o bien que sea esta interacción la que promueva cambios post-traduccionales en p53 y así se logre una eficiente transactivación (Kruse & Gu 2009).

Por ejemplo, en algunas ocasiones la regulación de la función transcripcional de p53, involucra Acetiltransferasas de Histonas (HATs) (Brooks & Gu, 2003), como CBP/p300 (Goodman & Smolik, 2000). La acetilación de p53 es críticamente importante, ya sea para un eficiente reclutamiento de cofactores o para la activación de genes blanco *in vivo*. Algunas acetiltransferasas como Tip60 y hMof,

pueden actuar a su vez como cofactores, ya que no sólo son reclutadas por p53, sino que son capaces de acetilar a p53 y a algunas histonas (Tang et al., 2006; Sykes et al., 2006).

La acetilación de p53 se eleva en respuesta a estrés, y los niveles de acetilación se correlacionan con su activación y estabilización (Knights et al., 2006).

De forma inversa, p53 puede ser desacetilada por diferentes complejos de desacetilasas (HDAC) que contienen a HDAC1 (Luo et al., 2000) o Sir2 $\alpha$ /Sirt1 (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001), y cuando esto ocurre, la sobre-regulación de la transcripción dependiente de la acetilación de p53 puede ser revertida.

## 2. ANTECEDENTES

La proteína E2 de VPH es necesaria para el mantenimiento del genoma del virus en la célula huésped, así como en la regulación y replicación génica viral. Por lo tanto, la disrupción del ORF de E2, ocasionada por la integración del genoma viral en el genoma de la célula huésped, trae como consecuencias el bloqueo de la replicación y la desregulación de la expresión génica viral, así como la pérdida de control sobre la expresión de los oncogenes E6 y E7 (Muller & Demeret 2012).

Así como a E2 se le relaciona con funciones virales, de igual forma su presencia impacta la modificación global de la expresión génica celular; sin embargo se ha observado que no provoca daños radicales a la célula (Vosa et al. 2012).

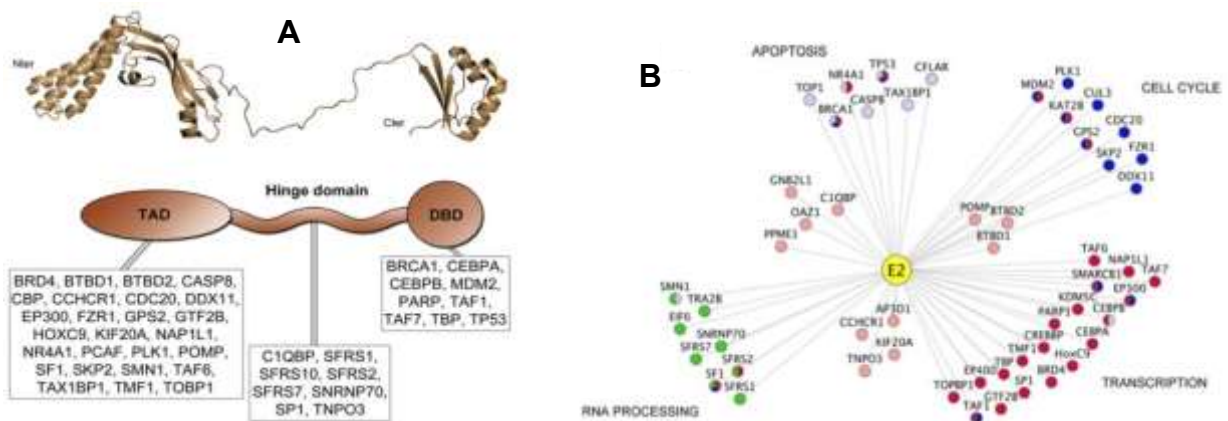
Entre las formas en que E2 regula la expresión génica se encuentra el reconocimiento de secuencias E2BSs. Debido a esto en un estudio previo, se analizó la presencia de estos sitios en el genoma humano, además de su cantidad y funcionalidad, obteniendo como resultado un total de 3,388; de los cuáles solamente 34 tenían las características necesarias para promover la unión de E2. En este mismo estudio se observó que E2 se une a sitios específicos en promotores de diferentes genes, entre los que destacan HMGB2, RBBP4, GAPDH, MMP9, ITGB4, ZBTB8OS y PTPN1 (Vosa et al. 2012).

Al haber tan pocas secuencias E2BSs, se concluyó que la interacción directa de E2 con estos sitios no es el mecanismo principal por el cual la proteína viral regula la expresión génica celular.

Otra forma de regulación de E2, es mediante la interacción con factores celulares a través de sus dominios **Figura 9A**. Se han encontrado alrededor de 98 proteínas celulares con las que interactúa esta proteína viral **Figura 9B**. Con base en lo anterior, se propone que este último es el principal mecanismo mediante el cual la proteína E2 regula la expresión génica.

Como se puede observar en la **Figura 9**, la regulación de E2 involucra interacciones con otras proteínas, entre las que destacan el factor de transcripción SP1, coactivadores CBP/p300 y AMF-1, así como elementos de la maquinaria

basal de transcripción, como la proteína de unión a TATA (TBP) y el factor de transcripción IIB (TFIIB).



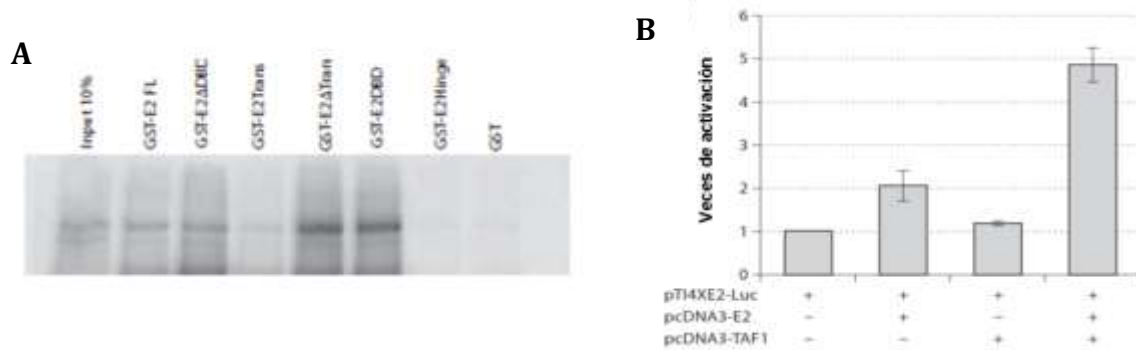
**Fig. 9| Interacción de la proteína E2 con diferentes proteínas de la célula huésped.**

**A)** Representación esquemática de la interacción de E2 con proteínas celulares asignadas al dominio de interacción. **B)** Representación de las cuatro principales familias funcionales marcadas por E2. Las proteínas celulares compartidas por diferentes categorías se encuentran en multi-color.

En nuestro grupo de trabajo y mediante ensayos de “pull-down”, se observó que E2 de VPH-16 interactúa con el factor de transcripción TAF-1, a través del dominio de unión al DNA de E2 y del dominio cinasa amino-terminal de TAF-1, y que esta interacción tiene consecuencias funcionales sobre la actividad transcripcional de E2; ya que la sobre-expresión de TAF-1 aumenta la activación transcripcional dependiente de E2 o elimina la represión ejercida por E2 en la LCR de VPH de alto-riesgo (Centeno et al. 2008) **Figura 10**.

Posteriormente mediante el uso de un vector adenoviral recombinante que permitió la sobre-expresión de E2 de VPH-16, se evaluó el perfil de expresión global, a través de un ensayo de microarreglos. En este estudio se encontró un perfil altamente alterado en las células que expresaban a E2, encontrando 1048 genes con una regulación negativa y 581 con una positiva. En cuanto a las vías de señalización celular, la de WNT fue la más afectada, la cual es indispensable para la regulación de genes involucrados en procesos celulares como apoptosis, proliferación y diferenciación celular. Otras vías también alteradas fueron, PDGF, angiogénesis y la inflamación mediada por citocinas y quimiocinas.





**Fig. 10| Interacción de E2 de VPH-16 con TAF-1**

**A)** Mapeo de la región de interacción de E2 con TAF-1 mediante ensayos “Pull-down”, en donde se observa como el dominio DBD de E2 es la región principal de interacción. **B)** Ensayo con el plásmido reportero, en donde se observa la consecuencia funcional de la interacción de E2 con TAF-1 sobre la actividad transcripcional de E2 (Centeno et al. 2008).

Al analizar todos estos resultados y mediante un análisis bioinformático, se observó que, de todos los genes afectados, 55 de ellos también se encontraban bajo la regulación natural de TAF-1 (E. Ramírez-Salazar et al. 2011).

Con base en esta información y tomando en cuenta la gran importancia de TAF1 en la regulación de funciones celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis; se pensó que probablemente la interacción TAF-1-E2 pudiera tener un impacto en las funciones de TAF-1 como regulador génico y con esto favorecer la generación de un contexto celular óptimo para el ciclo de vida del Virus del Papiloma Humano.

Por lo que en el 2013 en nuestro grupo de investigación García-Venzor analizó la manera en que la presencia de la proteína E2 de VPH-16 modificaba la unión de TAF-1 a un grupo de promotores celulares regulados por éste. Para esto se seleccionaron genes que se sabía eran dependientes de la regulación de TAF-1 (O’Brien and Tjian 2000), que su expresión se hubiera visto modificada por la presencia de la proteína E2 (E. Ramírez-Salazar et al. 2011) y por último que al analizar la estructura del núcleo del promotor fueran genes cuyos promotores carecieran de caja TATA (TATA-less) y que presentaran elementos iniciadores. De esta selección se obtuvieron 14 genes, 10 de ellos con funciones importantes en la regulación de la proliferación y crecimiento celular, mientras que los restantes actuaban en procesos como traducción, citocinesis, motilidad y apoptosis **TABLA 1.**

Para evaluar el posible cambio en la función del factor de transcripción TAF-1 derivado de su interacción con la proteína viral E2, se utilizó un sistema de expresión por Adenovirus recombinantes en la línea celular C-33A. Y se observó que la proteína viral tenía la capacidad de modificar la función del factor de transcripción TAF-1, provocando cambios sutiles en su unión a diversos promotores celulares conllevando a modificaciones en su expresión. Entre los promotores afectados se encontró un grupo en el que se intensificó la unión de TAF-1: Src, RhoA, 14-3-3 $\tau$ , CCND1, GADD45A, p27 y HLA-A y algunos en los que se observó una disminución en su unión, como CCNA1, TOPO1, VDAC3 y eIF5A2. Sin embargo, cabe destacar que la magnitud del cambio en la unión de TAF-1 a cada promotor fue única para cada gen, es decir los datos obtenidos de este estudio sugieren que el impacto de E2 sobre la función de TAF-1 se encuentra influenciado por otros factores como el contexto del promotor, el conjunto de co-activadores y represores transcripcionales así como el contexto celular (García-Venzor Alfredo 2013).

Proteína	GEN	O'Brien y Tjian (2000)	Ramirez-Salazar et al. (2011)	TATA Box	Inr
Factor de inicio de la traducción 5A2	EIF5A2	-4	-5	TATAless	Inr
Proteína homóloga a Ras (RhoA)	RhoA	-10	-5	TATAless	Inr less
Canal de aniones dependiente de voltaje 3	VDAC3	-3	-4	TATAless	Inr
Ciclina A1	CCNA1	-2	2.9	TATAless	Inr
Harvey Rat Sarcoma Oncogén	H-Ras	-2	-0.2	TATAless	Inr
14-3-3 Tau	14-3-3 Tau	+2	0	TATAless	Inr
Inhibidor 1B de cinasas dependientes de ciclina	P27	-	+1.39	TATAless	Inr
Topoisomerasa 1	TOP	-2	-0.8	TATAless	Inr
Proteína de arresto en el crecimiento y de respuesta al daño al DNA	GADD45A	10	-2.25	TATAless	Inr less
JunB Protoncogen	JunB	+2	+0.38	TATA less	Inr

Tabla. 1| Genes analizados. (García-Venzor Alfredo 2013)

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La infección por VPH resulta en interacciones complejas entre el proteoma del huésped y las proteínas virales tempranas. La proteína temprana E2 regula la transcripción, la replicación viral, así como la segregación mitótica del genoma a través del reclutamiento de factores celulares a la región regulatoria de VPH.

Por todo esto E2 es un factor clave para el ciclo viral productivo y por lo tanto para su persistencia. Esta persistencia viral, representa el factor de riesgo principal para el desarrollo de cáncer (Muller & Demeret 2012).

Entre las proteínas celulares con las que interactúa E2 se encuentran la subunidad más grande de TFIID, TAF-1 (Centeno et al. 2008) y la proteína p53 (Massimi et al. 1999), que es un supresor de tumor cuya función predominante es la regulación transcripcional, que en general depende de su unión específica a los promotores de sus genes blanco (Fischer, Steiner & Engeland 2014).

Con base en lo anterior, se sugiere que el efecto que la proteína E2 de VPH-16 pueda ejercer sobre promotores dependientes de TAF-1 y promotores regulados por p53 y TAF-1 en ambientes celulares con diferente estado del gen p53, podría ayudar a comprender los efectos biológicos que la expresión de la proteína viral causa sobre la célula.

### **4. HIPÓTESIS**

El estado de la proteína p53 en la célula (normal, mutada y ausente) tendrá un efecto diferencial sobre la manera en que la expresión de la proteína E2 de VPH-16 modifica tanto la unión de TAF-1 a promotores dependientes de él, como sus niveles de expresión.

## 5. OBJETIVO GENERAL

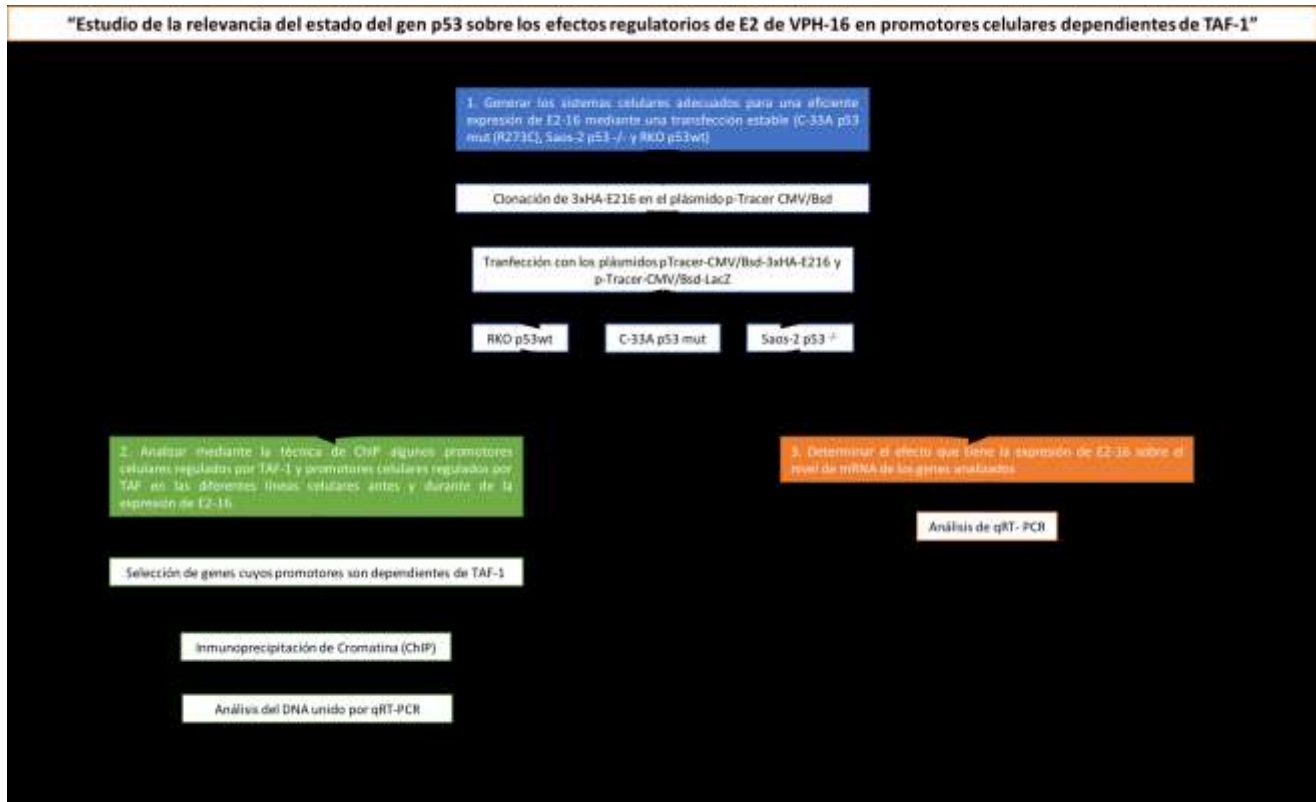
Determinar el efecto que la expresión del gen E2 de VPH-16 tiene sobre promotores regulados por TAF-1 en células con diferente estado de p53 (C-33A p53 (R273C), Saos-2 p53 -/- y RKO p53wt).

## 6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Generar los sistemas celulares adecuados para una eficiente expresión de E2-16 mediante una transfección estable (C-33A p53 mut (R273C), Saos-2 p53 -/- y RKO p53wt).
- Analizar mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) los niveles de unión de TAF-1 a algunos promotores celulares dependientes de este factor en las diferentes líneas celulares antes y durante de la expresión de E2-16.
- Determinar el efecto que tiene la expresión de E2-16 sobre el nivel de mRNA de los genes analizados.

## 7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

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



## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Clonación de 3xHA-E216

El gen E2 de VPH-16 se obtuvo mediante PCR utilizando una DNA polimerasa con baja tasa de error (Pfx) para su síntesis y como templado al plásmido pcDNA-E216. Para este fin, se diseñaron oligonucleótidos que contenían los sitios de restricción MluI y ClaI para llevar a cabo una clonación sitio dirigida en el plásmido pSin-3xHA-Pur, el cual fue construido por la M. en C. Janet Sánchez Ramos en nuestro grupo de trabajo, y le adicionaría el epítotope de hemaglutinina (HA) repetido tres veces a nuestro gen viral.

Nombre	Secuencia de los Oligonucleótidos	Sitio de Restricción
<b>ALVClIE216Fw</b>	5' GAGAATCGATGAGACTCTTTGCCAACGTTTA 3'	ClaI
<b>ALVMluE216Rv</b>	5' GAGAACGCGTTCATATAGACATAAATCCAGTAG 3'	MluI

Para realizar la amplificación de E2-16 se utilizó la siguiente mezcla de reacción 1.0mM de dNTPs, 1.5 mM de MgSO<sub>4</sub>, 5.0µl de Buffer 5X, 2.5µl de Enhancer 10X 0.5µM oligonucleótido forward, 0.5µM oligonucleótido reverse, 1u/µl de enzima Platinum® Pfx (Invitrogen®), 2µl DNA molde (15ng/µl) y H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 25µl. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: fase de inicio de 94°C, 5 minutos por 1 ciclo; segunda fase, una temperatura de desnaturalización de 94°C por 45 segundos, una temperatura de alineamiento de 58.2°C por 45 segundos y una temperatura de elongación de 72°C por 1.5 minutos, todo esto por 30 ciclos; tercera fase a 72°C por 5 minutos. Posteriormente el producto de PCR de 1107pb se cargó en un gel de Agarosa al 1%, se cortó y purificó empleando “Wizard SV gel and PCR clean UP system” (Promega®)

### 8.1.1 Clonación en pGEM®-T Easy

El plásmido de alto número de copias pGEM®-T Easy (Promega®), contiene los promotores T7 y SP6, los cuales flanquean la región codificante para el péptido-alfa de la enzima beta-galactosidasa, esta región se encuentra interrumpida por múltiples sitios de clonación. La inactivación del péptido alfa a consecuencia de la inserción del transgen, permite identificar directamente clonas recombinantes mediante el fenotipo azul/blanco de las colonias bacterianas. Otra ventaja del plásmido es que contiene una serie de timidinas en la región 3' terminal, lo que favorece la clonación de productos obtenidos por PCR.

Para la clonación en este plásmido de tránsito, el amplificado ya purificado se poliadeniló, mediante un ensayo de PCR, para lo cual se realizó una mezcla que contenía 150ng del amplicón E2-16, 1.0mM de dATPs, 5µl de Buffer de DNA Polimerasa 5x (BioTherm®), 2.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.25 u/µl de DNA Polimerasa Gotaq (BioTherm®) y se llevó a un volumen final de 25 µl con H<sub>2</sub>O desionizada estéril, la mezcla de reacción se incubó 1h a 72°C. Posteriormente el producto se clonó en el vector pGEM®-T Easy, utilizando una proporción inserto/vector 3:1 y una reacción de ligación que contenía 1u/µl T4 DNA ligasa, 5.0 µl T4 DNA ligasa Buffer 2x, 7.5 ng de pGEM®-T Easy y 22.5 ng del producto de PCR, en un volumen de 10µl. La ligación se incubó 24h a temperatura ambiente

### 8.1.2 Transformación de Bacterias JM109 y DH5α

Con el producto de la ligación se transformaron bacterias JM109 o DH5α por choque térmico, para esto se les colocó toda la reacción en un vial de bacterias, posteriormente se incubaron 30 minutos en hielo, pasado este tiempo se sometieron a 42°C por 90 segundos y enseguida se incubaron en hielo por 3 minutos. Después se les adicionó 700µl de medio SOC y se incubaron a 37°C a 150-200rpm por una hora. Se centrifugó el tubo de microfuga de 1.5ml de bacterias a 6000 rpm durante 4 minutos, se decantó el sobrenadante y con el volumen remanente se resuspendió el botón bacteriano. Con la suspensión de

bacterias se plaqueó una caja de Agar LB suplementado con Ampicilina (100 µg/ml), 50µl de IPTG (200mM) y 50µl de x-gal (20mg/µl), para permitir elegir las colonias candidatas dependiendo de su fenotipo, azules (sin inserto) y blancas (con inserto), y se incubó toda la noche a 37°C.

### **8.1.3 Selección de Colonias Candidatas por PCR y Extracción de DNA plasmídico**

Las colonias candidatas se sometieron a PCR para verificar si expresaban el transgen E2-16, para lo cual se utilizó el protocolo descrito más adelante en la sección “8.6 Reacción de RT-PCR y PCR punto final”.

A las colonias que resultaron positivas en el Ensayo de PCR en punto final del dominio de transactivación de E2, se les realizó extracción de DNA plasmídico, el cual consistió en la inoculación de éstas en un tubo de 10 ml de medio LB suplementado con 20µl Ampicilina 50mg/ml y su incubación a 37°C por aproximadamente 14h. Pasado este tiempo el cultivo bacteriano se centrifugó a 2500 rpm por 15 minutos. Se decantó el sobrenadante, se resuspendió el botón bacteriano en 300µl de Buffer P1 (TrisHCl 50mM pH 8, EDTA 10mM, RNAsa A 100 µg/ml) y se transfirió a un tubo de microfuga de 1.5ml, el cual se colocó en hielo. Se añadió 300µl de Buffer P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%) sobre la pared del tubo, se invirtió suavemente, se homogeneizó por completo y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se le agregó 300µl de Buffer P3 (Acetato de Potasio 1M pH 5.5) por la pared del tubo, se invirtió suavemente, se homogeneizó y se incubó en hielo por 20 minutos. Los tubos se centrifugaron a 12500 rpm durante 40 minutos a 4°C y se colocaron nuevamente en hielo. Finalmente se añadió 700µl de sPEG, se agitó, y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12500 rpm por 8 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se disolvió en 100µl de H<sub>2</sub>O desionizada estéril.



#### **8.1.4 Purificación por Fenol/Cloroformo**

A los 100µl de DNA plasmídico se les adicionó un volumen igual de Fenol y se agitó vigorosamente. Se centrifugó a 12500rpm por 5 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa cuidando de no contaminarla con la fase orgánica, y se transfirió a un nuevo tubo de microfufa de 1.5ml. Al tubo se le adicionó 100µl de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó a 12500rpm por 5 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se colocó en otro tubo de 1.5ml. Posteriormente se agregó 50µl de Acetato de Amonio 7.5M pH 7.0 y 2.5 volúmenes, tomando en cuenta la fase acuosa y el acetato, de Etanol absoluto frío. Se centrifugó a 12500 rpm, durante 30 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por decantación y la pastilla se lavó mediante centrifugación a 12500 rpm, durante 15 minutos a 4°C, con 200µl de Etanol al 70%. Se decantó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla de DNA por 15 minutos a temperatura ambiente y se disolvió en 30µl de H<sub>2</sub>O desionizada estéril.

#### **8.1.5 Selección de Colonias Candidatas mediante Restricción Enzimática**

El DNA plasmídico ya purificado se restringió utilizando la siguiente mezcla de reacción: 500ng DNA, 0.5µl de Enzima de Restricción 10u/µl, 1.5µl de Buffer de la Enzima de Restricción 10X y se llevó a un volumen de 15µl de H<sub>2</sub>O desionizada estéril. La reacción se incubó a 37°C durante 1h o máximo 12h, dependiendo de las especificaciones del proveedor.

#### **8.1.6 Construcción del plásmido pSin-3xHA-EF2-Pur**

Ya que se contaba con las colonias que contenían el transgen, éste se liberó del plásmido de tránsito pGEM®-T Easy, para lo cual se transformaron bacterias GM2929 y GM2163 mediante la técnica de electroporación. Estas bacterias carecen de DNA-metiltransferasas y se utilizaron debido a que los sitios de restricción ClaI y MluI son sensibles a metilación. Ya que el transgen se liberó del

vector pGEM®-T Easy (8.1.5 Selección de Colonias Candidatas mediante Restricción) se procedió a la ligación en el plásmido pSin-3xHA-EF2-Pur. Este procedimiento requirió una reacción de ligación cuya proporción fue inserto/vector 3:1 y una mezcla que contenía 1.5 u/μl T4 DNA ligasa, 1.5 μl T4 DNA ligasa Buffer 10x, 100ng de pSin-3xHA-EF2-Pur y 40ng del inserto, en un volumen de 15μl. La ligación se incubó 24h a temperatura ambiente. Con la ligación se transformaron bacterias DH5α (“8.1.2 Transformación de Bacterias JM109 y DH5α”) y las colonias candidatas se seleccionaron mediante PCR y restricción enzimática (“8.1.3 Selección de Colonias Candidatas por PCR y Extracción de DNA plasmídico”).

### 8.1.7 Construcción del plásmido pTracer™-CMV/Bsd vector

Ya que se tenía el transgen clonado en el plásmido pSin-3xHA-E2F-Pur, el cual le proporcionaría la etiqueta de tres hemaglutininas a la proteína E2-16, se procedió a la clonación en el plásmido final “pTracer™-CMV/Bsd” de Thermo Fisher Scientific®. Este vector de expresión contiene un gen de proteína verde fluorescente (GFP) fusionado con el gen de resistencia a Blastidina. La Blastidina es un potente agente de selección que permite una rápida generación de líneas celulares estables. Además, presenta dos promotores importantes, EF-1 el cual es un promotor para una expresión constitutiva alta del gen de selección Cycle 3GFP-Blasticidina y el promotor CMV también de expresión constitutiva alta del gen de interés.

Para poder realizar la clonación sitio-dirigida en este plásmido se diseñaron oligonucleótidos, que contenían sitios de restricción NheI y EcoRI, así como una fracción del gen E2 y del epítipo 3xHA.

Nombre	Secuencia de los Oligonucleótidos	Sitio de Restricción
ALVNheIKHAE216Fw	5' GAGAGCTAGCGCCACCATGTACCCATACGA 3'	NheI
ALVEcoRIE216Rv	5' GAGAGAATTC2TCATATAGACATAAATCCAGTAG 3'	EcoRI

Para realizar la amplificación de E2-16 por PCR, se utilizó como molde el pSin-E216-3xHA-E2F-Pur y la siguiente mezcla de reacción 1.0mM de dNTPs, 1.5 mM de MgSO<sub>4</sub>, 5.0µl de Buffer 5X, 2.5µl de Enhancer 10X 0.5µM oligonucleótido forward, 0.5µM oligonucleótido reverse, 1u/µl de enzima Platinum® Pfx (Invitrogen®), 3µl DNA molde (10ng/µl) y H<sub>2</sub>O desionizada estéril hasta un volumen final de 25µl.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes: fase de inicio de 94°C, 5 minutos por 1 ciclo; segunda fase, una temperatura de desnaturalización de 94°C por 45 segundos, una temperatura de alineamiento de 58.2°C por 45 segundos y una temperatura de elongación de 72°C por 1.5 minutos, todo esto por 30 ciclos; tercera fase a 72°C por 5 minutos. Posteriormente el producto de PCR de 1210pb se cargó en un gel de Agarosa al 1%, se cortó y purificó empleando “Wizard SV gel and PCR clean UP system” (Promega®).

Se restringió el plásmido pTracer™-CMV/Bsd y el amplificado purificado (8.1.5 Selección de Colonias Candidatas mediante Restricción). Después de la restricción se se volvieron a purificar por “Wizard SV gel and PCR clean UP system” (Promega®). Se realizó la ligación correspondiente, con una proporción inserto/vector 5:1 y la siguiente mezcla de reacción: 1.5 u/µl T4 DNA ligasa, 2.0 µl T4 DNA ligasa Buffer 10x, 100ng de pTracer™-CMV/Bsd y 83ng del inserto, en un volumen de 20µl. La ligación se incubó 24h a temperatura ambiente. Con la ligación se transformaron bacterias DH5α (“8.1.2 Transformación de Bacterias JM109 y DH5α”) y las colonias candidatas se seleccionaron mediante PCR y restricción enzimática (“8.1.3 Selección de Colonias Candidatas por PCR y Extracción de DNA plasmídico”).

## 8.2 Cultivos Celulares

Para la realización del presente trabajo se utilizaron tres líneas celulares diferentes,

- La línea celular RKO (p53<sup>+/+</sup>) se deriva de carcinoma de colon, se encuentra poco diferenciada, posee una morfología epitelial, adherente y fue desarrollada por Michael Brattain. Las células RKO contienen ambos alelos del gen p53 normales (p53wt (“wild-type”)), pero carecen del receptor nuclear tiroideo humano (h-TRbeta1). Esta línea celular se cultivó en Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM Sigma Chemical®, MO, EE.UU.), al cuál se le agregó 44mM de Bicarbonato de Sodio (NaHCO<sub>3</sub>, SIGMA®), 10 mM de HEPES (SIGMA®) y se ajustó a pH 6.9. Posteriormente se suplementaron 100 ml con 4mM de L-Glutamina, 1mM de Piruvato de Sodio, 50 U/mL de Penicilina, 50 ul/mL de Estreptomicina y 10% de SFB (GIBCO®).
- La línea celular C-33A (p53 mut) se deriva de carcinoma cervical, negativo para VPH, posee una morfología epitelial, adherente, expresa la proteína Renitoblastoma (Rb) pero con un tamaño anormal, presenta una elevada expresión de p53, sin embargo, este gen contiene una mutación puntual en el codón 273 provocando una sustitución del aminoácido Arginina por Cisteína. Esta línea celular se cultivó en Dulbecco's Modified Eagle Medium-Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12 (GIBCO®)), al cual se le agregó 29 mM de Bicarbonato de Sodio (NaHCO<sub>3</sub>, SIGMA®), 10 mM de HEPES (SIGMA®) y se ajustó a pH 6.8-6.9. Posteriormente se suplementaron 100 ml con 4 mM de L-Glutamina, 1mM de Piruvato de Sodio, 50 U/mL de Penicilina, 50 ul/mL de Estreptomicina y 10% de SFB (GIBCO®)
- La línea celular Saos-2 (p53<sup>-/-</sup>) fue aislada y caracterizada por J. Fogh & G. Trempe. Estas células derivan de osteosarcoma humano, son no tumorigénicas, poseen una morfología epitelial, adherente y no expresan al gen p53. Esta línea celular se cultivó en Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM Sigma Chemical®, MO, EE.UU.), al cuál se le agregó 44mM de Bicarbonato de Sodio (NaHCO<sub>3</sub>, SIGMA®), 10 mM de HEPES (SIGMA®) y se

ajustó a pH 6.9. Posteriormente se suplementaron 100 ml con 4mM de L-Glutamina, 1mM de Piruvato de Sodio, 50 U/mL de Penicilina, 50 ul/mL de Estreptomina y 15% de SFB (GIBCO®)

Todas las líneas celulares se crecieron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **8.3 Transfecciones Estables Celulares**

Las transfecciones estables se realizaron en cada una de las tres líneas celulares antes descritas, con el plásmido p-TRACER-CMV/Bsd-3xHAE216 y p-TRACER-CMV/Bsd-LacZ, éste último como control negativo.

Las transfecciones se llevaron a cabo en cajas p60, cuya confluencia celular fue de aproximadamente 80%, con una relación 1:3 DNA-Lipofectamina 2000 (Invitrogen®) y utilizando como medio Opti-MEM®. La mezcla de transfección se retiró transcurridas 6h. Y la selección mediante Blastidina comenzó 48h post-transfección.

### **8.4 Extracción de RNA de las líneas celulares**

Las líneas celulares sembradas en cajas p100 se lavaron dos veces con 2 ml de PBS 1x, posteriormente se agregó 1 ml de TRIzol (Ambion®), se despegó la monocapa con ayuda de un gendarme, la mezcla obtenida se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se dejó reposar por 5 minutos para una completa lisis celular. A este tubo se le adicionaron 200 ul de Cloroformo y se agitó vigorosamente para homogeneizar las fases, posteriormente se centrifugó a máxima velocidad (13000 rpm) a 4°C, con la finalidad de separar la fase orgánica de la acuosa. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo de 1.5 ml, se le adicionó 500 ul de isopropanol para llevar a cabo la precipitación del RNA y se centrifugó a máxima velocidad por 30 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo se decantó el volumen del tubo con sumo cuidado, se le adicionó 250 ul de Etanol al 70% y se centrifugó nuevamente durante 15 minutos a 13000 rpm a 4°C, para lavar el botón de RNA. Por último, se decantó, se dejó secando durante 10 minutos a temperatura ambiente. La pastilla

de RNA se resuspendió en 30 ul de H<sub>2</sub>O desionizada estéril, se le adicionaron 4µl de buffer de DNAsa RQ1 (10X) (Clontech®) y 4 ul de enzima DNAsa RQ1 (1u/µl) (Clontech®). La mezcla de reacción se incubó durante 2h a 37°C, pasado este tiempo se le agregó 4 ul de Solución de Paro de la DNAsa RQ1 (Clontech®) y se incubó a 65°C por 15 minutos. El RNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría, mediante el equipo NanoDrop 2000 (Thermo SCIENTIFIC®) y se almacenó a -80°C.

## 8.5 Síntesis de cDNA

Para sintetizar cDNA a partir de RNA mensajero (mRNA), se empleó un oligonucleótido (Oligo (dT)), que hibrida en la región 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 utilizó 2 ug de RNA y los siguientes reactivos: 1µl de Oligo (dT) (Promega®), 5µl de buffer 5x de enzima M-MLV (Promega®), 5µl de dNTPs mix (25mM), 0.6µl de RNAsin (Promega®), 1µl de la retrotranscriptasa M-MLV (1u/µl) (Promega®) y se llevó a un volumen final de 25 ul con H<sub>2</sub>O desionizada estéril.

Inicialmente, sólo se agregó el RNA (2ug), el oligo (dT) y el agua, esta mezcla se incubó a 70°C por 5 min, y posteriormente a 4°C por 5 min. Inmediatamente se adicionó el resto de los reactivos, se homogenizó y se incubó a 42°C por 2 horas. Este proceso se llevó a cabo en un termociclador. Al final el cDNA se almacenó a -20°C.

## 8.6 Reacción de RT-PCR y PCR punto final

Para realizar los ensayos de RT-PCR, se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 100ng de cDNA aproximadamente, 1.25mM de dNTPs mix, 3.0 ul de Buffer de DNA Polimerasa 5x (BioTherm®), 1.25mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.03 u/µl de DNA Polimerasa Gotaq (BioTherm®), 0.5µM oligonucleótido forward, 0.5µM oligonucleótido reverse y se llevó a un volumen final de 15 ul con H<sub>2</sub>O desionizada estéril.

Las condiciones de reacción para el gen de Actina, el cual nos ayuda a conocer la integridad del cDNA, fueron las siguientes: fase de inicio de 94°C, 5 minutos por 1 ciclo; segunda fase, una temperatura de desnaturalización de 94°C por 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 60°C por 45 segundos y una temperatura de elongación de 72°C por 1 minuto, todo esto por 30 ciclos; tercera fase a 72°C por 7 minutos.

Las condiciones para el gen E2 fueron las siguientes: fase de inicio de 94°C, 5 minutos por 1 ciclo; segunda fase, una temperatura de desnaturalización de 94°C por 45 segundos, una temperatura de alineamiento de 60°C por 45 segundos y una temperatura de elongación de 72°C por 1.5 minutos, todo esto por 30 ciclos; tercera fase a 72°C por 5 minutos.

Las condiciones para la fracción de transactivación de E2 fueron las siguientes: fase de inicio de 94°C, 5 minutos por 1 ciclo; segunda fase, una temperatura de desnaturalización de 94°C por 45 segundos, una temperatura de alineamiento de 60°C por 45 segundos y una temperatura de elongación de 72°C por 1 minuto, todo esto por 25 ciclos; tercera fase a 72°C por 5 minutos.

## **8.7 Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP)**

La Inmunoprecipitación de Cromatina se llevó a cabo utilizando el Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit (Upstate, CA, EE. UU.) a partir de  $3 \times 10^6$  de células RKO-E216, RKO-LacZ, C-33A-E216, C-33A-LacZ y  $1.5 \times 10^6$  de células Saos-2-E216 y Saos-2-LacZ. Esta inmunoprecipitación se realizó empleando los anticuerpos específicos anti-TAF1 (sc-735, Santa Cruz Biotechnology®, CA, EE.UU.) y como control negativo, el anticuerpo no relacionado anti-IgG-mouse (Santa Cruz Biotechnology®, CA, EE.UU.).

El ensayo se llevó a cabo 48h después del sembrado de las células, esto con la finalidad de tener 80- 90% de confluencia. A cada cultivo se le retiró el medio y se le realizó dos lavados con PBS1x, posteriormente se le añadió 10 ml de medio sin suero con 270 ul de formaldehído al 37% y se incubó a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> por 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio y se lavó nuevamente dos veces con PBS1x frío

adicionado con inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 1 mg/ml de aprotinina y 1 mg/ml de pepstatina A, 1X "Complete protease inhibitor cocktail" (Roche®)). Se despegó la monocapa celular con 1 ml de PBS1x frío, también adicionado con inhibidores de proteasas, con la ayuda de un gendarme. Las células en suspensión se transfirieron a un tubo de microfuga de 1.5ml y se centrifugaron a 2000 rpm por 4 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 300 ul de "SDS Lysis Buffer" (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 8.1), adicionado por inhibidores de proteasas y se incubó en hielo por 10 minutos. Posteriormente la mezcla celular se fragmentó utilizando el Bioruptor® Pico Sonication System de DIAGENODE, con la finalidad de obtener fragmentos de 200-600 pb, durante 8 ciclos, cada uno compuesto por 30 segundos "ON" y 60 segundos "OFF". En seguida del sonicado se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de microcentrifuga de 2ml, descartando la pastilla. El sobrenadante celular fragmentado se llevó a un volumen de 2ml con "ChIP Dilution Buffer" (0.01% SDS, 1.1% Tritón X-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl pH 8.1, 167mM NaCl), adicionado con inhibidores de proteasas, de este volumen se tomó 200ul (10%) para ser utilizado posteriormente como "input" de cada una de las muestras, esta fracción fue almacenada a -20°C. Con el resto de la muestra, se continuó el protocolo de la Inmunoprecipitación de Cromatina, para esto se le adicionó 30ul de Proteína A Agarosa, con la finalidad de reducir de disminuir el material no específico, se incubó 30 minutos a 4°C en agitación y se centrifugó a 2000 rpm, 2 minutos a 4°C. Con cuidado se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 2ml para microcentrifuga y se le adicionó 5ug de anticuerpo anti-TAF1 (o bien el anticuerpo no relacionado) y se incubó a 4°C toda la noche con rotación constante. Al siguiente día se recolectó el complejo formado histona-anticuerpo, mediante la incubación de la muestra con 30 ul de Proteína A Agarosa acoplada a perlas magnéticas PureProteome™ Merck Millipore, por 1h a 4°C con rotación constante. Posteriormente se recolectó el botón de Agarosa mediante el uso de una barra magnética, cuidadosamente se removió el sobrenadante, el cual contenía el DNA no unido e inespecífico. Y se lavó el complejo Cromatina-Anticuerpo-Proteína A Agarosa por 5 minutos en rotación constante a 4°C con 1ml de cada uno de los siguientes buffers: 1 vez con "Low Salt Immune Complex Wash Buffer" (0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 2mM de EDTA, 20mM Tris HCl, 150mM NaCl, pH 8.1), "High Salt Immune Complex Wash Buffer" (0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 8.1) y LiCl Immune



Complex Wash Buffer (0.25M LiCl, 1% NP40, 1% Ácido Deoxicólico (Sal sódica), 1mM EDTA, 10mM Tris HCl, pH 8.1); y dos veces con “Buffer TE” (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0). Una vez que se realizaron los lavados se procedió a eluir el complejo de la Cromatina del anticuerpo, para lo cual se adicionó 250 ul de una solución de 1% SDS y 0.1M NaHCO<sub>3</sub>, para resuspender el botón del complejo y se incubó por 15 minutos con rotación constante a 4°C. Pasado este tiempo se recuperó el sobrenadante con la barra magnética y se transfirió a un tubo de microfuga de 1.5 mL y se colocó en hielo. Este paso de elución se realizó dos veces y se combinaron las dos eluciones, para tener un volumen total de 500ul. Una vez eluído el complejo se revirtieron los entrecruzamientos Histona-DNA de las muestras y de los “inputs”, mediante la adición de 20ul de NaCl 5M y su incubación a 65°C por 4h. Pasado este tiempo se les agregó 10ul de EDTA 0.5M, 20ul Tris-HCl 1M, pH 6.5 y 2 ul de Proteinasa K 10 mg/mL y se incubaron a 45°C por 1h. Después de la digestión de las proteínas se purificó el DNA mediante extracción fenol/cloroformo y se precipitó durante 36h a -20°C con 100µl de NaCl 5M y 2 volúmenes de isopropanol. Al tercer día se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 45 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 ul de Etanol al 75%, centrifugando nuevamente a 13000 rpm, 15 minutos a 4°C. La pastilla se secó a temperatura ambiente por 15 minutos y se disolvió en 100ul de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.

## 8.8 PCR en Tiempo Real (qPCR)

Para las reacciones de RT-PCR en tiempo real de las muestras procedentes de la Inmunoprecipitación de Cromatina se empleó el kit Maxima SYBR Green qPCR (Thermo Scientific®, OR, EE.UU.). Para cada reacción de 15 µl, se utilizó 5 ul de DNA del ChIP, 7.5 µl de la mezcla de reacción 2X de Maxima SYBR Green, 0.3 µl de los oligonucleótidos específicos (4.3 pmol/l) y se llevó al volumen de 15 ul con agua desionizada estéril. Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo a 95 °C durante 15 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 45 s, y 60 °C durante 1 min.

En cuanto a los ensayos de qRT-PCR, cada reacción se realizó con 1 ul de cDNA, 7.5 µl de la mezcla de reacción 2X de Maxima SYBR Green, 0.3 µl de los oligonucleótidos específicos (4.3 pmol/l) se 6 ul con agua desionizada estéril.

Las secuencias de los oligonucleótidos usados se muestran en la **TABLA 2.**

Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado y el análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el método  $\Delta\Delta Ct$ .

## 8.9 Oligonucleótidos

La siguiente tabla (Tabla 2) muestra los oligonucleótidos utilizados en la técnica de qRT-PCR en el presente trabajo:

Nombre	Secuencia de los Oligonucleótidos
$\beta$ -Actin-Fw	5' GCGGGAAATCGTGCGTGACATT 3'
$\beta$ -Actin-Rv	5' GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG 3'
AGVRTGADD45AFw	5' AAGGATGGATAAGGTGGGG 3'
AGVRTGADD45Arv	5' ATGTTGATGTCGTTCTCGC 3'
AGVRT1433TFw	5' CTCATACAAAGACAGCACCC3'
AGVRT1433Rv	5' ATTTAGTTTTTCAGCCCCTTCT3'
AGVRTTOPOIFw	5' AAAGTGCTAAGGCTGATGC3'
AGVRTTOPOIRv	5' CTCGGTCTGTGGCTTGAA 3'
AGVRTCCNA1Fw	5' AGACCCAAAGCACACTACAT 3'
AGVRTCCNA1Rv	5' TCCCTCTCAGAACAGACATAC 3'
AGVRTCCNDFw	5' AGGCGGAGGAGAACAAC 3'
AGVRTCCNDRv	5' TGAGGCGGTAGTAGGACA 3'
AGVRTHLA-AFw	5' TGATGTGGAGGAGGAAGAG 3'
AGVRTHLA-ARv	5' GCAGAAACAAAGTCAGGGT 3'
AGVRTRhoAFw	5' GTCAAGCATTCTGTCCCAA 3'
AGVRTRhoARv	5' ACCTCTCTCACTCCATCTTT 3'
AGVRTSrcFw	5' TTCTACATCACCTCCCGCA 3'
AGVRTSrcRv	5' ATCCACACCTCGCCAAAG 3'

Tabla. 2| Oligonucleótidos.

## 9. RESULTADOS

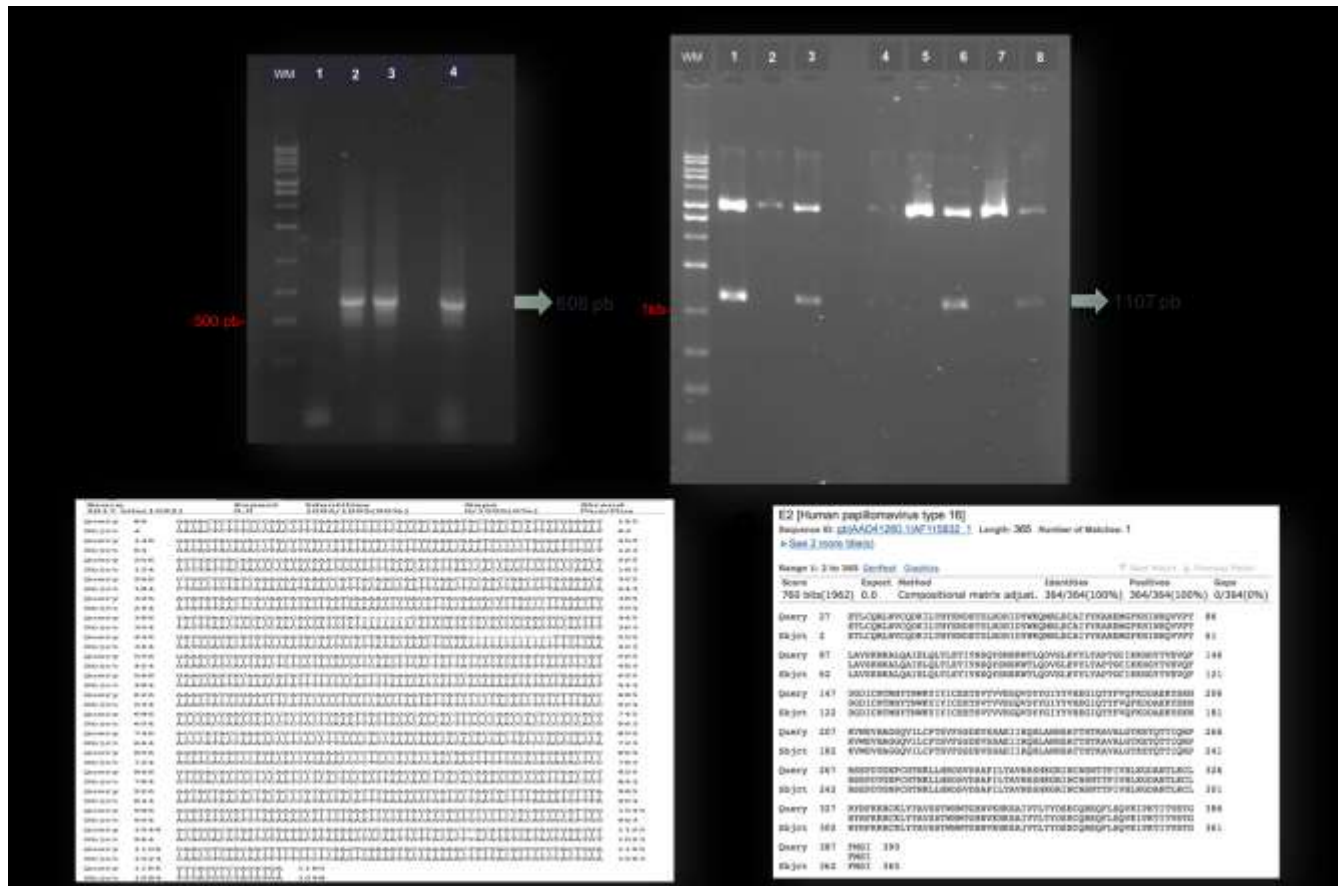
### 9.1 Generación del sistema celular estable 3xHA-E216

- **Clonación de 3xHA-E216**

Considerando que el objetivo principal del presente trabajo es la determinación del efecto que tenía la expresión del gen E2 de VPH-16 sobre promotores regulados por TAF-1, fue necesario generar un sistema celular que permitiera mantener la expresión del gen viral E2 por largo tiempo. Por lo que se decidió clonar el transgen E2-16 en el plásmido pTracer™-CMV/Bsd vector, que tiene diferentes ventajas, entre las que destacan, la producción de líneas estables, un promotor de alta expresión constitutiva CMV y un gen de selección que contiene el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) fusionado con el de resistencia a Blastidina.

Para asegurar una mayor eficiencia de clonación en el plásmido pTracer, se decidió realizar un paso previo de clonación insertando el producto de PCR conteniendo nuestro gen de interés, en el plásmido de tránsito pGEM®-T Easy para corroborar en el la presencia e integridad de nuestro inserto, y posteriormente realizar la subclonación sitio dirigida a pTracer. Cuando se tuvo el transgen clonado en pGEM®-T Easy se seleccionaron las colonias candidatas mediante PCR y restricción enzimática. Para realizar la selección por PCR se utilizó un par de oligonucleótidos que amplificaban el dominio de transactivación del gen E2. Para analizar eficientemente las colonias candidatas, se formaron 2 grupos de 4 colonias y se realizó la amplificación por PCR. Como se observa en la **Figura 11A** en los dos grupos existían colonias que contenían el transgen de 608pb. Por lo que se decidió proceder a la restricción enzimática de cada una de las colonias con la enzima EcoRI, ya que ésta flanqueaba al transgen y su restricción permitiría su liberación. De las ocho colonias candidatas sólo 5 de ellas liberaron el transgen de 1107pb correspondiente a E2 **Figura 11B**. Para revisar la integridad de la secuencia de las 5 colonias clonadas se secuenciaron y se realizó

la alineación correspondiente a nivel de nucleótidos y de aminoácidos con la herramienta bioinformática BLAST. De esta forma se comprobó que la secuencia correspondía a la de E2 de VPH-16 y que no contenía ningún cambio **Figura 11 C y D.**



**Fig. 11| CLONACIÓN DEL GEN E2 DE VPH-16 EN EL VECTOR pGEM®-T Easy.** A) Se muestra el producto de PCR de un fragmento del gen E2-16, de grupos de colonias candidatas, en un gel de agarosa al 1%. En el carril 0 marcador de peso molecular (WM) de 1kb. 1, Control negativo sin templado NTC.2, Control Positivo para PCR. 3 y 4, Grupos de colonias candidatas. B) Corrimiento electroforético en un gel de Agarosa al 1% de las colonias candidatas restringidas con la enzima EcoRI. En el carril 0 Marcador de peso Molecular (WM) de 1kb. C) Alineamiento de la secuencia clonada de E2-16 con la secuencia referencia mediante BLAST D) Alineamiento de la secuencia aminoacídica de E2-16 con la secuencia de referencia mediante BLASTp.

Ya que se tenía el gen clonado en el plásmido de tránsito se procedió a la subclonación en el vector pSin-3xHA-EF2-Pur, el cual le conferiría la etiqueta de tres hemaglutininas a la proteína E2-16 para aumentar la sensibilidad de ésta en las técnicas de detección. Se liberó el transgen mediante la restricción enzimática con ClaI y MluI de pGEM®-T Easy, se purificó y se ligó al plásmido pSin-3xHA-EF2-Pur bajo dos condiciones de incubación 24h y 48h. Posteriormente se

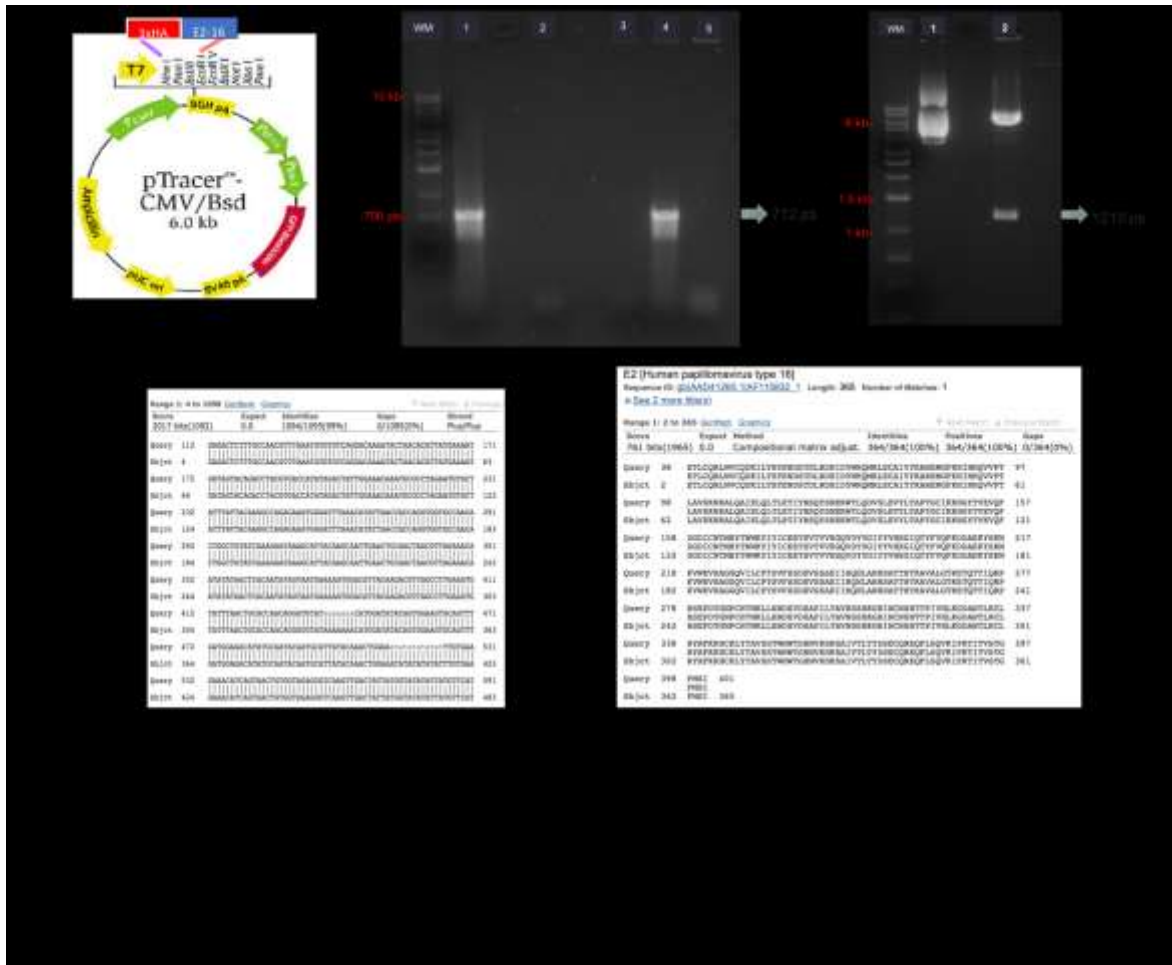
seleccionaron las colonias candidatas por PCR y restricción. Como se puede observar en la **Figura 12**, la ligación más eficiente fue la obtenida a las 12h, ya que ésta fue la única que presentó producto de PCR. Con base en esto, se procedió a evaluarla mediante restricción con MluI/ClaI. Al realizar esta reacción se confirmó que la colonia contenía la secuencia 3xHAE2-16 ya que se liberó el fragmento correspondiente de 1217pb.



**Fig. 12| SUBCLONACIÓN DEL GEN E2 DE VPH-16 EN EL VECTOR pSin-3xHA-EF2-Pur .** A) Se muestra el producto de PCR de un fragmento del gen E2-16 de una colonia candidata en un gel de agarosa al 1%. En el carril 0 marcador de peso molecular (WM) de 1kb. 1, Control negativo sin templado NTC. 2, Control Positivo para PCR. 3, Colonia candidata 12h de Ligación. 4, Colonia candidata 24h de Ligación B) Corrimiento electroforético en un gel de Agarosa al 1% de las colonias candidatas restringidas con la enzima MluI/ClaI. En el carril 0 Marcador de peso Molecular (WM) de 1kb. 1, Plásmido sin restringir. 2, plásmido restringido con MluI/ClaI.

Ya que se contaba con el gen de la proteína E2 de VPH-16 con su epítipo de tres hemaglutininas se continuó con la clonación en el plásmido pTracer™-CMV/Bsd. Para lo cual se realizó la amplificación de E2-16 tomando como templado el pSin-3xHAE216 y utilizando unos oligonucleótidos que contenían los sitios de restricción NheI y EcoRI. Posteriormente se realizó la restricción tanto del amplificado 3xHA-E216 como del vector pTracer™-CMV/Bsd y se realizó la ligación sitio dirigida **Figura 13A**. Se obtuvieron tres colonias candidatas las cuales fueron caracterizadas por PCR y restricción enzimática. Como se puede observar en la **Figura 13B**, sólo una de las tres colonias candidatas contenía el gen E2-16, por lo que solamente ésta fue restringida mediante NheI/EcoRI, al realizar esta reacción se obtuvo el patrón de restricción esperado de 1210 pb correspondiente a 3xHA-E216. Ya que se obtuvo una colonia que contenía el gen E2-16, se procedió a secuenciarla con la finalidad de ver la integridad del

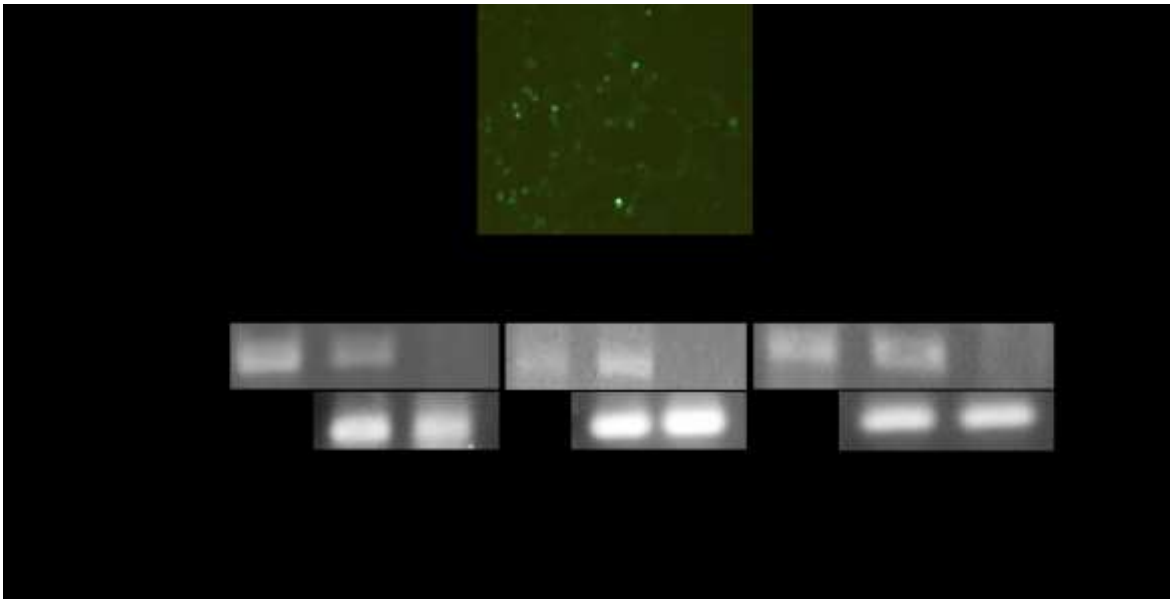
transgen. La secuencia se alineó con la secuencia de E2 reportada en la literatura a nivel de nucleótido y de aminoácidos, mediante la herramienta bioinformática BLAST y se observó la correspondencia con el gen y la proteína E2 de VPH-16 **Figura 13 D y E**



- **Transfección de líneas celulares**

Una vez clonado el gen 3xHA-E216 en el plásmido pTracer<sup>™</sup>-CMV/Bsd, se procedió a realizar las transfecciones estables en las tres líneas celulares, Saos-2 (p53<sup>-/-</sup>), C-33A (p53mut) y RKO (p53<sup>+/+</sup>), con este vector y en cultivos paralelos con el plásmido pTracer<sup>™</sup>-CMV/Bsd-LacZ (control). 48h post-transfección se observaron las células al microscopio de fluorescencia para visualizar la expresión de GFP en las células transfectadas **Figura 14A**, y comenzó la selección con

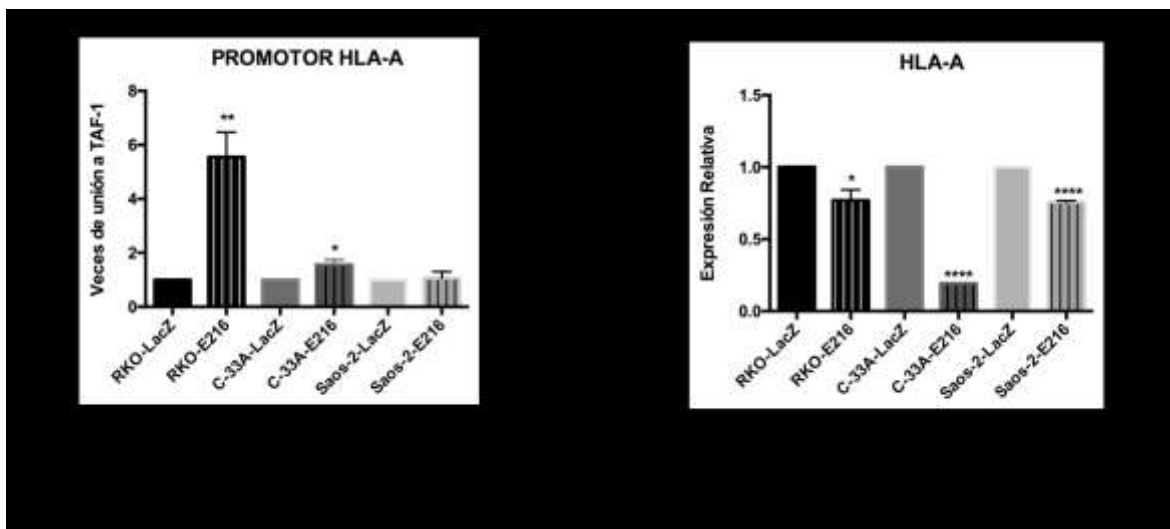
Blasticidina, este antibiótico permitió la producción de líneas estables en aproximadamente 7 días. Transcurrido este tiempo, se analizó la expresión de 3xHA-E216 mediante RT-PCR **Figura 14B**, observando que las tres líneas celulares expresaban el transgen. Los cultivos de cada línea celular establemente transfectados con pTracer™-CMV/Bsd-LacZ fueron mantenidos por los mismos periodos de tiempo que aquellos que expresaban el transgen, y fueron utilizados como control en ensayos paralelos.



## 9.2 Efecto de la presencia de E2 de VPH-16 sobre la unión de TAF-1 en el promotor de HLA-A

Para evaluar el efecto que tiene la presencia de la proteína viral E2 de VPH-16 sobre la unión de TAF-1 a diversos promotores regulados por TAF-1 se realizaron ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina, con un anticuerpo anti-TAF-1. Para evaluar la especificidad de dicho ensayo, se utilizó como control positivo al promotor HLA-A, el cual se ha demostrado presenta una expresión dependiente de la interacción con TAF-1, y como control negativo la cromatina inmunoprecipitada por un anticuerpo no relacionado, anti-IgG de ratón, el cual no

debería de unirse a ninguna proteína celular. Para evaluar la secuencia correspondiente al promotor HLA-A en el inmunoprecipitado, se utilizaron oligonucleótidos específicos que flanquen la región del gen en la cual se ha demostrado se une TAF-1. El ensayo de CHIP se realizó en paralelo con las tres líneas celulares control: Saos-2-LacZ (p53<sup>-/-</sup>), C-33A-LacZ (p53mut) y RKO-LacZ (p53<sup>+/+</sup>). Consideramos a estas líneas celulares los mejores controles de nuestro modelo, ya que fueron creadas de la misma forma que las que expresan el transgen de E2-16, con el mismo método de transfección y la misma selección con Blastidina (tiempo y concentración). En el ensayo también se incluyeron las líneas celulares que expresan a E2-16, Saos-2-E216 (p53<sup>-/-</sup>), C-33A-E216 (p53mut) y RKO-E216 (p53<sup>+/+</sup>), con la finalidad de observar el posible efecto de E2 sobre la unión de TAF-1 al promotor HLA.



El ensayo de Inmunoprecipitación de Cromatina resultó ser específico y validado, ya que la región de unión de TAF-1 en el gen HLA, estuvo presente en el material inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-TAF-1, mientras que estuvo ausente en el material inmunoprecipitado con el anticuerpo no relacionado.

Uno de los primeros resultados que arrojaron los ensayos de CHIP fue que TAF-1 se une al promotor de HLA-A en las tres líneas celulares LacZ sin importar el estado de p53. Sin embargo, al realizar el experimento en presencia de E2-16, se observó que la línea RKO (p53<sup>+/+</sup>) presentaba una mayor afectación en la unión



de TAF-1 al promotor HLA-A, aumentando aproximadamente 5 veces **Figura 15A**. Por el contrario, la línea celular que presentaban un ambiente p53 mutado presentaban una modificación sutil en dicha unión, mientras que la presentaba un ambiente sin p53 no presentaba cambio alguno.

Al observar este fenómeno a nivel de promotor, se decidió conocer las consecuencias funcionales de éste en la expresión de HLA-A y determinar la magnitud del efecto en caso de que existiera por medio de qRT-PCR. En este ensayo se utilizó la expresión del gen endógeno actina como calibrador y las tres líneas celulares RKO-E216 (p53<sup>+/+</sup>), C-33A-E216 (p53mut) y Saos-2-E216 (p53<sup>-/-</sup>) que expresan LacZ como controles del experimento.

Los resultados de este ensayo mostraron que no existe una correlación directa entre los cambios inducidos por la expresión de E2 en la unión de TAF-1 y los niveles de expresión de HLA-A. Como se puede observar en la **Figura 15B**, tanto la línea celular que presenta p53wt como la que no lo presenta, mostraron una disminución de la expresión de HLA-A de aproximadamente un 25% con referencia a su LacZ, mientras que la línea celular p53 mut mostró una disminución del 75%.

Con base en estos resultados se dedujo que el ensayo de ChIP era confiable y específico y que la presencia de E2 modifica la unión de TAF-1 por el promotor de HLA-A y que esta afectación es más marcada en un ambiente p53<sup>+/+</sup>, pero que esta unión no repercute de manera directa, ni proporcional en la expresión del gen. Por otro lado, se observó que E2 tiene un efecto diferencial en la expresión de HLA-A dependiendo del ambiente p53 de la célula.

### **9.3 Efecto de la presencia de E2 de VPH-16 sobre la unión de TAF-1 a promotores de genes involucrados en ciclo celular**

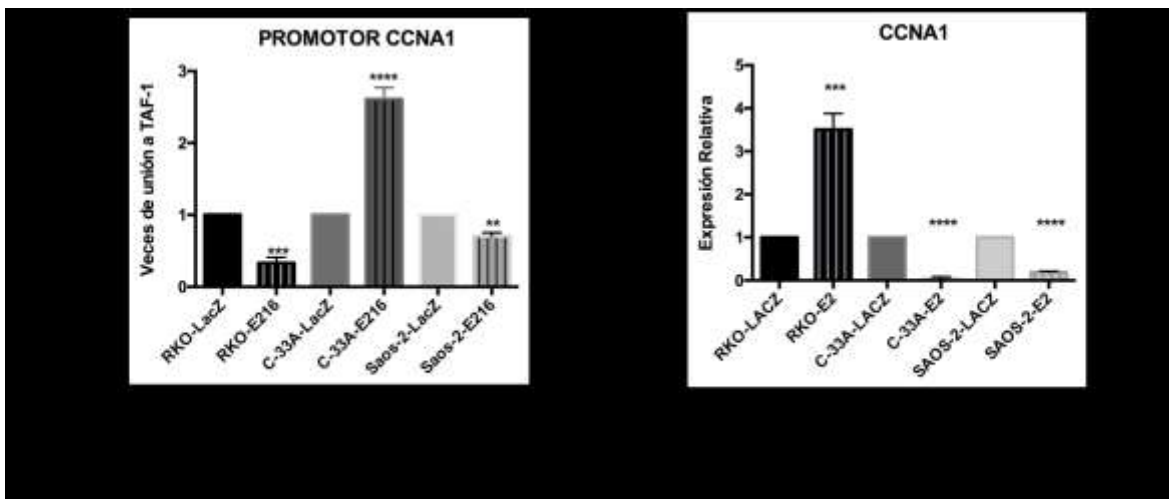
Para observar el efecto que E2 tiene sobre la unión de TAF-1 a promotores de genes involucrados en ciclo celular se eligieron dos genes, ciclina A1 y D. Las

proteínas codificadas por estos genes pertenecen a una familia altamente conservada, cuyos miembros están caracterizados por una periodicidad dramática en la abundancia proteica a lo largo del ciclo celular. Las diferentes ciclinas muestran diversos patrones de degradación y expresión, los cuales contribuyen a la coordinación temporal de cada evento mitótico.

La ciclina A se une a CDK2 y CDC2, éstas proteínas tienen dos distintas actividades cinasa, una al inicio de la fase S y la otra en G2, por lo tanto, puede regular funciones separadas en el ciclo celular. Esta ciclina también se une a importantes reguladores del ciclo celular, como las proteínas pertenecientes a la familia de Rb, al factor de transcripción E2F-1 y a proteínas de la familia de p21.

Por otro lado, la ciclina D forma un complejo con CDK4 o CDK6 y funciona como una subunidad regulatoria, la cual es requerida para la transición G1/S del ciclo celular. Esta ciclina también interactúa con el supresor de tumor Rb y la expresión de este gen es regulada positivamente por Rb (información proporcionada de RefSeq para GenBank, Jul 2008).

Considerando la importancia que tienen estas dos ciclinas en el ciclo celular y siendo genes regulados por TAF-1 y una de ellas dependiente también de p53, la ciclina A1; se decidió evaluar de qué manera la presencia de E2-16 podría afectar la unión de TAF-1 a los promotores de estos genes y si el estado de p53 influiría en ese fenómeno. Para este fin, se realizó la técnica de ChIP utilizando el anticuerpo anti-TAF-1 y oligonucleótidos específicos para la zona de unión de TAF-1 en el promotor del gen de la Ciclina A1.

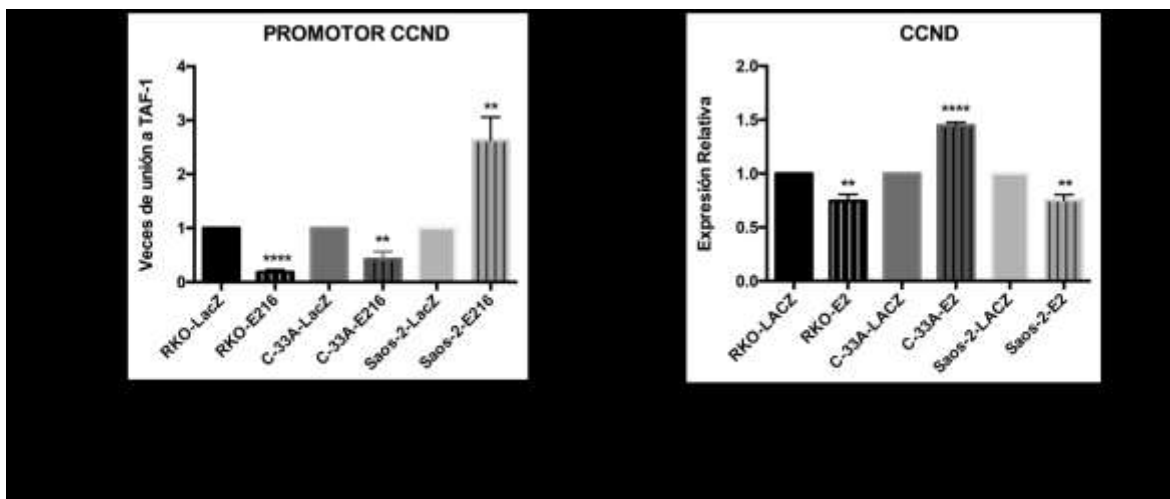


Los resultados obtenidos mediante el ensayo de ChIP, indicaron que tanto la línea que posee p53wt (RKO) como aquella en la que p53 está ausente (Saos-2) presentaron una disminución en la afinidad de TAF-1 por el promotor de Ciclina A1, RKO-E216 p53<sup>+/+</sup> de aproximadamente 60% y Saos-2-E216 p53<sup>-/-</sup> de aproximadamente un 20%, todo esto respecto a su respectivo control LacZ. Sin embargo, la línea que presenta p53 mut, C-33A-E216 presentó un incremento en la unión de TAF-1 de 2.5 veces respecto a su correspondiente línea control LacZ

### **Figura 16A.**

El análisis de expresión por qRT-PCR realizado para conocer el efecto de estas variaciones de la unión de TAF-1 en la expresión de CCNA1 en presencia de E2-16, indicó que la línea p53<sup>+/+</sup> que presentaba una menor unión de TAF-1, tenía una mayor expresión, de 2.5 veces, respecto a su control LacZ; que la línea p53 mut la cual presentó una mayor unión de TAF-1, mostraba un abatimiento total en cuanto a la expresión; y que la línea p53<sup>-/-</sup> la cual presentaba disminución de la unión de TAF-1, se expresaba un 15% más que su correspondiente línea LacZ

**Figura 16B.** Cabe mencionar que los Ct de amplificación de este gen en todas las líneas analizadas son muy altos (Ct 32 a 35), lo que sugiere que de forma basal los niveles de expresión de este gen son relativamente muy bajos.



En cuanto al gen de Ciclina D, se observó que la presencia de E2 afecta la unión de las tres líneas celulares respecto a sus propios controles. Sin embargo, las dos líneas que expresan a p53 ya sea en su forma silvestre o mutada, muestran una

disminución de la afinidad de TAF-1 por el promotor de CCND del 80% y 60% respectivamente; mientras que la línea en donde p53 está ausente, muestra una unión de más del doble, respecto a su control LacZ **Figura 17A**.

En cuanto a las consecuencias a nivel de expresión se observó que la línea RKO-E216 que presenta una baja cantidad de TAF-1 unida al promotor CCND, presenta una sutil disminución del 20% en su expresión; por otro lado en la línea C-33A-E216, en donde se observó una disminución de la unión de TAF-1 hasta alrededor del 40%, presentó una mayor expresión de CCND, de casi un 50% respecto a C-33A-LacZ; mientras que la línea celular carente de p53 Saos-2-E2 en la que se mostró una mayor unión de TAF-1, los niveles de expresión son 25% menores que los observados en su control Saos-2-LacZ **Figura 17B**.

Con base en los resultados anteriores se sugiere que los genes involucrados en ciclo celular, ciclina A1 y D cambian su expresión en presencia de E2 y que, aunque los niveles de TAF-1 asociado a sus promotores también se modifican, en la mayoría de los casos no existe una relación directa entre ambos eventos. Algunas excepciones se observan en Saos-2-E216 en el gen CCNA1 y de RKO-E216 en el gen CCND, en donde existe una ligera correlación unión-expresión.

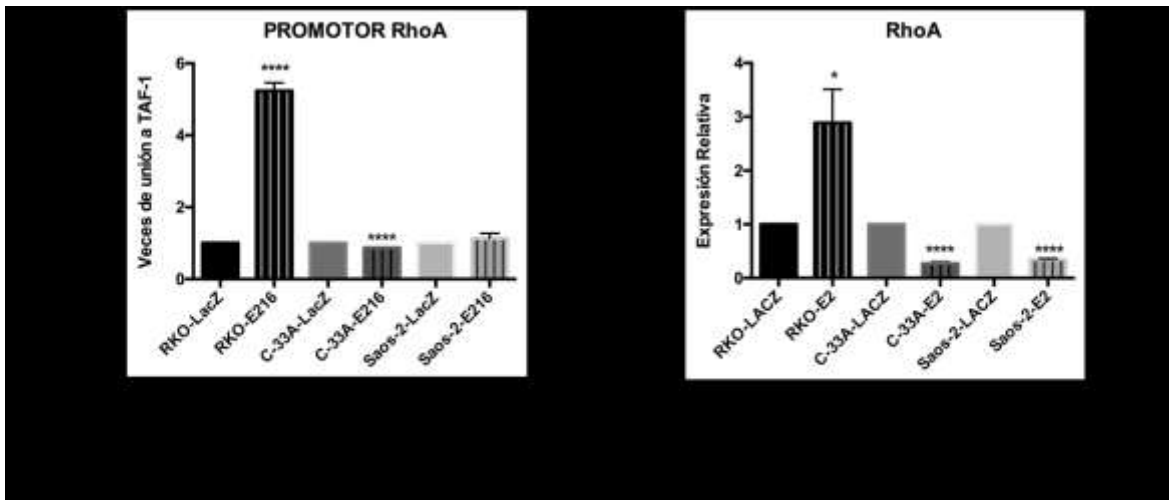
#### **9.4 Efecto de la presencia de E2 de VPH-16 sobre la unión de TAF-1 a promotores de genes involucrados en crecimiento celular y proliferación**

También se evaluó el impacto de la presencia de E2 sobre la unión de TAF-1 en genes involucrados en crecimiento celular y proliferación, así como en la expresión de los mismos; los genes seleccionados fueron RhoA y Src.

RhoA es un gen que codifica para un miembro de la familia Rho de GTPasas, el cual cicla entre sus diferentes estados, unido a GDP muestra un estado inactivo y unido a GTP un estado activo, por lo que funciona como un “switch molecular” en diversas cascadas de transducción de señales. Las proteínas Rho promueven la reorganización del citoesqueleto de actina, regulan la forma de la célula y la

motilidad. La sobre-expresión de este gen se asocia con proliferación celular tumoral y metástasis (información proporcionada de RefSeq para GenBank, Sep 2015).

Con base en la importancia de RhoA en proliferación celular y la dependencia de su promotor a TAF-1, se evaluó si la proteína viral E2-16 afectaba la unión de TAF-1 a este promotor y si este fenómeno podría tener repercusiones en la expresión.

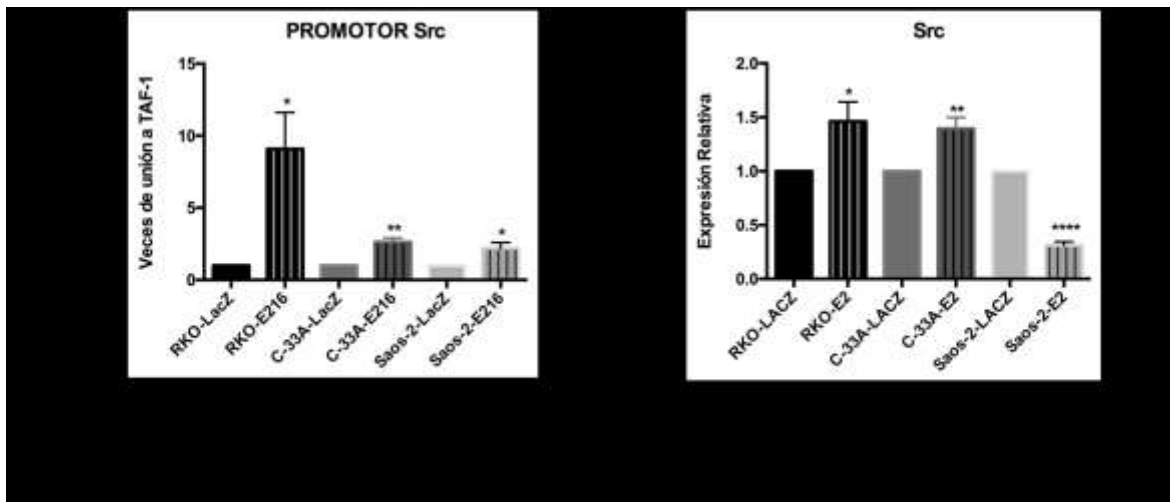


Los resultados mostraron que la presencia de la proteína viral E2-16 afectaba drásticamente la unión de TAF-1 al promotor de RhoA en un ambiente  $p53^{+/+}$ , al incrementarse 4 veces su afinidad con respecto a RKO-LacZ. La línea celular  $p53$  mut presentó una ligera disminución, pero significativa estadísticamente, de la afinidad de TAF-1. Mientras que la Saos-2-E216 no presentó cambio significativo respecto a su control **Figura 18A**.

Por otro lado, la presencia de E2 modificó la expresión de RhoA en las tres líneas celulares, sin embargo, esta modificación fue diferente en cada contexto celular. La línea celular que expresa  $p53^{+/+}$  presentó una relación unión-expresión dependiente, observándose un aumento de casi el doble de la expresión respecto a su LacZ; en cuanto a la línea celular C-33A-E2 en donde se observó una ligera disminución de la unión de TAF-1, se vio una disminución menor al 50% en comparación de su control; y por último la línea celular que tiene un ambiente sin

p53 en donde no se presentó modificación de la unión de TAF-1, se observó una disminución de aproximadamente 40% respecto a Saos-2-LacZ **Figura 18B**.

Otro gen analizado fue Src, el cual es considerado un proto-oncogén, que juega un papel fundamental tanto en la regulación del desarrollo embrionario como en el crecimiento celular en células somáticas; la proteína codificada por este gen es una tirosin-cinasa cuya actividad puede ser inhibida mediante la fosforilación de c-SRC (información proporcionada de RefSeq para GenBank, Jul 2008).



Los resultados observados en el ensayo de CHIP mostraron que TAF-1 se une más al promotor de Src en presencia de E2-16 en las tres líneas celulares, sin embargo, se observó mayor unión en la línea celular cuyo ambiente es p53<sup>+/+</sup>, ya que aumentó alrededor de 8 veces respecto a RKO-LacZ; en cambio en las líneas cuyo ambiente celular es p53 mut y p53<sup>-/-</sup> el incremento en la unión fue únicamente de aproximadamente 3 veces, en comparación con su respectivo control **Figura 19A**.

Por otro lado, la expresión de Src también se vio afectada por la presencia de E2, sin embargo, cada contexto p53 se modificó de forma particular, las líneas celulares RKO-E216 y C-33A-E216 aumentaron un 50% su expresión respecto a cada uno de sus controles, mientras que la línea en donde no se encuentra presente p53 disminuyó alrededor de un 60% respecto a su LacZ **Figura 19B**.

Fundamentado en los resultados anteriores se puede decir que al menos en estos dos genes relacionados con crecimiento celular y proliferación, el patrón de

modificación por la presencia de E2 no es similar, y que la expresión de ambos genes en la mayoría de los casos, no parece depender de la unión de TAF-1. Algunas excepciones se observaron para el caso de RKO-E216, en el que existe correlación entre la unión y la expresión en ambos genes; así como en el gen de Src para C-33A-E216.

## 9.5 Efecto de la presencia de E2 de VPH-16 sobre genes regulados por TAF-1 y p53

Considerando la importancia de la regulación transcripcional de p53, en este trabajo se incluyeron dos genes que se encuentran bajo regulación natural de TAF-1 y p53, estos genes son GADD45A y 14-3-3- $\tau$ .

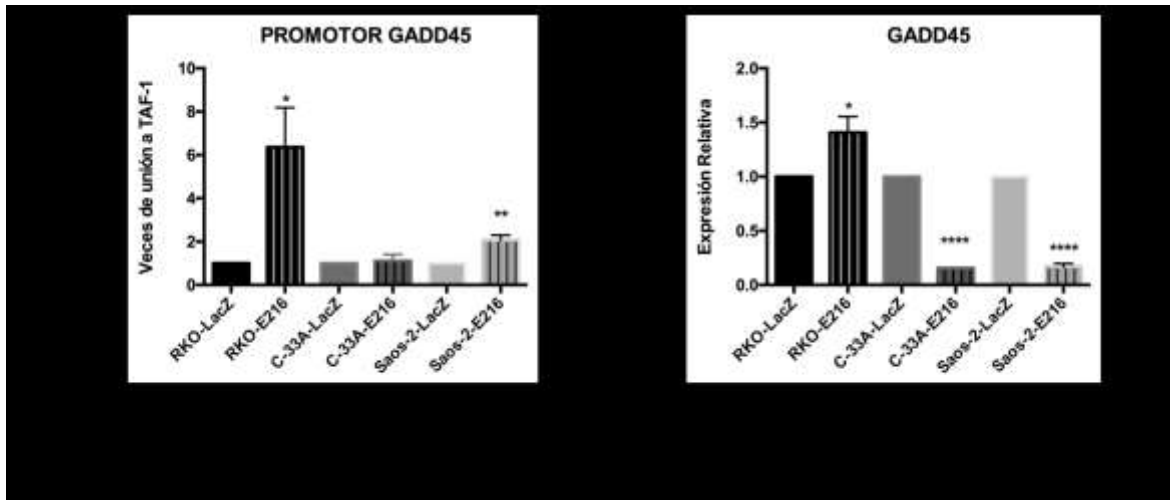
GADD45A es miembro de un grupo de genes cuyos transcritos se incrementan como respuesta a condiciones de estrés, arresto en el crecimiento y tratamiento con agentes dañinos para el DNA. La transcripción de este gen inducida por daño al DNA es mediada por mecanismos tanto dependientes como independientes de p53 (información proporcionada de RefSeq para GenBank, Dic 2010).

En relación a todos los procesos en los que interviene GADD45A, pero sobretodo la importancia que tienen éstos en el destino de la célula, se evaluó si la presencia de E2-16 afectaba la regulación de este gen a través de su unión con el factor de transcripción TAF-1 y si un ambiente con diferente estado de p53 podría contribuir a este fenómeno.

Los resultados del ensayo de CHIP mostraron que la presencia de E2 afectó la unión de TAF-1 al promotor GADD45A en las líneas celulares que presentan un estado p53<sup>+/+</sup> y p53<sup>-/-</sup>. Sin embargo, de éstas dos líneas, la línea con mayor grado de afectación fue RKO-E216, ya que TAF-1 se unió 5 veces más que en su correspondiente línea LacZ, mientras que Saos-2-E216 sólo mostró una unión del doble en comparación con Saos-2-LacZ **Figura 20A**.

En cuanto a la expresión del gen GADD45A se observó que en la única línea en la que este gen se sobre-expresa en presencia de E2 fue RKO-E216, mostrando

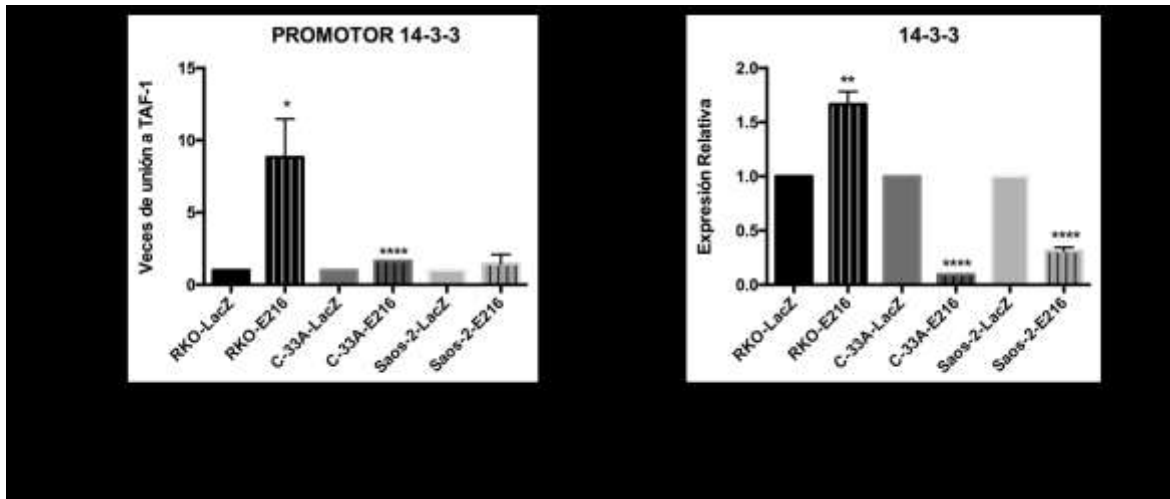
un 50% más que su correspondiente línea LacZ control. Por otro lado, las células que presentaban un ambiente carente de p53 o con p53 mutado tuvieron una represión cercana al 80% con respecto a cada una de sus líneas controles LacZ **Figura 20B.**



En cuanto al gen 14-3-3 $\tau$ , se sabe que pertenece a una familia de proteínas cuyas actividades están involucradas en la regulación del destino de la célula, a través de la unión fosfo-dependiente a un gran número de proteínas que son marcadas por varias clases de cinasas. Las proteínas 14-3-3 tienen roles particularmente importantes en la coordinación de la progresión de la célula a través del ciclo celular, regulando su respuesta a daño e influyendo en las decisiones vida-muerte provocadas por daño interno o externo (Gardino & Yaffe, 2011). Al formar parte este gen de esta familia, cuyas funciones son de suma importancia para el destino de la célula, se decidió evaluar si la proteína E2-16 afectaba su regulación, mediante la modificación de la unión de TAF-1 a su promotor, y si al ser blanco directo de p53, el estado de éste también contribuiría a este fenómeno.

Los resultados obtenidos del ensayo de ChIP mostraron que la línea RKO-E216 presentó mayor unión de TAF-1 al promotor de 14-3-3 $\tau$ , al incrementarse aproximadamente 8 veces con respecto a RKO-LacZ; C-33A-E216 mostró también un aumento, aunque menos radical que RKO, de casi el doble de unión de su LacZ; y Saos-2-E216 no mostró un cambio significativo en la unión de TAF-1 **Figura 21A.**





En cuanto al ensayo de qRT-PCR, la línea celular cuyo contexto es p53wt mostró un incremento en la expresión de más del 50% con respecto a su control, mientras que las líneas celulares con contexto p53 mutado o ausente mostraron una represión en la expresión de 14-3-3 $\tau$ . Sin embargo, el efecto se vio más marcado en C-33A-E216 que en Saos-2-E216, ya que en la primera línea se reprimió la expresión hasta un 15%, mientras que la segunda línea tuvo una disminución de aproximadamente un 55%, respecto a sus propios controles **Figura 21B.**

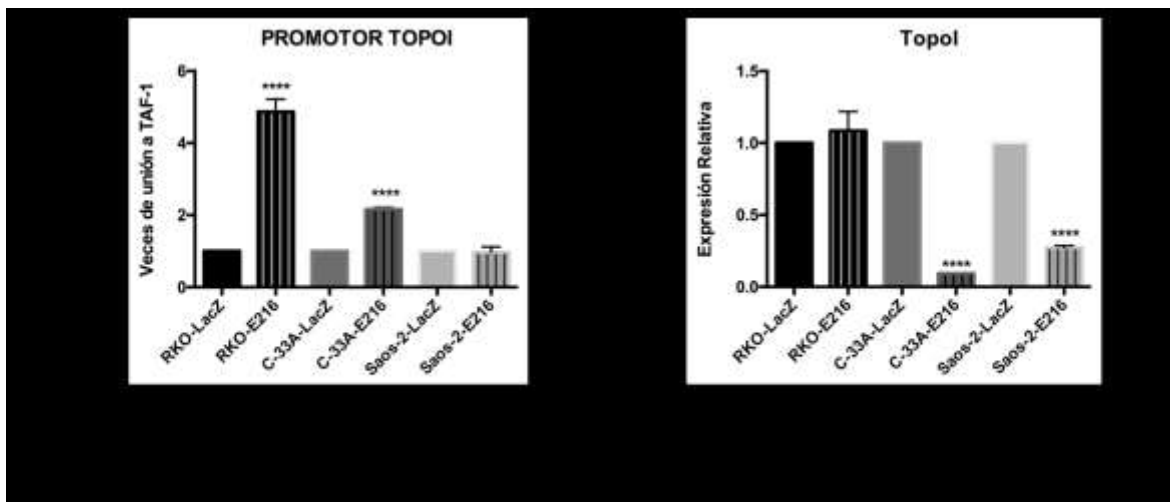
De acuerdo con los resultados anteriores se puede decir que los dos genes regulados por TAF-1 y p53 presentan el mismo patrón de afectación en presencia de E2-16, observando una correlación unión-expresión en la línea p53<sup>+/+</sup> y en las líneas donde p53 no se encuentra o está mutado se presenta un ligero aumento en la unión de TAF-1, pero una represión en la expresión.

## 9.6 Efecto de la presencia de E2 de VPH-16 sobre el gen Topoisomerasa I

El último gen evaluado fue el de la Topoisomerasa I, el cual codifica para la DNA topoisomerasa I, que es una enzima que controla y altera los estados topológicos del DNA durante el proceso de transcripción. Esta enzima cataliza la apertura y el cierre de una sola hebra del DNA, lo cual permite que las hebras pasen unas a

través de otras, alterando así la topología del DNA (información proporcionada de RefSeq para GenBank, Jul 2008).

Siendo la replicación del DNA un proceso esencial para la célula y la Topoisomerasa I un elemento clave en dicho proceso, se evaluó si la presencia de la proteína viral E2-16 podría afectar su regulación dependiente de TAF-1 y si el estado de p53 podría influir en esta regulación, siendo también el gen Topo I blanco directo de p53.



El ensayo de ChIP mostró que TAF-1 aumenta su afinidad por el promotor de la DNA Topoisomerasa I en presencia de E2-16 sólo en las líneas celulares que contienen a p53 ya sea wt o mutado, sin embargo el grado de unión fue diferente en las dos líneas, ya que la línea RKO-E216 presentó un incremento de 4 veces en la unión del factor, con respecto a su control, mientras que en la línea C-33A-E216, el incremento en la unión de TAF-1 fue únicamente del doble, en comparación con C-33A-LacZ **Figura22A**. Sin embargo, al realizar el ensayo de qRT-PCR se observó que en la línea p53<sup>+/+</sup>, la cual presentó un mayor incremento en la unión de TAF-1, la expresión del gen Topo I no se vio afectada por la presencia de E2; en cambio las líneas celulares C-33A-E216 y Saos-2-E216 que presentaron un ligero aumento o no presentaron afectación en cuanto a la unión de TAF-1, mostraron una disminución del 80% y del 60% respectivamente en comparación con sus controles LacZ **Figura22B**.

Con base en los resultados obtenidos en estos ensayos, se puede decir que la afectación en la expresión de TOPO I a causa de la presencia de E2-16 no es dependiente de la unión de TAF-1 a su promotor.

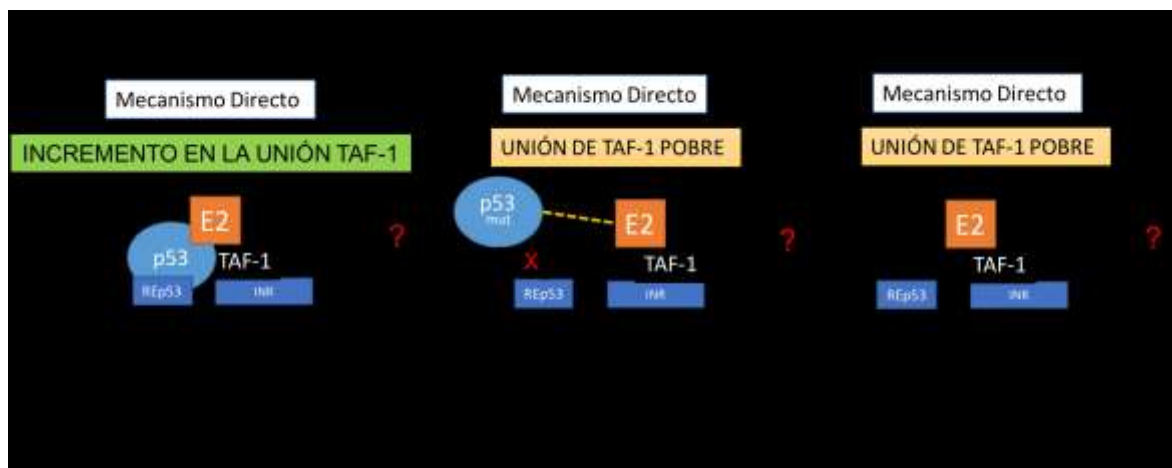
## 10. DISCUSIÓN

La proteína E2 de VPH-16 es de suma importancia para el virus debido a sus múltiples funciones durante su ciclo replicativo. Sin embargo, su presencia en la célula huésped impacta también la expresión génica de una forma global sin dañar radicalmente procesos celulares (Vosa et al. 2012). El mecanismo por el que E2 regula la expresión génica no ha sido perfectamente entendido, pero se sugiere que podría ser en parte debido a su interacción física con una variedad de proteínas celulares a través de sus diferentes dominios. Entre la diversidad de proteínas interactoras de E2 existe un grupo que se encuentra implicado importantemente en el proceso de Transcripción (Muller and Demeret 2012). Este proceso celular que lleva a la síntesis de RNA, es el primer evento de la expresión génica y comprende diferentes pasos, que son dependientes unos de otros para asegurar que suceda de manera correcta y adecuadamente regulada. Un factor muy relevante que regula el ensamblaje del Complejo de Preiniciación, es TAF-1 (Wassarman and Sauer 2001). Trabajo previo en nuestro grupo de trabajo, permitió descubrir que el dominio de unión al DNA de la proteína viral E2 de VPH16, interactúa con el dominio cinasa amino-terminal de TAF-1, generando consecuencias funcionales sobre la actividad transcripcional de E2 (Centeno et al. 2008). Por otro lado, E2 también interactúa con la proteína celular p53, un supresor de tumor cuya función principal es la regulación transcripcional. Esta interacción sucede entre el dominio de oligomerización y de unión al DNA de la proteína celular y el dominio C-terminal de la proteína viral (Massimi et al. 1999). En nuestro grupo de investigación, García Venzor demostró que la expresión de E2 de VPH-16 en la línea celular C-33A mediante infección con adenovirus recombinantes, modifica la función de TAF-1, provocando cambios en su unión a diversos promotores celulares con una consecuencia directa sobre la expresión de estos genes. Sin embargo, se desconoce si la presencia y el estatus de la proteína p53 en la célula, juega algún papel sobre los efectos que E2 ejerce en la unión de TAF-1 a promotores celulares y sobre la expresión de estos genes,

sobre todo a tiempos mayores de 48 horas. En el presente trabajo se observó que la presencia de E2 por largos períodos de tiempo, afecta la expresión de diversos genes dependiendo del estado de p53 y que, en la mayoría de los casos, esta afectación no se encuentra relacionada con la unión de TAF-1, sugiriendo que la regulación de la expresión de los genes dependientes de TAF-1 se va perdiendo conforme al tiempo de presencia de E2 en la célula.

## 10.1 Análisis de la unión de TAF-1 en blancos transcripcionales de p53 en presencia de E2 de VPH-16

Los resultados obtenidos en los ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina, sugieren la existencia de diversos mecanismos por los cuales TAF-1 se une a sus sitios en los promotores. En el caso de los genes blanco de p53 incluidos en este trabajo, como GADD45A, 14-3-3 $\tau$  y Topoisomerasa I, se observó que la presencia de E2 genera un incremento en la unión de TAF-1 hacia sus promotores en un ambiente en el que la proteína p53 se encuentra normal (p53wt), encontrándose aumentos muy importantes que van desde 4 hasta alrededor de 8 veces de unión.



Por otro lado, estos mismos genes en ambientes celulares p53 mutado o ausente, presentan una pobre unión de TAF-1, en el mejor caso de hasta 1 vez más. Para poder explicar los diferentes fenómenos observados, se proponen tres distintos mecanismos, los cuales difieren del estado celular de p53 **Figura 23**. El primero de estos mecanismos, sugiere que al ser genes dependientes de p53 que poseen

elementos de respuesta a esta proteína en su promotor, ésta se una a sus sitios responsivos, provocando el reclutamiento de TAF-1 al elemento iniciador del promotor. Este reclutamiento se ve altamente favorecido por la presencia de la proteína viral E2 de VPH-16, posiblemente debido a una asociación física entre estas proteínas. El segundo mecanismo que proponemos corresponde a aquel que sucedería en estos mismos genes responsivos a p53 por la presencia de elementos de respuesta en su promotor, en un ambiente celular en el que el gen p53 se encuentra mutado. En este caso se sugiere que la proteína p53 mutada no es funcional, por lo que no puede unirse a sus sitios responsivos, por lo que se genera una interacción entre p53, E2 y TAF-1 más débil. Un último mecanismo en este tipo de promotores en un ambiente ausente de p53, implica que la interacción entre TAF-1 y E2 de VPH-16 sería aún más pobre, debido a la ausencia de p53. En estos dos últimos mecanismos, la pobre interacción que existe entre las proteínas celulares con la proteína viral, conlleva a una disminución en la unión de TAF-1 a su sitio en el promotor.

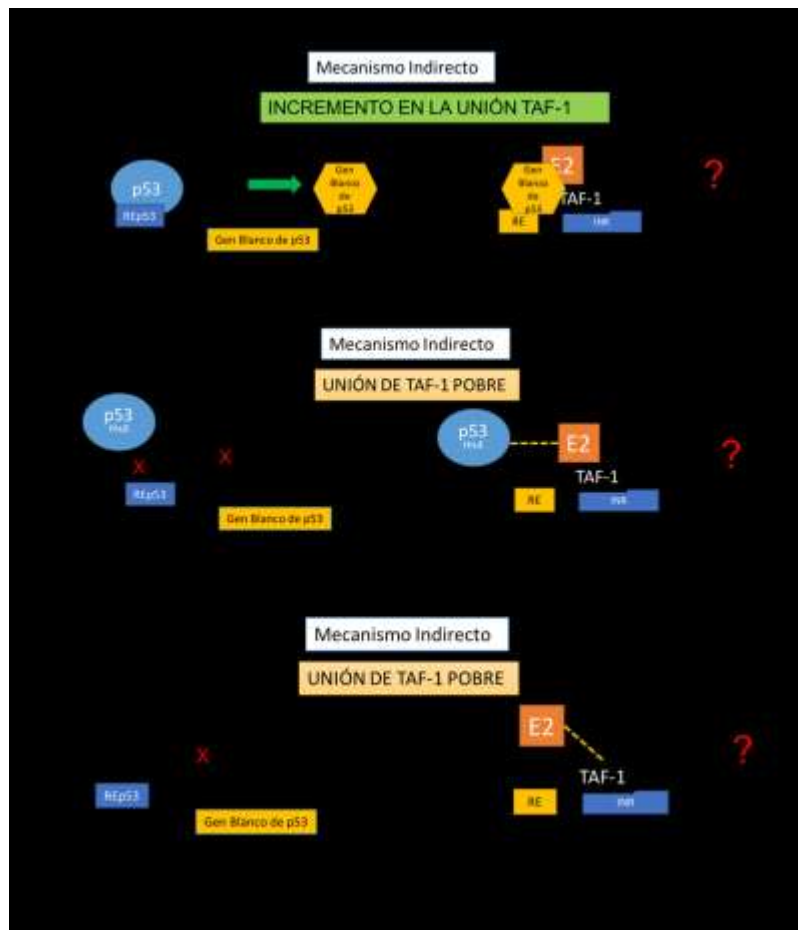
En apoyo a estos modelos, se ha reportado que la acetilación de la lisina 373 y 382 de p53, promueve la activación de la transcripción de algunos de sus genes blancos, ya que fomenta el reclutamiento de TAF-1 al promotor a través de sus bromodominios (Li et al. 2007). Por otro lado, E2 interactúa con diversas acetiltransferasas, como PCAF ó CBP (Muller and Demeret 2012), que modifican tanto a la proteína p53 como a las histonas. Por lo que se podría suponer que la proteína E2 de forma indirecta fomenta la acetilación de p53 y con esto el reclutamiento de TAF-1 a los promotores de sus genes blanco.

Con base en los anterior, se puede sugerir que un ambiente p53 funcional favorece importantemente la unión de TAF-1 en presencia de E2.

## 10.2 Análisis de la unión de TAF-1 en promotores carentes de elementos de respuesta a p53 en presencia de E2 de VPH-16

En el caso de genes que no son blancos transcripcionales directos de p53, debido a la ausencia de sitios consenso de unión para ésta proteína en sus promotores, como son RhoA, Src y HLA-A, se observó también un incremento en la unión de TAF-1 a sus promotores que van desde 4 hasta 8 veces en presencia de p53wt; por otro lado, en presencia de p53 mutada o donde se encuentra ausente, se presentaron uniones pobres de TAF-1, de prácticamente 1 vez.

Con base en los anterior se sugieren tres mecanismos, dependiendo del estado de p53, en los cuales p53 afecta la unión de TAF-1 al promotor de forma indirecta



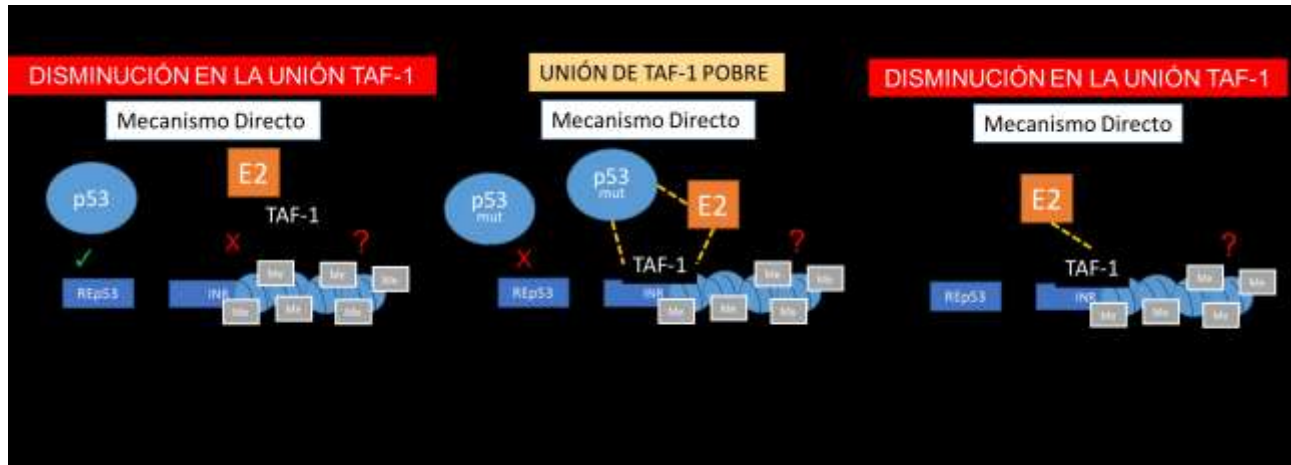
en presencia de E2 de VPH-16 **Figura 24**.

En un ambiente celular en presencia de p53wt, genes que codifiquen para ciertos factores de transcripción y que poseen elementos de respuesta a esta proteína en su promotor, podrían ser activados transcripcionalmente por p53. La presencia de alguno de estos factores (probablemente con afinidad por E2) incrementarían la estabilidad del complejo TAF-1 y E2; la presencia de sitios de unión para estos factores transcripcionales en los promotores generarían una mayor afinidad de TAF-1 por esos genes. Por otro lado, en presencia de p53 mutada o ausente, los complejos son inestables debido a la carencia de él o de los factores de transcripción que son blancos transcripcionales de p53, provocando una carencia de unión de TAF-1 al promotor. Existen diferentes factores de transcripción cuyos genes son activados directamente por p53 y que pudieran estar aumentando la estabilidad de este complejo, como por ejemplo ATF3 (Wei et al. 2006).

### **10.3 Análisis de la unión de TAF-1 al promotor de Ciclina A1 en presencia de E2 de VPH-16**

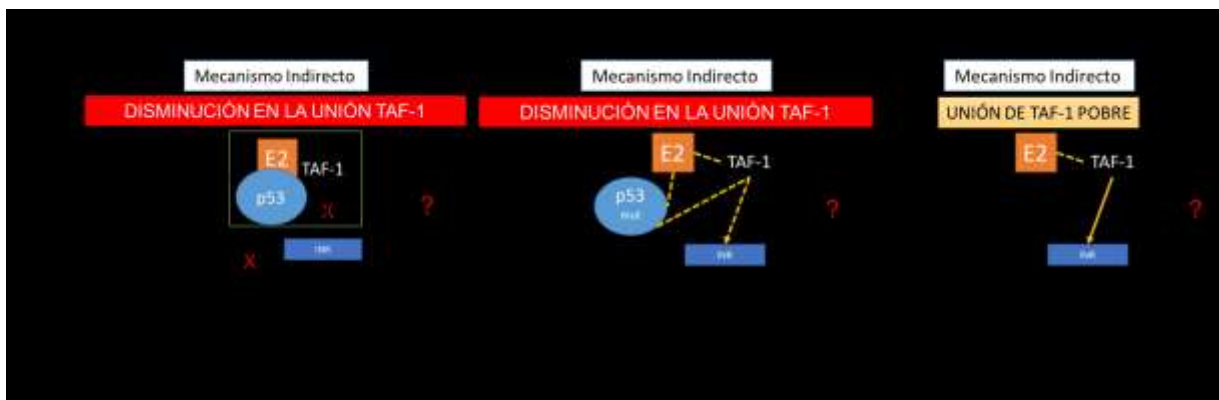
El caso del gen de Ciclina A1 mostró un comportamiento peculiar, ya que sólo se observó un aumento en la unión de TAF-1 a su promotor en un ambiente p53 mutado; dicho aumento es pobre comparado con los incrementos observados en los casos anteriores. Sin embargo, diversos reportes han propuesto que Ciclina A1 es un gen con actividad transcripcional débil, debido a su estado de hipermetilación en muchas células somáticas (Tokumaru et al., 2004). Con base en lo anterior se sugiere que en ausencia total y en presencia de p53wt, E2 de VPH-16 interactúa con TAF-1, y siendo Ciclina A1 un gen con baja actividad transcripcional por las marcas epigenéticas, sucede una pobre ó nula unión de TAF-1 al promotor. A diferencia de estos mecanismos, en presencia de la proteína p53 mutada, ésta se une pobremente a TAF-1 y a E2 liberando parcialmente a TAF-1 del secuestro por E2, y fomentando sutilmente su unión al promotor **Figura 25**.





### 10.4 Análisis de la unión de TAF-1 al promotor de Ciclina D1 en presencia de E2 de VPH-16

El caso de Ciclina D1 es muy particular, ya que se trata del único promotor en el que se observó un ligero aumento (1.5 veces), en la unión de TAF-1 en ausencia total de p53. Por otro lado, se observó que la unión de TAF-1 se incrementaba conforme se perdía la funcionalidad de p53, siendo el contexto p53wt el de menor unión de TAF-1. Cabe destacar que el gen de la Ciclina D1 no posee elementos de respuesta a p53, por lo que se considera independiente transcripcionalmente de ella. Tomando como base los fenómenos observados, se plantearon los mecanismos esquematizados en la **Figura 26**.



En un ambiente p53 funcional, se formaría un complejo entre la proteína viral E2, p53 y TAF-1; sin embargo, al no haber elementos de respuesta para p53 en el promotor de Ciclina D, se favorecería el reclutamiento de TAF-1 hacia otros promotores, por ejemplo, a genes responsivos a p53.

En cambio, en un ambiente p53 mutado, se formaría el complejo antes mencionado, pero al contener una proteína p53 defectiva, este sería más lábil; promoviendo la ligera liberación de TAF-1 y su respectiva unión al iniciador del promotor.

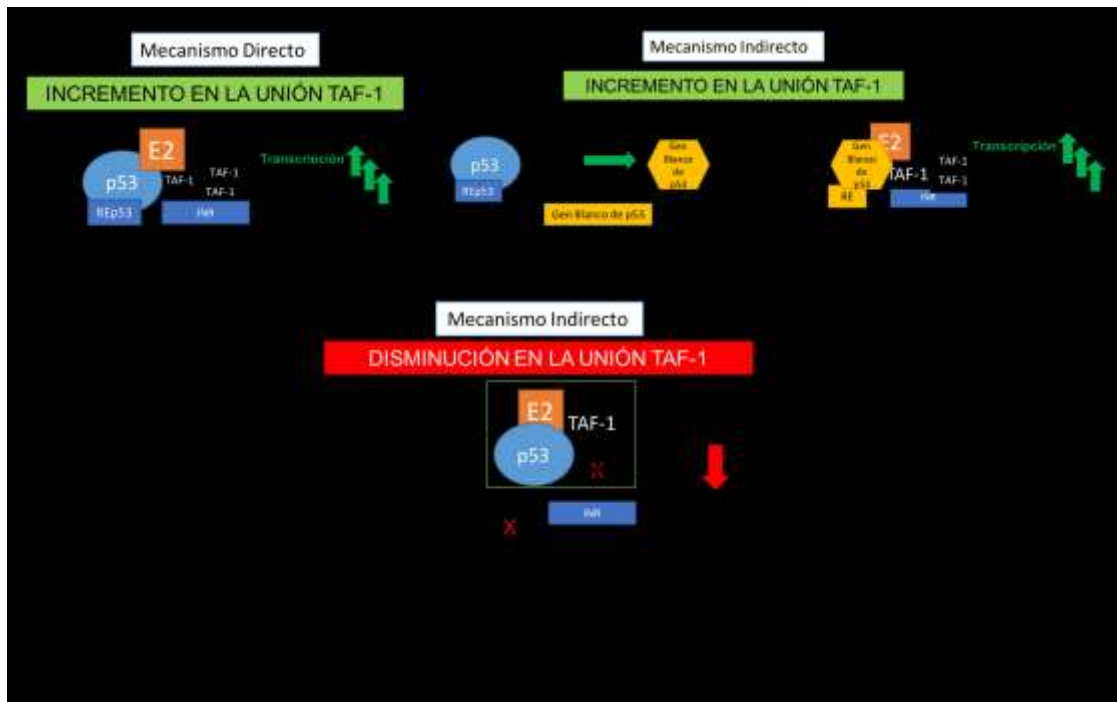
Por último, en ausencia de la proteína celular p53, se formaría un complejo menos estable entre E2 y TAF-1, promoviendo su completa liberación del secuestro en el que se encontraba y con esto aumentado su unión al promotor.

### **10.5 Genes en donde existe una correlación entre la unión de TAF-1 y su Expresión en un ambiente p53wt en presencia de E2 de VPH-16**

Existen tres escenarios en los que se observó una clara correlación entre la unión de TAF-1 y la expresión génica **Figura 27**. El primero de estos corresponde a los genes que poseen en sus promotores elementos de respuesta a p53, GADD45A y 14-3-3 $\tau$ , en donde se observó un aumento en la unión de TAF-1 posiblemente a consecuencia del reclutamiento directo de p53 hacia sus elementos de respuesta; esto generó un incremento en la actividad transcripcional de 50% y 75% respectivamente. Otro grupo de genes en los que se observó una correlación similar fueron algunos de los genes que son regulados de manera indirecta por p53 (en los que no existen elementos de respuesta a esta proteína), en donde se propuso que p53 activa transcripcionalmente a uno de sus blancos, que una vez traducidos estabilizan la unión de TAF-1 con E2 de VPH-16, a través de su unión directa, provocando un aumento en la unión de TAF-1 y con esto su activación transcripcional.

A diferencia de los dos mecanismos anteriores, en Ciclina D se observó una disminución en su transcripción, como consecuencia de la poca unión de TAF-1,

esto debido a la inestabilidad del Complejo TAF-1-E2-p53 por la falta de sitios responsivos a p53 en este promotor, conllevando al secuestro del complejo hacia otros genes.

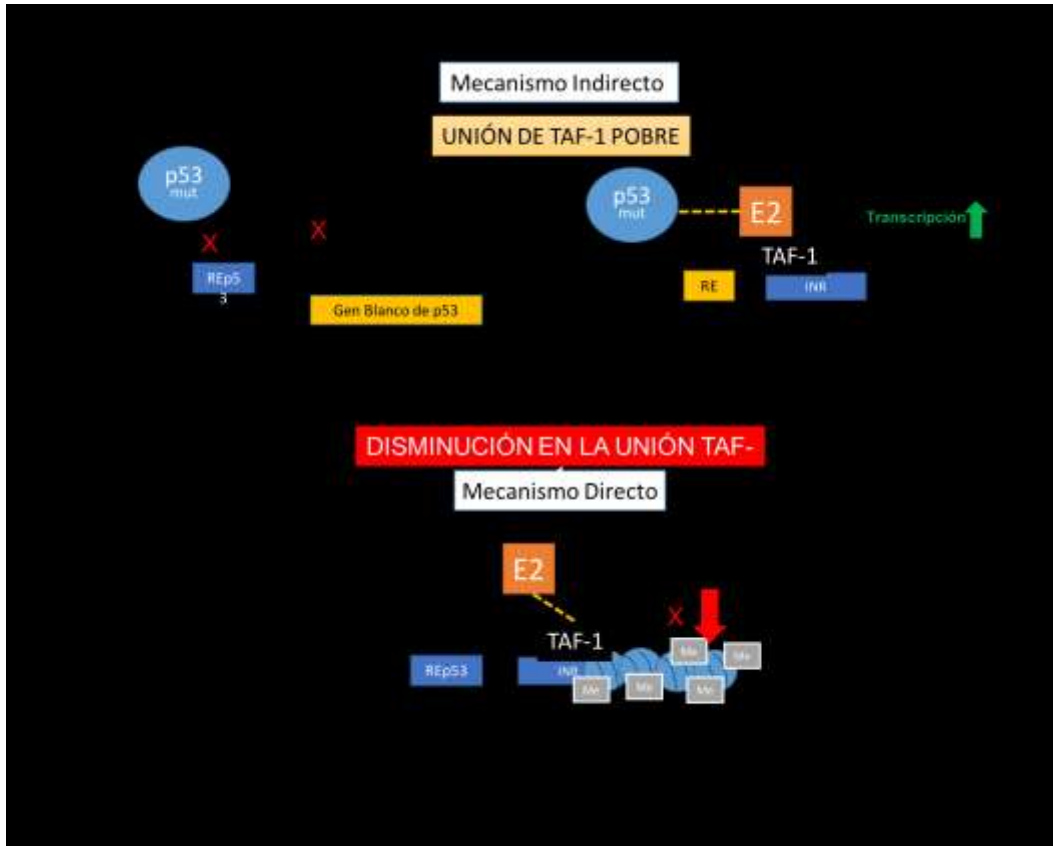


## 10.6 Genes en donde existe una correlación entre la unión de TAF-1 y su Expresión en ambientes p53 mutado y ausente, en presencia de E2 de VPH-16

En un ambiente p53 mutado, en el caso del gen SRC, aunque se presentó un incremento en la unión de TAF-1 al promotor, este fue muy pobre a consecuencia de la posible desestabilización del complejo E2-TAF-1 debido a la interacción de p53<sup>mut</sup> con éste. Esta ligera unión de TAF-1 se correlaciona con un aumento sutil en la transcripción del gen SRC.

Adicionalmente, cabe destacar que en estudios recientes se ha observado que la transcripción de Src es controlada por dos promotores distintos separados por aproximadamente 1kb. Ambos promotores contienen elementos Inr y son dependientes de TAF-1 (Dehm et al. 2004), además de que su expresión puede ser regulada por el estado de la cromatina (C. Oneyama and M. Okada, 2015).

Otro gen en el cual se detectó una correlación directa entre la unión de TAF-1 con su expresión fue Ciclina A1, en donde la disminución en los niveles de unión de TAF-1 a su promotor, como consecuencia de la débil unión TAF-1-E2 por la ausencia de p53, llevó a una baja actividad transcripcional.



Una observación importante es que la gran mayoría de los genes en los que no se observa una correlación entre los niveles de unión de TAF-1 y la expresión, se encuentran en ambientes en los que la proteína p53 se encuentra no funcional o ausente, lo cual puede sugerir que la proteína p53 es necesaria para un correcto reclutamiento de TAF-1. Por otro lado, a diferencia de lo reportado por García-Venzor en 2013 en nuestro grupo de trabajo, a tiempos largos de expresión de E2, se va perdiendo la regulación por parte TAF-1, involucrando en el contexto otro tipo de factores reguladores de la expresión génica, como son las modificaciones de histonas, el estado de la cromatina, el correcto ensamblaje del Complejo de Preinicio, Inicio y Elongación de la Transcripción, entre otros.

## 11. CONCLUSIONES

Se demostró que la presencia de la proteína viral E2 de VPH-16 modifica la unión de TAF-1 en la gran mayoría de los promotores de los genes estudiados en el presente trabajo, sin embargo, esta unión fue diferente dependiendo del estado de p53 en la célula.

La presencia de E2-16 provoca una activación transcripcional en la mayoría de los promotores estudiados en un ambiente celular p53<sup>+/+</sup>, a excepción de Ciclina D1. Por el contrario, E2-16 provoca una represión transcripcional en la mayoría de los genes estudiados en presencia de una proteína p53mut o en ausencia de ésta, con excepción de CCND1 y SRC en los que se observó un aumento transcripcional en presencia de p53mut. Todo lo anterior sugiere interacciones dinámicas entre la proteína viral E2, p53 (en sus diferentes estados) y TAF-1, que son particulares dependiendo del contexto de cada promotor.

Por otro lado, se demostró que los cambios en la unión de TAF-1 a los diferentes promotores presenta una pobre correlación con sus niveles de expresión génica, a diferencia de lo observado cuando la expresión de E2 es transitoria (García-Venzor, 2013). Con base en lo anterior, se puede sugerir que a tiempos prolongados de expresión de E2 de VPH-16, los genes normalmente regulados por TAF-1 pierden tal regulación, involucrándose otros factores como podrían ser marcas epigenéticas, remodeladores de cromatina, represores o activadores transcripcionales.

## 12. PERSPECTIVAS

Ya que se observó una mayor correlación Unión de TAF-1-Expresión génica en una variedad de genes cuando se encuentran en un ambiente que posee p53 funcional, sería importante evaluar el efecto que E2 tiene sobre la unión de p53 a sus elementos de respuesta en estos y otros genes blanco.

Analizar la presencia de modificaciones epigenéticas en los promotores evaluados, determinando tanto metilaciones como acetilaciones, ya que esto podría identificar posibles mecanismos por los cuales E2 puede actuar como activador o represor transcripcional. Dependiendo de lo observado a nivel epigenético, se podría evaluar la participación de otros factores como BRD4, el cual se sabe que interactúa con p53, TAF-1 y con la misma proteína viral E2.

Evaluar la presencia de otros factores de la maquinaria transcripcional basal a nivel de promotor, con la finalidad de considerar si la presencia de E2 podría impedir el completo reclutamiento del Complejo de Inicio de la Transcripción o si a tiempos largos de expresión de E2, otro factor diferente a TAF-1 puede regular la actividad transcripcional de E2.

Por último, sería importante averiguar si las modificaciones transcripcionales de los genes evaluados en el presente trabajo por la presencia de E2, podrían estar afectando los niveles proteicos de cada uno de ellos y con esto los procesos biológicos en los que están involucrados.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- Androphy, E J, D R Lowy, and J T Schiller. 1987. "Bovine Papillomavirus E2 Trans-Activating Gene Product Binds to Specific Sites in Papillomavirus DNA." *Nature* 325(6099): 70–73.
- Angeletti, Peter C, Kitai Kim, Fiona J Fernandes, and Paul F Lambert. 2002. "Stable Replication of Papillomavirus Genomes in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of virology* 76(7): 3350–58.
- Appella, E. and Anderson, C. W. (2001), Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European Journal of Biochemistry*, 268: 2764–2772.
- Ashrafi, G. Hossein, Mohammad Haghshenas, Barbara Marchetti, and M. Saveria Campo. 2006. "E5 Protein of Human Papillomavirus 16 Downregulates HLA Class I and Interacts with the Heavy Chain via Its First Hydrophobic Domain." *International Journal of Cancer* 119(9): 2105–12.
- Banerjee, N. Sanjib, Hsu Kun Wang, Thomas R. Broker, and Louise T. Chow. 2011. "Human Papillomavirus (HPV) E7 Induces Prolonged G<sub>2</sub> Following S Phase Reentry in Differentiated Human Keratinocytes." *Journal of Biological Chemistry* 286(17): 15473–82.
- Barrow-Laing, Lisa, Wei Chen, and Ann Roman. 2010. "Low- and High-Risk Human Papillomavirus E7 Proteins Regulate p130 Differently." *Virology* 400(2): 233–39.
- Bastien, N., & McBride, a a. (2000). Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes. *Virology*, 270(1), 124-134.
- Bellanger, S., Tan, C. L., Xue, Y. Z., Teissier, S., & Thierry, F. (2011). Tumor suppressor or oncogene? A critical role of the human papillomavirus (HPV) E2 protein in cervical cancer progression. *American Journal of Cancer Research*, 1(3), 373–389.
- Bernard, Hans Ulrich et al. 2010. "Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments." *Virology* 401(1): 70–79.
- Blachon, S., and C. Demeret. 2003. "The Regulatory E2 Proteins of Human Genital Papillomaviruses Are pro-Apoptotic." *Biochimie* 85(8): 813–19.
- Bodily, Jason, and Laimonis a. Laimins. 2011. "Persistence of Human Papillomavirus Infection: Keys to Malignant Progression." *Trends in Microbiology* 19(1): 33–39.
- Bosch, F. Xavier et al. 2008. "Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia." *Vaccine* 26(SUPPL. 10).
- Brooks, C. L. & Gu, W. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol. Cell* 21, 307–315 (2006).
- Buck, Christopher B et al. 2005. "Maturation of Papillomavirus Capsids." *Journal of virology* 79(5): 2839–46.
- Burns, J. E., Walker, H. F., Schmitz, C., & Maitland, N. J. (2010). Phenotypic effects of HPV-16 E2 protein expression in human keratinocytes. *Virology*, 401(2), 314-321.

- Carrozza, M J, and N a DeLuca. 1996. "Interaction of the Viral Activator Protein ICP4 with TFIID through TAF250." *Molecular and cellular biology* 16(6): 3085–93.
- Centeno, Federico et al. 2008. "TAF1 Interacts with and Modulates Human Papillomavirus 16 E2-Dependent Transcriptional Regulation." *Intervirology* 51(2): 137–43.
- Dehm, S. M., Hilton, T. L., Wang, E. H., & Bonham, K. (2004). SRC Proximal and Core Promoter Elements Dictate TAF1 Dependence and Transcriptional Repression by Histone Deacetylase Inhibitors. *Molecular and Cellular Biology*, 24(6), 2296–2307.
- Desaintes C and Demeret C. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Seminars in Cancer biology* 1996; 7: 339-347.
- Devaiah, Ballachanda N. et al. 2010. "Novel Functions for TAF7, a Regulator of TAF1-Independent Transcription." *Journal of Biological Chemistry* 285(50): 38772–80.
- Doorbar, John et al. 2012. "The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses." *Vaccine* 30(SUPPL.5): F55–70.
- Egawa, N. et al. 2012. "The E1 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Is Dispensable for Maintenance Replication of the Viral Genome." *Journal of Virology* 86(6): 3276–83.
- Ekström, Johanna et al. 2011. "High Throughput Sequencing Reveals Diversity of Human Papillomaviruses in Cutaneous Lesions." *International Journal of Cancer* 129(11): 2643–50.
- el-Deiry, W S et al. 1992. "Definition of a Consensus Binding Site for p53." *Nature genetics* 1(1): 45–49
- Faridi R, Zahra A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Viol J [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011 Jan [cited 2014 May 13];8(1):269.*
- Fischer, Martin, Lydia Steiner, and Kurt Engeland. 2014. "The Transcription Factor p53: Not a Repressor, Solely an Activator." *Cell Cycle* 13(19): 3037–58.
- Forslund, Ola. 2007. "Genetic Diversity of Cutaneous Human Papillomaviruses." *Journal of General Virology* 88(10): 2662–69.
- Galloway, D. a. et al. 2005. "Regulation of Telomerase by Human Papillomaviruses." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 70: 209–15.
- García-Venzor Alfredo. 2013. (Tesis de Maestría) "Efecto de La Interacción de La Proteína E2 de VPH 16 Con El Factor TAF1 Sobre Su Unión a Promotores Celulares." Centro de Investigación y Estudios Evanzados del Instituto Politécnico Nacional
- Gardino, A. K., & Yaffe, M. B. (2011). 14-3-3 Proteins As Signaling Integration Points for Cell Cycle Control and Apoptosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(7), 688–695.
- Gegonne, a, J D Weissman, and D S Singer. 2001. "TAFII55 Binding to TAFII250 Inhibits Its Acetyltransferase Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(22): 12432–37.



- Gegonne, Anne et al. 2006. "TAF7: A Possible Transcription Initiation Check-Point Regulator." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(3): 602–7.
- Geisberg, J V, J L Chen, and R P Ricciardi. 1995. "Subregions of the Adenovirus E1A Transactivation Domain Target Multiple Components of the TFIID Complex." *Molecular and cellular biology* 15(11): 6283–90.
- Giri, I, and M Yaniv. 1988. "Structural and Mutational Analysis of E2 Trans-Activating Proteins of Papillomaviruses Reveals Three Distinct Functional Domains." *The EMBO journal* 7(9): 2823–29.
- Goodman, R. H., & Smolik, S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes and Development*.
- Goodwin, E. C., & DiMaio, D. (2000). Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), 12513–12518.
- Gottschling, Marc et al. 2009. "Cutaneotropic Human Beta-/gamma-Papillomaviruses Are Rarely Shared between Family Members." *The Journal of investigative dermatology* 129(10): 2427–34.
- Grant, Patrick a. et al. 1998. "A Subset of TAF(II)s Are Integral Components of the SAGA Complex Required for Nucleosome Acetylation and Transcriptional Stimulation." *Cell* 94(1): 45–5
- Gulliksen, Anja et al. 2012. "Towards a Sample-In, Answer-out Point-of-Care Platform for Nucleic Acid Extraction and Amplification: Using an HPV E6/E7 mRNA Model System." *Journal of Oncology* 2012.
- Harari, Ariana, Zigui Chen, and Robert D. Burk. 2014. "Human Papillomavirus Genomics: Past, Present and Future." *Curr Probl Dermatol* 45: 447–51.
- Holmgren, Sigrid C, Nicole a Patterson, Michelle a Ozbun, and Paul F Lambert. 2005. "The Minor Capsid Protein L2 Contributes to Two Steps in the Human Papillomavirus Type 31 Life Cycle." *Journal of virology* 79(7): 3938–48.
- Ilves, I., Mäemets, K., Silla, T., Janikson, K., & Ustav, M. (2006). Brd4 Is Involved in Multiple Processes of the Bovine Papillomavirus Type 1 Life Cycle. *Journal of Virology*, 80(7), 3660–3665.
- Jacobson, R H, a G Ladurner, D S King, and R Tjian. 2000. "Structure and Function of a Human TAFII250 Double Bromodomain Module." *Science (New York, N.Y.)* 288(5470): 1422–25.
- Johannsen, Eric, and Paul F. Lambert. 2013. "Epigenetics of Human Papillomaviruses." *Virology* 445(1-2): 205–12.
- Kabsch, Kirsten et al. 2004. "The HPV-16 E5 Protein Inhibits TRAIL- and FasL-Mediated Apoptosis in Human Keratinocyte Raft Cultures." *Intervirology* 47(1): 48–56.
- Kaeser, M. D., & Iggo, R. D. (2002). Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 95–100.

- Kern, S E et al. 1991. "Identification of p53 as a Sequence-Specific DNA-Binding Protein." *Science (New York, N.Y.)* 252(5013): 1708–11.
- Knights CD, Catania J, Giovanni SD, Muratoglu S, Perez R, Swartzbeck A, Quong AA, Zhang X, Beerman T, Pestell RG, et al. 2006. Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *J Cell Biol* 173: 533–544.
- Krawczyk, Ewa, Frank a Suprynowicz, Sawali R Sudarshan, and Richard Schlegel. 2010. "Membrane Orientation of the Human Papillomavirus Type 16 E5 Oncoprotein." *Journal of virology* 84(4): 1696–1703.
- Krüppel, U., Müller-Schiffmann, A., Baldus, S. E., Smola-Hess, S., & Steger, G. (2008). E2 and the co-activator p300 can cooperate in activation of the human papillomavirus type 16 early promoter. *Virology*, 377(1), 151-159.
- Kruse, Jan Philipp, and Wei Gu. 2009. "Modes of p53 Regulation." *Cell* 137(4): 609–22.
- Kuo, S R, J S Liu, T R Broker, and L T Chow. 1994. "Cell-Free Replication of the Human Papillomavirus DNA with Homologous Viral E1 and E2 Proteins and Human Cell Extracts." *The Journal of biological chemistry* 269(39): 24058–65.
- Lacey, Charles J N, Catherine M. Lowndes, and Keerti V. Shah. 2006. "Chapter 4: Burden and Management of Non-Cancerous HPV-Related Conditions: HPV-6/11 Disease." *Vaccine* 24(SUPPL. 3): 35–41.
- 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]* ;73(2):348–70.
- Lee, a. Young, and Cheng Ming Chiang. 2009. "Chromatin Adaptor Brd4 Modulates E2 Transcription Activity and Protein Stability." *Journal of Biological Chemistry* 284(5): 2778–86.
- Léveillard, Thierry, and Bohdan Wasylyk. 1997. "The MDM2 C-Terminal Region Binds to TAF(II)250 and Is Required for MDM2 Regulation of the Cyclin a Promoter." *Journal of Biological Chemistry* 272(49): 30651–61.
- Li, A. G., Piluso, L. G., Cai, X., Gadd, B. J., Ladurner, A. G., & Liu, X. (2007). An Acetylation Switch in p53 Mediates Holo-TFIID Recruitment. *Molecular Cell*, 28(3), 408-421.
- Lively, Tricia N. et al. 2001. "C-Jun Binds the N Terminus of Human TAFII250 to Derepress RNA Polymerase II Transcription in Vitro." *Journal of Biological Chemistry* 276(27): 25582–88.
- Luo, J., Su, F., Chen, D., Shiloh, A., and Gu, W. (2000). Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* 408, 377–381.
- Luo, J.Y.; Nikolaev, A.Y.; Imai, S.; Chen, D.L.; Su, F.; Shiloh, A.; Guarente, L.; Gu, W. (2001) Negative control of p53 by SIR2 alpha promotes cell survival under stress. *Cell*, 107, 137–148.
- Massimi, P et al. 1999. "Interaction between the HPV-16 E2 Transcriptional Activator and p53." *Oncogene* 18(54): 7748–54

- McIntosh, Pauline B et al. 2008. "Structural Analysis Reveals an Amyloid Form of the Human Papillomavirus Type 16 E1--E4 Protein and Provides a Molecular Basis for Its Accumulation." *Journal of virology* 82(16): 8196–8203.
- McLaughlin-Drubin, Margaret E., and Karl Münger. 2009. "The Human Papillomavirus E7 Oncoprotein." *Virology* 384(2): 335–44.
- Middleton, K., Peh, W., Southern, S., Griffin, H., Sotlar, K., Nakahara, T., Doorbar, J. (2003). Organization of Human Papillomavirus Productive Cycle during Neoplastic Progression Provides a Basis for Selection of Diagnostic Markers. *Journal of Virology*, 77(19), 10186–10201.
- Muller, Mandy, and Caroline Demeret. 2012. "The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions: A Complex Hijacking of the Cellular Network." *The open virology journal* 6: 173–89.
- Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* [Internet]. 2006 Aug 31
- O'Brien, T, and R Tjian. 2000. "Different Functional Domains of TAFII250 Modulate Expression of Distinct Subsets of Mammalian Genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(6): 2456–61.
- Ogryzko, Vasily V. et al. 1998. "Histone-like TAFs within the PCAF Histone Acetylase Complex." *Cell* 94(1): 35–44.
- Oneyama, C., & Okada, M. (2015). *MicroRNAs as the fine-tuners of Src oncogenic signalling*. *Journal of Biochemistry*. Oxford University Press.
- Pyeon, Dohun et al. 2009. "Establishment of Human Papillomavirus Infection Requires Cell Cycle Progression." *PLoS Pathogens* 5(2).
- Ramírez-Salazar, E., Centeno, F., Nieto, K., Valencia-Hernández, A., Salcedo, M., & Garrido, E. (2011). HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. *Virology Journal*, 8, 247.
- Schiller, John T., Patricia M. Day, and Rhonda C. Kines. 2010. "Current Understanding of the Mechanism of HPV Infection." *Gynecologic Oncology* 118(1 SUPPL. 1): S12–17.
- Sekhar, V., & McBride, A. A. (2012). Phosphorylation Regulates Binding of the Human Papillomavirus Type 8 E2 Protein to Host Chromosomes. *Journal of Virology*, 86(18), 10047–10058.
- Sekhar V, Reed SC and McBride AA (2010). Interaction of the betapapillomavirus E2 tethering protein with mitotic chromosomes. *Journal of Virology*; 84: 543-557.
- Siegert, J L et al. 2000. "Cyclin D1 Suppresses Retinoblastoma Protein-Mediated Inhibition of TAFII250 Kinase Activity." *Oncogene* 19(50): 5703–11.
- Siegert, J L, and P D Robbins. 1999. "Rb Inhibits the Intrinsic Kinase Activity of TATA-Binding Protein-Associated Factor TAFII250." *Molecular and cellular biology* 19(1): 846–54.
- Stanley, Margaret a. 2012. "Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus." *Clinical Microbiology Reviews* 25(2): 215–22.
- Stenlund, Arne. 2003. "E1 Initiator DNA Binding Specificity Is Unmasked by Selective Inhibition of Non-Specific DNA Binding." *EMBO Journal* 22(4): 954–63.

- Suprynovicz, Frank a et al. 2010. "The Human Papillomavirus Type 16 E5 Oncoprotein Inhibits Epidermal Growth Factor Trafficking Independently of Endosome Acidification." *Journal of virology* 84(20): 10619–29.
- Sykes, S.M., Mellert, H.S., Holbert, M.A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W.S., and McMahon, S.B. (2006). Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol. Cell* 24, 845–851.
- Szak, S. T., Mays, D., & Pietenpol, J. A. (2001). Kinetics of p53 Binding to Promoter Sites In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 21(10), 3375–3386
- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W., and Gu, W. (2006). Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol. Cell* 24, 827–839.
- Thorland, Erik C, Shannon L Myers, Bobbie S Gostout, and David I Smith. 2003. "Common Fragile Sites Are Preferential Targets for HPV16 Integrations in Cervical Tumors." *Oncogene* 22(8): 1225–37.
- Tokumaru, Y., Yamashita, K., Osada, M., Nomoto, S., Sun, D.-I., Xiao, Y., . Sidransky, D. (2004). Inverse Correlation between Cyclin A1 Hypermethylation and p53 Mutation in Head and Neck Cancer Identified by Reversal of Epigenetic Silencing. *Cancer Research*, 64(17).
- Tomaić, Vjekoslav, David Pim, and Lawrence Banks. 2009. "The Stability of the Human Papillomavirus E6 Oncoprotein Is E6AP Dependent." *Virology* 393(1): 7–10.
- Vaziri, H.; Dessain, S.K.; Eagon, E.N.; Imai, S.I.; Frye, R.A.; Pandita, T.K.; Guarente, L.; Weinberg, R.A. hSIR2(SIRT1) Functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 2001, 107, 149–159.
- Vosa, L. et al. 2012. "Identification and Analysis of Papillomavirus E2 Protein Binding Sites in the Human Genome." *Journal of Virology* 86(1): 348–57.
- Vousden, Karen H., and Carol Prives. 2009. "Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53." *Cell* 137(3): 413–31
- Wang, Qian et al. 2004. "Functional Analysis of the Human Papillomavirus Type 16 E1  $\wedge$  E4 Protein Provides a Mechanism for In Vivo and In Vitro Keratin Filament Reorganization Functional Analysis of the Human Papillomavirus Type 16 E1  $\wedge$  E4 Protein Provides a Mechanism for In Vivo." 78(2): 821–33.
- Wassarman, David a, and Frank Sauer. 2001. "TAF II 250: A Transcription Toolbox Interaction Partners." *Journal of Cell Science* 1(114): 2895–2920.
- Wei, Chia Lin et al. 2006. "A Global Map of p53 Transcription-Factor Binding Sites in the Human Genome." *Cell* 124(1): 207–19.
- Weissman, J D et al. 1998. "HIV-1 Tat Binds TAFII250 and Represses TAFII250-Dependent Transcription of Major Histocompatibility Class I Genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(20): 11601–6.
- Wieczorek, E, M Brand, X Jacq, and L Tora. 1998. "Function of TAF(II)-Containing Complex without TBP in Transcription by RNA Polymerase II." *Nature* 393(6681): 187–91.
- Woolhouse, Mark, and Eleanor Gaunt. 2007. "Ecological Origins of Novel Human Pathogens." *Critical reviews in microbiology* 33(4): 231–42.

- Wu, Chwen Huey et al. 2001. "Analysis of Core Promoter Sequences Located Downstream from the TATA Element in the." *Society* 21(5): 1593–1602.
- Yao, J.-mei, & Breiding, D. E. (1998). Functional Interaction of the Bovine Papillomavirus E2 Transactivation Domain with TFIIB, 72(2), 1013-1019.
- You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K and How- ley PM. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 2004; 117: 349-360.
- Zanier, Katia et al. 2012. "Solution Structure Analysis of the HPV16 E6 Oncoprotein Reveals a Self-Association Mechanism Required for E6-Mediated Degradation of p53." *Structure* 20(4): 604–17.