



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

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Inhibición de la infección del virus del papiloma humano
tipo 16 usando aptámeros de ácidos nucleicos dirigidos
contra la proteína principal de la cápside (L1)”**

T E S I S

Que presenta

Diana Gabriela Valencia Reséndiz

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

en la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de Tesis

Dr. Luis Marat Alvarez Salas

Ciudad de México

Febrero, 2018

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Luis Marat Alvarez Salas en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Durante su realización, la autora contó con una beca personal otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONaCyT) con número de registro 417689.

A mi familia y amigos, porque en ellos he encontrado la fortaleza para perseguir mis sueños.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 El virus del papiloma humano	1
1.1.1 El genoma viral	1
1.1.2 La proteína L1 y la estructura de la cápside	3
1.1.3 El papel de L1 en la infección	6
1.1.4 La entrada del virus a la célula y el ciclo de vida viral.	9
1.1.5 Partículas tipo virus (VLPs) y pseudovirus (PsVs) de VPH.	11
1.1.6 Vacunas contra VPH.	12
1.2 Aptámeros	13
1.2.1 Aislamiento de aptámeros	14
1.2.2 Ventajas de los aptámeros	15
1.2.3 Aplicaciones de los aptámeros	17
1.2.4. Modificaciones químicas a los aptámeros	18
2 ANTECEDENTES	19
3 JUSTIFICACIÓN	22
4 HIPÓTESIS	23
5 OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos	24
6 MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1 Cultivo celular.	25
6.2 Plásmidos y oligonucleótidos	25
6.3 Producción de aptámeros	26
6.4 Producción de pseudovirus (PsVs) de VPH16	27

6.5 Inmunotransferencia.....	28
6.6 Microscopía electrónica de transmisión.....	29
6.7 Titulación del stock viral.....	29
6.8 Producción de partículas tipo virus (VLPs).....	30
6.9 Ensayos de unión.....	30
6.10 Inhibición de la pseudo-infección de VPH16.....	31
6.11 Citometría de flujo.....	32
6.12 Análisis estadístico.....	32
7 RESULTADOS	33
7.1 Producción de pseudovirus (PsVs) de VPH16.....	33
7.2 Efecto del heparán sulfato (HS) en la unión Sc5c3- VLPs.....	35
7.3 Unión de Sc5c3 a PsVs de VPH16.....	38
7.4 Inhibición de la infección de PsVs de VPH16 usando aptámeros.	38
7.5 Efecto dosis-respuesta de los aptámeros.	42
7.6 Infección de diversas líneas celulares con PsVs de VPH16.	43
7.7 Inhibición de la infección usando una versión modificada de Sc5c3.....	47
7.8 Mecanismo de inhibición de la infección.....	50
8 DISCUSIÓN	53
9 CONCLUSIONES	58
10 PERSPECTIVAS	59
11 REFERENCIAS	60
12 ANEXO	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representación esquemática del genoma de VPH16..	2
Figura 2.	Estructura de la proteína L1 de VPH16.....	3
Figura 3.	Representación de la cápside de VPH16..	4
Figura 4.	Formación del pentámero de L1.....	5
Figura 5.	Interacción inter-pentamérica para el ensamble de la cápside.....	6
Figura 6.	Estructura del heparán sulfato proteoglicano (HSPG).	7
Figura 7.	Interacción de la cápside de VPH16 con heparán sulfato (HS).....	8
Figura 8.	Entrada de VPH a la célula..	10
Figura 9.	Ciclo de vida de VPH en un epitelio diferenciado..	11
Figura 10.	Morfología de VLPs y PsVs.....	12
Figura 11.	Reconocimiento de un aptámero y su blanco.....	14
Figura 12.	Representación del método SELEX.	16
Figura 13.	Estructura secundaria de los aptámeros Sc5c3 y Sc5c3 Δ 18.....	19
Figura 14.	Caracterización de los PsVs de VPH16..	34
Figura 15.	Infección de células 293TT con PsVs de VPH16.	34
Figura 16.	Microscopía electrónica de transmisión de PsVs de VPH16.....	35
Figura 17.	Estructura del HS, heparina y condrotin sulfato.....	36
Figura 18.	Efecto del HS en la unión de Sc5c3.....	37
Figura 19.	Unión del aptámero Sc5c3 a PsVs de VPH16.....	39
Figura 20.	Inhibición de la infección de PsVs de VPH16.....	40
Figura 21.	Efecto inhibitorio de la mutante C27A.....	402
Figura 22.	Inhibición de la infección de PsVs de VPH16 en función de la concentración de aptámero.....	43
Figura 23.	Infección de células HaCaT.	44
Figura 24.	Caracterización de PsVs de VPH16 producidos con el plásmido p16sheLL.	46
Figura 25.	Cuantificación de la infectividad de PsVs de VPH16.....	46
Figura 26.	Infección de una batería de líneas celulares usando PsVs de VPH16.....	47
Figura 27.	Posiciones modificadas en el aptámero quimérico.....	48
Figura 28.	Inhibición de la infección de PsVs de VPH16 usando un aptámero quimérico DNA-RNA.	49
Figura 29.	Inmunotransferencia de las VLPs mutantes.	51
Figura 30.	Unión de los aptámeros Sc5c3 y Sc5c3 Δ 18 con VLPs mutantes.....	52
Figura 31.	Modelo de inhibición de la infección de PsVs de VPH16 por Sc5c3.....	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sitios de unión para heparán sulfato (HS) en la cápside de VPH16	8
Cuadro 2. Anticuerpos usados en la inmunotransferencia	29
Cuadro 3. VLPs mutantes	50

RESUMEN

El DNA del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH16) ha sido encontrado en aproximadamente 50% de los casos de cáncer cervical en el mundo. La infección de VPH comienza con la unión de la cápside viral al heparán sulfato (HS), un glucosaminoglicano expuesto en la superficie celular de los queratinocitos de la capa basal epitelial. Hay múltiples sitios de unión para HS en la cápside de VPH, los cuales están integrados por aminoácidos de la proteína principal de la cápside (L1). Previamente, nuestro grupo aisló un aptámero de RNA (Sc5c3) contra partículas tipo virus (VLPs) formadas por L1 de VPH16. Sc5c3 mostró un constante de disociación menor a la reportada para el VPH tipo 33 y la superficie celular, sugiriendo que el aptámero tenía potencial para bloquear la infección por VPH16. En este trabajo reportamos la inhibición de la infección de VPH16 usando el aptámero Sc5c3. Para simular el proceso de infección, se produjeron pseudovirus (PsVs) de VPH16 conteniendo un plásmido reportero que codifica para la proteína amarilla fluorescente (YFP). La incubación de los PsVs con Sc5c3 antes de la infección de células 293TT, resultó en la disminución dosis-dependiente de YFP, indicando que la infección fue inhibida por el aptámero. La degradación del aptámero usando RNAsa A, restauró la fluorescencia generada por los PsVs, respaldando la observación de que Sc5c3 inhibió la infección. Finalmente, para elucidar el mecanismo de la inhibición, se realizaron ensayos de unión del aptámero con VLPs mutadas en los sitios de unión para HS; sin embargo, no se observó diferencia de unión entre las VLPs silvestre y mutantes, sugiriendo que la inhibición de la infección es independiente del sitio de unión para HS.

En conclusión, estos resultados sugieren que el aptámero Sc5c3 puede ser usado para el desarrollo de tecnologías profilácticas enfocadas a prevenir la infección por VPH16.

ABSTRACT

Human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA has been found in approximately 50% of cervical tumors world-wide. HPV infection starts with the binding of the virus capsid to heparan sulphate (HS) receptors, which are exposed on the surface of epithelial basal layer keratinocytes. There are multiple HS binding sites on the HPV capsid, integrated by positively-charged aminoacids from the L1 protein. Previously, our group isolated an RNA aptamer (Sc5c3) directed against HPV16 L1 virus-like particles (VLPs) with a lower constant dissociation than that reported for HPV33 and the cell surface, suggesting potential properties as a blocking agent to inhibit HPV16 infection. Here, we report the inhibition of HPV16 infection by Sc5c3. Because the lack of a reliable *in vitro* model for HPV infection, HPV16 pseudoviruses (PsVs) containing a yellow fluorescent protein (YFP) reporter plasmid were employed to mimic the HPV infection process in 293TT cells. Incubation of HPV16 PsVs with Sc5c3 before infection of 293TT cells resulted in a dose-dependent decrease in pseudoinfection associated to YFP fluorescence, indicating inhibition by Sc5c3. Aptamer degradation using RNase A restored PsVs-induced fluorescence, supporting our previous observation that Sc5c3 aptamer can inhibit HPV16 infection. VLP mutants comprising reported HS binding sites were used in binding assays to elucidate the Sc5c3 blocking mechanism; however, no significant Sc5c3 binding difference was observed between wild-type and mutant VLPs, thus suggesting that pseudoinfection inhibition may be independent of the HS binding sites.

In conclusion, these results suggest that Sc5c3 may be used to develop prophylactic technologies aimed to prevent HPV16 infection.

1

INTRODUCCIÓN

1.1 El virus del papiloma humano

Los papilomavirus (PV) son un grupo diverso de virus de DNA de doble cadena con cápside icosaédrica de entre 50 y 60 nm de diámetro. Los PV infectan una gran variedad de especies, incluyendo al humano, y muestran un elevado tropismo tisular, con predilección por la infección de superficies mucosas orales o genitales y piel.¹

A la fecha se han reportado más de 150 tipos de virus del papiloma humano (VPH).² Algunos de ellos, denominados "de alto riesgo", se han relacionado con desarrollo de cáncer cervical. Prácticamente en todos los casos de cáncer cervical se ha encontrado DNA de VPH; particularmente del tipo 16 (VPH16), al que se asocian más del 50% de los casos.³

1.1.1 El genoma viral

El genoma de VPH es una molécula cerrada de DNA de doble cadena que mide aproximadamente 8000 pares de bases (pb). Está dividido en tres

regiones: la región larga de control (LCR), la región temprana (ER) y la región tardía (LR) (Figura 1).

La LCR es una región de aproximadamente 850 pb sin función codificante; pero que alberga el origen de replicación y múltiples sitios de unión para factores de transcripción.⁴

La ER codifica las proteínas no estructurales E1, E2, E4, E5, E6 y E7, que se expresan en mayor medida durante la fase temprana de la infección y están involucradas en la replicación y segregación del genoma viral, la regulación de la expresión de genes virales y celulares, el control del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis.⁵

La LR contiene dos genes que codifican para proteínas estructurales; la proteína principal de la cápside, L1, y la proteína menor de la cápside, L2. Estas son expresadas únicamente en queratinocitos diferenciados durante la fase tardía de la infección.⁴

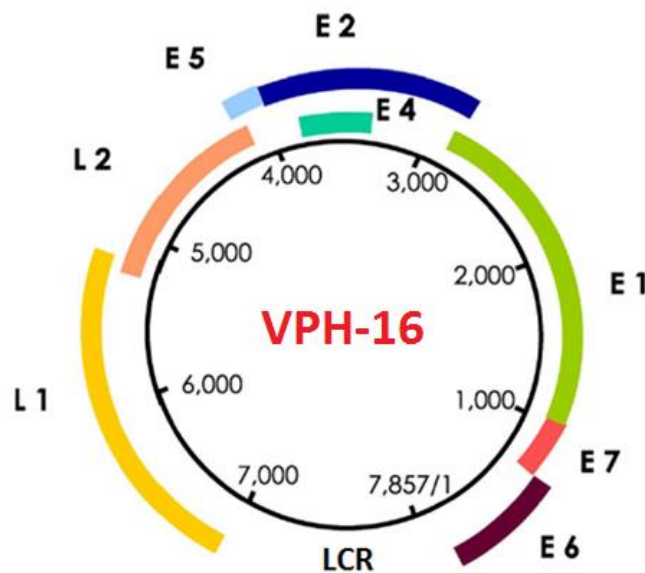


Figura 1.- Representación esquemática del genoma de VPH16.⁶ Se muestra la distribución de los genes no estructurales o genes “E”, los genes de la cápside, L1 y L2 y la región larga de control (LCR). La posición de los genes se indica con diferentes colores.

1.1.2 La proteína L1 y la estructura de la cápside

El gen L1 de VPH16, codifica una proteína de 531 aminoácidos con un peso molecular 55 KDa que forma parte de la cápside del virus.⁷ Es la proteína más conservada entre los VPH por lo que es empleada para su clasificación e identificación.^{8,9}

La proteína L1, también conocida como la “proteína principal de la cápside”, está formada por un núcleo de ocho cadenas antiparalelas en forma de remolino beta (Figura 2, flechas azules). En seguida se encuentra una región de hélices alfa, donde las hélices h2, h3 y h4 integran la superficie de contacto con otras moléculas de L1 (Figura 2, flechas amarillas). Los últimos aminoácidos se encuentran desordenados y se proyectan hacia el interior de la proteína. Este segmento es rico en lisina, arginina, histidina, treonina y serina y es el más variable entre las proteínas L1 de diferentes VPH.¹⁰

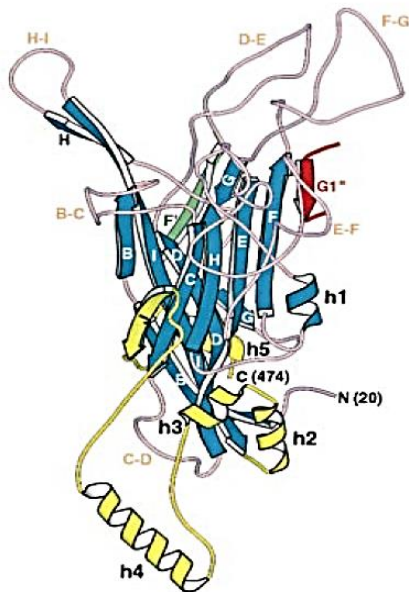


Figura 2. Estructura de la proteína L1 de VPH16.¹¹ Las hojas que forman el remolino beta se indican con una letra mayúscula y se muestran coloreadas en azul. Los loops que unen cada hoja se nombran con letras mayúsculas y se marcaron con color lila. Las hélices del brazo C-terminal se marcaron con color amarillo y se nombraron con una “h”.

La cápside del VPH está formada por 360 copias de la proteína L1 arregladas en 72 capsómeros pentaméricos, que a su vez se ensamblan en forma de una red icosaédrica (Figura 3).¹² Además, la cápside contiene una cantidad variable de la proteína menor de la cápside, L2. Un virión puede tener hasta 72 moléculas de L2, cada una ubicada en el centro de un capsómero; sin embargo, comúnmente existe una menor cantidad de L2 distribuida aleatoriamente entre los 72 sitios.¹³ L2 está mínimamente expuesta en la superficie del virión maduro; no obstante, emerge durante el proceso de infección.¹⁴

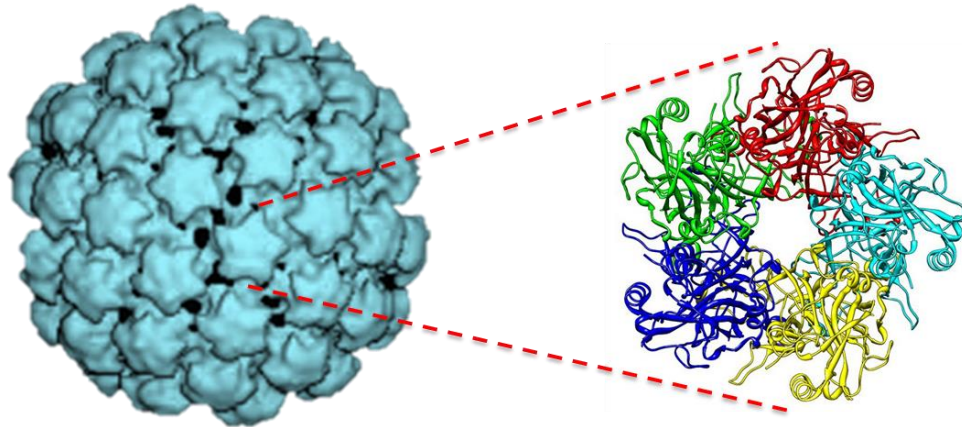


Figura 3. Representación de la cápside de VPH16.¹¹ Se muestra la ampliación de uno de los 72 capsómeros que constituyen la cápside. Cada capsómero está formado por 5 moléculas de L1, las cuales están marcadas con diferentes colores.

Los pentámeros de L1 se encuentran estabilizados por interacciones directas entre monómeros adyacentes. La cadena G del remolino beta se inserta en la hoja CHEF del monómero adyacente (Figuras 2 y 4) y el loop HI se inserta entre los loops FG y EF del monómero vecino.¹⁰ A su vez, el loop FG se inserta entre los loops DE y HI. Así, los loops BC y EF de dos

monómeros vecinos están yuxtapuestos en el borde externo del pentámero.¹⁵

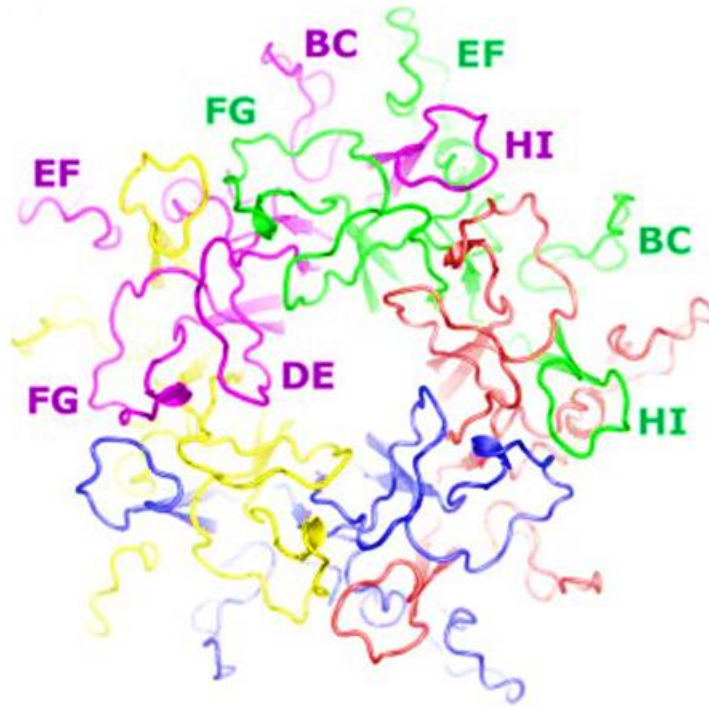


Figura 4. Formación del pentámero de L1.¹⁵ Se muestra la estructura de un pentámero de L1. Cada molécula de L1 se marca en un color distinto y los loops involucrados en las principales interacciones se marcan con letras mayúsculas.

La cápside es ensamblada mediante complejos contactos inter-pentaméricos que incluyen la formación de un puente disulfuro.¹⁶ El brazo C-terminal de una molécula de L1 (Figura 5, color verde) invade el remolino beta de otra L1 en un pentámero vecino (Figura 5, color rojo), forma un puente disulfuro con la subunidad inmediatamente adyacente (Figura 5, color amarillo) y finalmente regresa y se reinserta en el pentámero de origen.¹⁷ Dos residuos de cisteína altamente conservados en L1 median la formación del enlace disulfuro.^{18,19} En el VPH16, están involucradas la cisteína 175 del capsómero invadido y la cisteína 428 del capsómero invasor.¹⁴ Bajo este modelo, denominado “brazo invasor”, cada pentámero

recibe cinco brazos invasores, uno de cada pentámero adyacente, y dona cinco brazos a los pentámeros vecinos, confiriendo de esta manera una elevada estabilidad a la estructura.²⁰

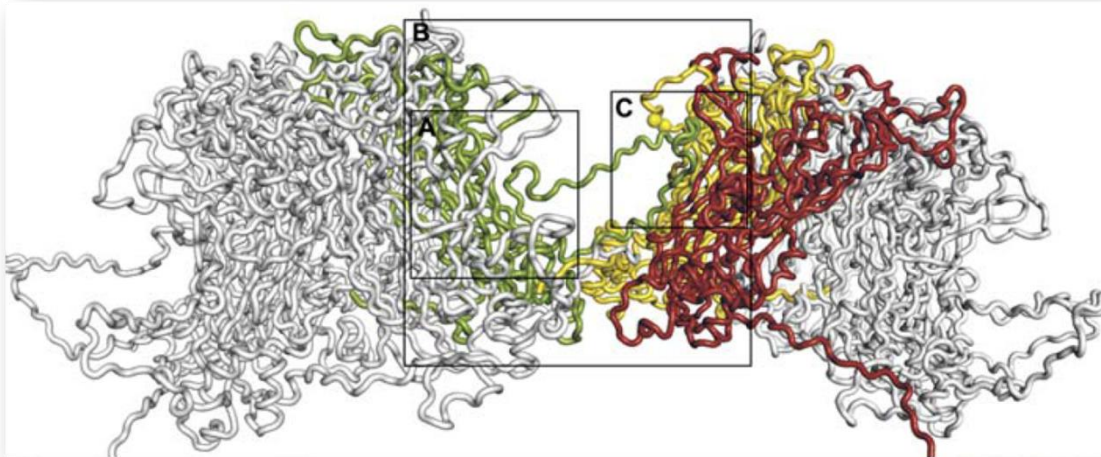


Figura 5. Interacción inter-pentamérica para el ensamblaje de la cápside.¹⁷ Las moléculas de L1 involucradas en la interacción se muestran en diferentes colores mientras que el resto del pentámero se muestra en color gris. La L1 invasora se muestra en verde y las L1 invadidas se muestran en rojo y amarillo. A) Molécula de L1 invasora. B) Formación del puente disulfuro en la L1 invadida. C) Unión y estabilización de los pentámeros mediante el enlace disulfuro.

1.1.3 El papel de L1 en la infección

Al igual que cualquier virus, el VPH requiere adherirse a la célula hospedera para llevar a cabo la infección. La unión de la cápside con la célula ha sido atribuida a la interacción de L1 con heparán sulfato (HS).²¹⁻²³

El HS es una familia de polisacáridos lineales que se encuentran unidos a proteínas de la superficie celular, la matriz extracelular y la membrana basal epitelial. Están compuestos de unidades alternadas de α -D-glucosamina y ácido urónico, ya sea ácido β -D-glucurónico o ácido α -L-idurónico. La estructura formada por el polisacárido y la proteína se conoce como heparán sulfato proteoglicano (HSPG) (Figura 6). Algunos de

los carbonos del polisacárido se encuentran sulfatados, lo que le confiere carga negativa a la molécula. Además algunos monómeros pueden contener acetilaciones.^{24,25}

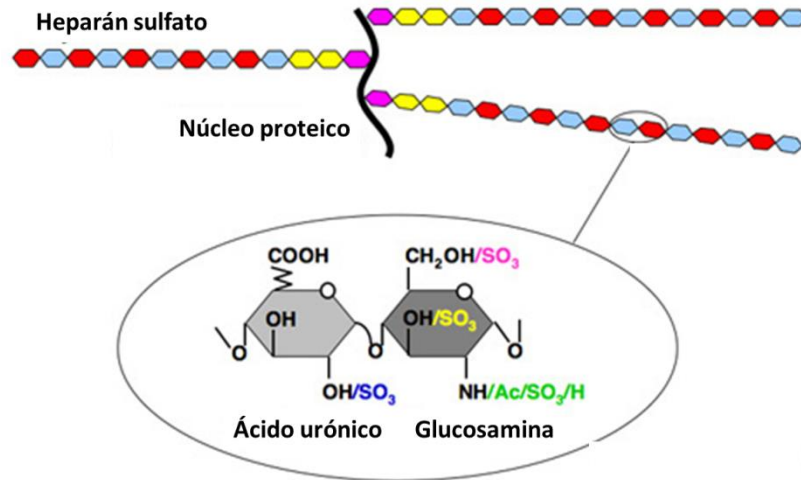


Figura 6. Estructura del heparán sulfato proteoglicano (HSPG).²⁶ En hexágonos de colores se representan las unidades de ácido urónico y glucosamina que forman el heparán sulfato. Las cadenas del polisacárido se unen a una proteína de naturaleza variable representada por una línea curva de color negro. Un acercamiento a la cadena muestra el arreglo de monómeros y las posibles modificaciones en los carbonos (sulfataciones y acetilaciones).

Existen múltiples sitios de unión para HS distribuidos en la superficie de la cápside. Los sitios de unión están formados por una combinación de aminoácidos que provienen de los loops BC, EF, FG, HI y $\alpha 4$ y de diferentes moléculas de L1 en un pentámero (Figura 7A), y consisten principalmente de glutamina, treonina, asparagina y lisina. A través de estos aminoácidos cargados positivamente, la cápside viral forma interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno con la molécula de HS cargada negativamente (Figura 7B).²⁷ En el cuadro 1, se resumen los aminoácidos y los loops involucrados en la formación de los cuatro sitios de unión en la

cápside de VPH16. Dada la geometría de la cápside viral, estos cuatro sitios se encuentran repetidos múltiples veces sobre su superficie.

Se ha propuesto que el sitio 1 funciona como el principal sitio de unión para el HS. Mutaciones en las lisinas 278 y 361 de este sitio, resultan en la inhibición total de la capacidad de infección del virus. La evidencia sugiere que estos residuos funcionan como sitio de unión primario y que los otros sitios podrían ser importantes para la endocitosis y el desnudamiento del endosoma.^{27,28}

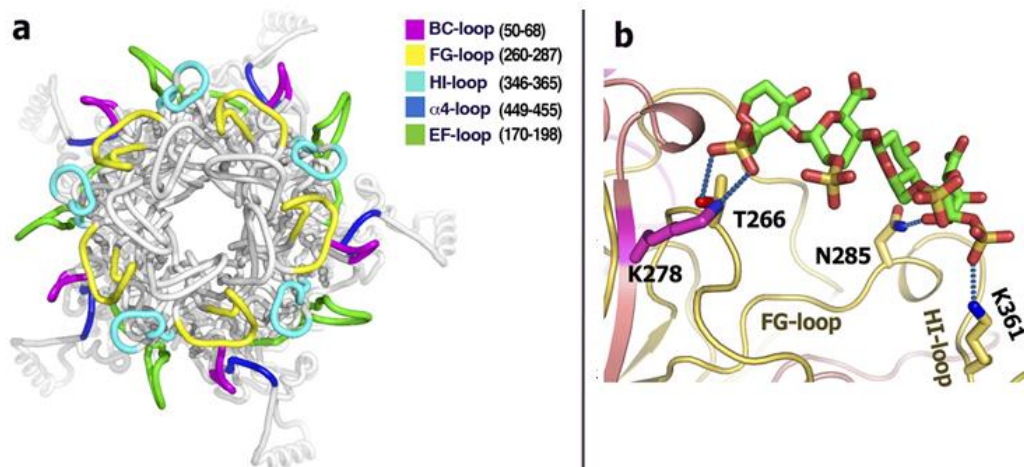


Figura 7. Interacción de la cápside de VPH16 con heparán sulfato (HS).²⁷ A) Se muestran en diferentes colores los loops que forman los sitios de unión para heparán sulfato; el resto del pentámero se marcan en gris. B) Se muestran en líneas punteadas azules, los puentes de hidrógeno formados entre los aminoácidos del sitio 1 (listones de colores) y el heparán sulfato (bastones verdes, amarillos y rojos).

Cuadro 1. Sitios de unión para heparán sulfato (HS) en la cápside de VPH16.²⁷

	Aminoácidos	Loops
Sitio 1	Lisina 278, treonina 266, asparagina 285 y lisina 361	FG y HI
Sitio 2	Lisina 54, asparagina 56, lisina 356, treonina 358 y treonina 266	FG, HI y BC
Sitio 3	Glutamina 196 y lisina 443	EF y α 4
Sitio 4	Lisina 59, asparagina 450 y lisina 452	BC y α 4

1.1.4 La entrada del virus a la célula y el ciclo de vida viral.

El VPH presenta un elevado tropismo por queratinocitos de la capa basal epitelial y su ciclo de vida está íntimamente ligado al proceso de diferenciación de éstas células. Se ha sugerido que el virus consigue penetrar hasta la capa basal a través de microabrasiones del tejido epitelial que probablemente se producen durante la relación sexual.²⁹

El primer contacto del virus con la célula se establece a través del HS. La unión del virus con el HS conduce a cambios conformacionales en la cápside que resultan en la exposición del dominio amino-terminal de L2. La región expuesta de L2 contiene un sitio de corte para la proteasa celular furina y es indispensable para la liberación del genoma una vez que el virus ha entrado en la célula.³⁰⁻³² Los cambios conformacionales también conducen a la pérdida de afinidad por HS y la transferencia a un receptor secundario, probablemente α -integrina.^{33,34} La unión del virus con el receptor secundario parece desencadenar una cascada de señalización para la endocitosis del virus (Figura 8). Existen controversias respecto a los detalles del proceso de endocitosis y al parecer el mecanismo no está conservado entre los VPH.^{35,36} Una vez que el endosoma ha sido internalizado, se libera en el citosol un complejo formado por el N-terminal de L2 y el genoma viral. El N-terminal de L2 funciona como una señal de localización nuclear y se asocia a proteínas celulares para trasladar el genoma al núcleo.^{37,38}

Cuando el DNA viral llega al núcleo, E1 y E2 son las primeras proteínas en expresarse para asistir en el establecimiento de entre 20 y 100 copias del genoma viral por célula (Figura 9). Dado que las células basales se dividen, cada célula hija contendrá copias del DNA viral.

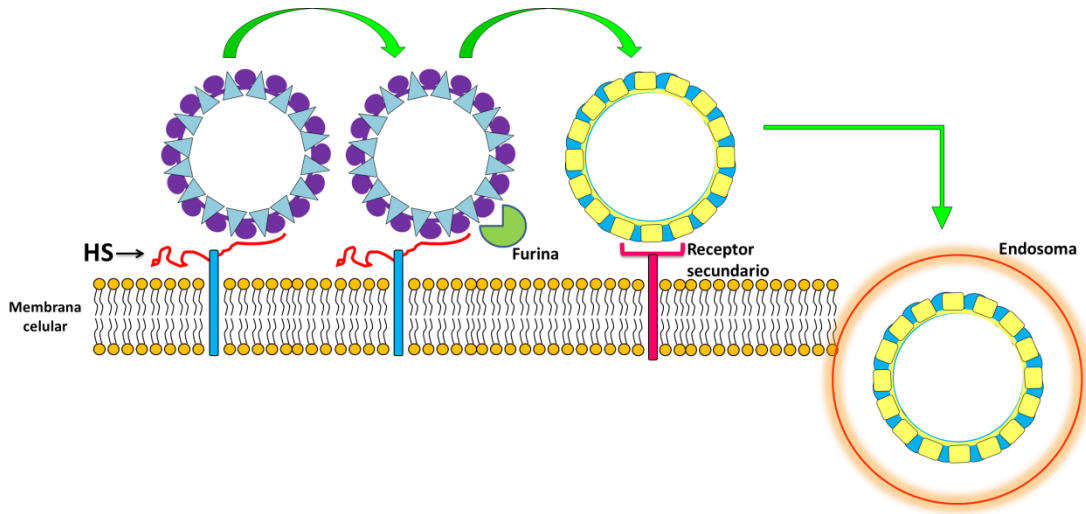


Figura 8. Entrada de VPH a la célula. La unión del virus a heparán sulfato (HS) en la membrana celular genera cambios conformacionales que exponen un sitio de corte en L2 para furina, y provocan la transferencia al receptor secundario. La unión con el receptor secundario parece desencadenar la endocitosis del virus.

Después de la mitosis, una célula permanece fija mientras que la otra puede desprenderse y dejar la capa basal. Normalmente, las células que se encuentran en las capas suprabasales, han iniciado el proceso de diferenciación y no se dividen; sin embargo, las células infectadas con VPH permanecen mitóticamente activas debido a las propiedades oncogénicas de las proteínas E5, E6 y E7. Particularmente, E6 y E7 inactivan a las proteínas celulares p53 y pRb, respectivamente, e inducen inmortalización y transformación celular.

En las capas superiores también se lleva a cabo el establecimiento de un mayor número de copias del genoma viral, seguido por la activación del promotor tardío que dirige la transcripción de los genes L1 y L2. Las proteínas L1 y L2 son expresadas en queratinocitos diferenciados para

ensamblar la cápside y finalmente el virus es liberado a través de la descamación natural que sufre el epitelio maduro.^{29,39}

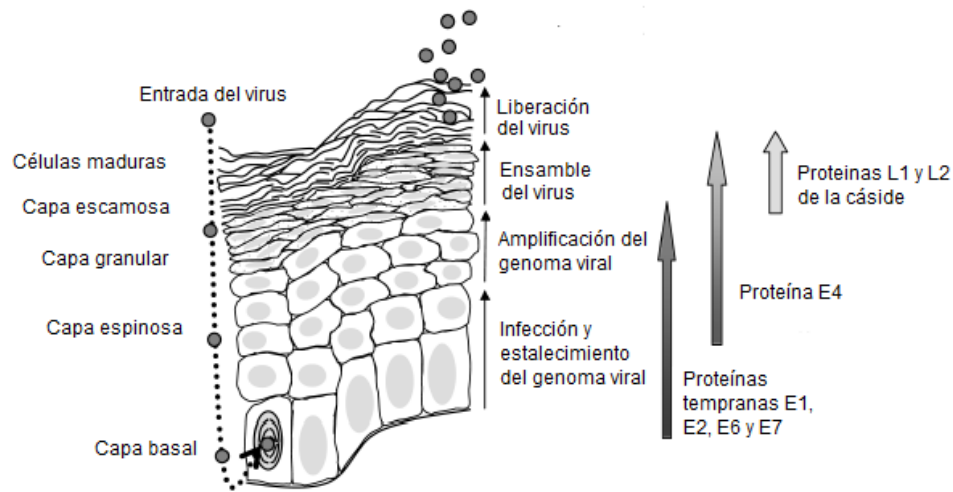


Figura 9. Ciclo de vida de VPH en un epitelio diferenciado.⁵. A la izquierda se muestran las diferentes capas del epitelio y la entrada del virus a través de una microdermoabradación del tejido. A la derecha se indican los eventos importantes del ciclo viral y el momento en que cada proteína se expresa.

1.1.5 Partículas tipo virus (VLPs) y pseudovirus (PsVs) de VPH.

Debido a que el ciclo de vida de VPH es dependiente del proceso de diferenciación de los queratinocitos infectados, la producción *in vitro* de viriones fue prácticamente imposible hasta el desarrollo de cultivos organotípicos basados en queratinocitos que portaban el genoma de VPH. Sin embargo; estos métodos son técnicamente complicados, requieren mucho tiempo y el rendimiento de virus es relativamente bajo. Estos problemas fueron parcialmente resueltos con el uso de partículas tipo virus (VLPs, de sus siglas en inglés: Virus-Like Particles) y pseudovirus (PsVs), los cuales son producidos usando sistemas de expresión heterólogos.⁴⁰

La proteína L1 tiene la habilidad de ensamblarse espontáneamente produciendo VLPs. Las VLPs carecen de genoma pero tienen una

superficie exterior esencialmente indistinguible de los viriones nativos (Figura 10B). La proteína L2 no es indispensable para la formación de las VLPs y el ensamble se lleva a cabo sin necesidad de alguna proteína chaperona.⁴¹⁻⁴⁴

Por otra parte, los PsVs son estructuras formadas por L1 y L2 que albergan un plásmido reportero en lugar de genoma viral. Los PsVs pueden infectar células eucariontes mimetizando el proceso de infección del virus nativo y la infección puede seguirse a través de la expresión de la proteína reportera. Al igual que las VLPs, los PsVs tienen características estructurales e inmunogénicas similares a los virus nativos (Figura 10C) y han sido utilizados para análisis estructurales, detección de anticuerpos neutralizantes y para el estudio de eventos tempranos en la infección viral tales como la unión del virus al receptor y las vías de entrada del virus a la célula.⁴⁵⁻⁴⁸

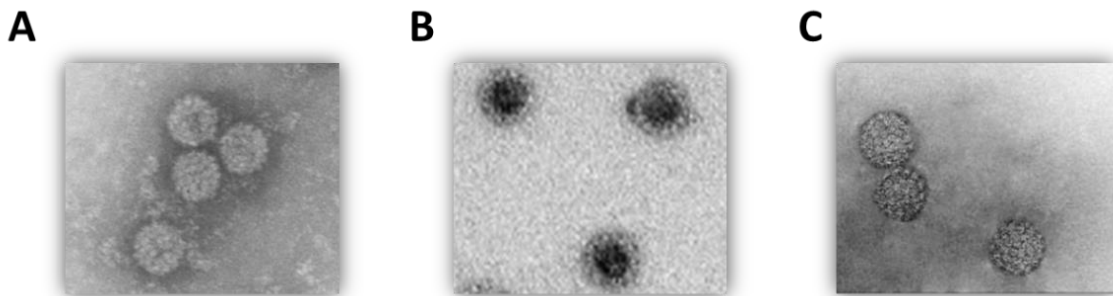


Figura 10. Morfología de VLPs y PsVs. A) Microscopía de viriones nativos de papilomavirus bovino.¹⁸ B) Microscopía de VLPs de L1 de VPH16.⁴⁹ C) Microscopía de pseudovirus de VPH16.²⁸

1.1.6 Vacunas contra VPH.

Considerando que las VLPs son inmunológicamente similares a los virus, éstas han sido utilizadas en la elaboración de vacunas. La FDA ha

aprobado tres vacunas para la prevención de la infección por VPH: Gardasil, Gardasil 9 y Cervarix. La vacuna cuadrivalente Gardasil previene la infección de los tipos más comunes de alto riesgo (VPH16 y VPH18) y los dos más comunes de bajo riesgo (VPH6 y VPH11); mientras que Gardasil 9 es una vacuna más completa que protege contra la infección de los tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, y 58. Por su parte, Cervarix previene únicamente la infección de VPH16 y 18. Las tres vacunas se administran en series de tres inyecciones intramusculares en un período de 6 meses.⁵⁰

La vacuna contra VPH ha sido incluida en el programa nacional de vacunación de varios países, principalmente europeos, resultando en una significativa disminución de las infecciones por VPH, lesiones precancerosas y verrugas genitales.^{51,52} En contraste, el 84% de los nuevos casos de cáncer cervical surgen en países en vías de desarrollo donde la aplicación de la vacuna está limitada por factores tales como su elevado precio, un inadecuado sistema de salud y barreras sociales y culturales.^{53,54} Así, diversos elementos podrían estar contribuyendo a la progresión del cáncer cervical, haciendo necesario el desarrollo continuo de herramientas que complementen a la vacuna.

1.2 Aptámeros

Los aptámeros son oligonucleótidos de cadena sencilla que se pliegan en una estructura tridimensional definida, lo que les permite reconocer específicamente a un blanco determinado (Figura 11).^{55,56} Los aptámeros tienen propiedades de reconocimiento molecular altamente complejas y son capaces de unirse fuerte y específicamente a blancos que van desde

moléculas pequeñas hasta complejas estructuras multiméricas e incluso células enteras.⁵⁷

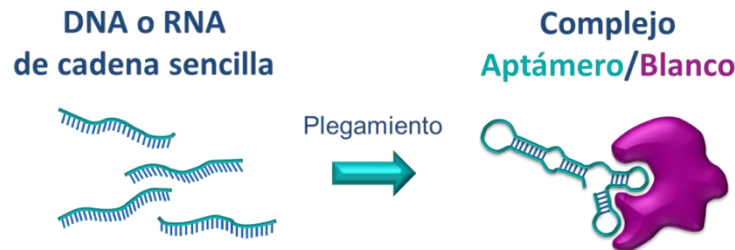


Figura 11. Reconocimiento de un aptámero y su blanco.⁵⁸ La unión del aptámero con su blanco genera el plegamiento del aptámero y un reconocimiento adaptativo aptámero-blanco.

1.2.1 Aislamiento de aptámeros

Los aptámeros son aislados de bibliotecas combinatorias de ácidos nucleicos sintéticos mediante un proceso iterativo *in vitro* de adsorción, recuperación y reamplificación denominado SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*).⁵⁶

El proceso SELEX inicia con la síntesis química de una biblioteca aleatorizada de DNA. La biblioteca consta de aproximadamente 10^{15} oligonucleótidos de cadena sencilla de entre 20 y 100 nucleótidos, cuya región central se encuentra aleatorizada y flanqueada por secuencias específicas de 18 a 21 nucleótidos, las cuales funcionan como sitios de anclaje para los iniciadores de la PCR.

Cuando se desea aislar un aptámero de RNA, la biblioteca de DNA de cadena sencilla (DNACs) debe ser transformada a DNA de cadena doble (DNACd) mediante PCR y posteriormente transcrita para generar una

biblioteca de RNA. Esta biblioteca de RNA es usada para realizar la primera ronda SELEX. Para aptámeros de DNA, la biblioteca de DNACs puede ser usada directamente en la primera ronda de SELEX.^{59,60}

Una vez obtenida la biblioteca apropiada, ésta se incuba con la molécula de interés. Cada secuencia de la biblioteca adopta una estructura tridimensional distinta como resultado de apareamientos de tipo Watson-Crick e interacciones moleculares no canónicas. Se espera que algunas secuencias adopten una estructura tal, que le permita unirse fuerte y específicamente al blanco. El complejo oligonucleótido-blanco es recuperado y las secuencias unidas son amplificadas por RT-PCR (para bibliotecas de RNA) o PCR (para bibliotecas de DNA) para tener un nuevo grupo de moléculas enriquecido en especies que se unen al blanco y que son usadas para iniciar el siguiente ciclo SELEX (Figura 12).⁵⁹ Así, mediante ciclos iterativos de selección y amplificación, el grupo inicial de oligonucleótidos aleatorizados es reducido a relativamente pocas secuencias con la más alta afinidad y especificidad por el blanco. Finalmente, el grupo de secuencias proveniente del último ciclo es clonado, secuenciado y analizado.⁶⁰

1.2.2 Ventajas de los aptámeros.

La afinidad de los aptámeros por su blanco es comparable a la de anticuerpos monoclonales por lo que han sido considerados como una alternativa al uso de anticuerpos en muchas aplicaciones biológicas.⁶¹ Además, la considerable afinidad y especificidad por su blanco, resaltan su gran potencial para aplicaciones terapéuticas, analíticas y de diagnóstico.⁶² Los aptámeros poseen ventajas importantes frente a otras

herramientas de reconocimiento molecular como los anticuerpos, entre las cuales se pueden mencionar: ⁶¹

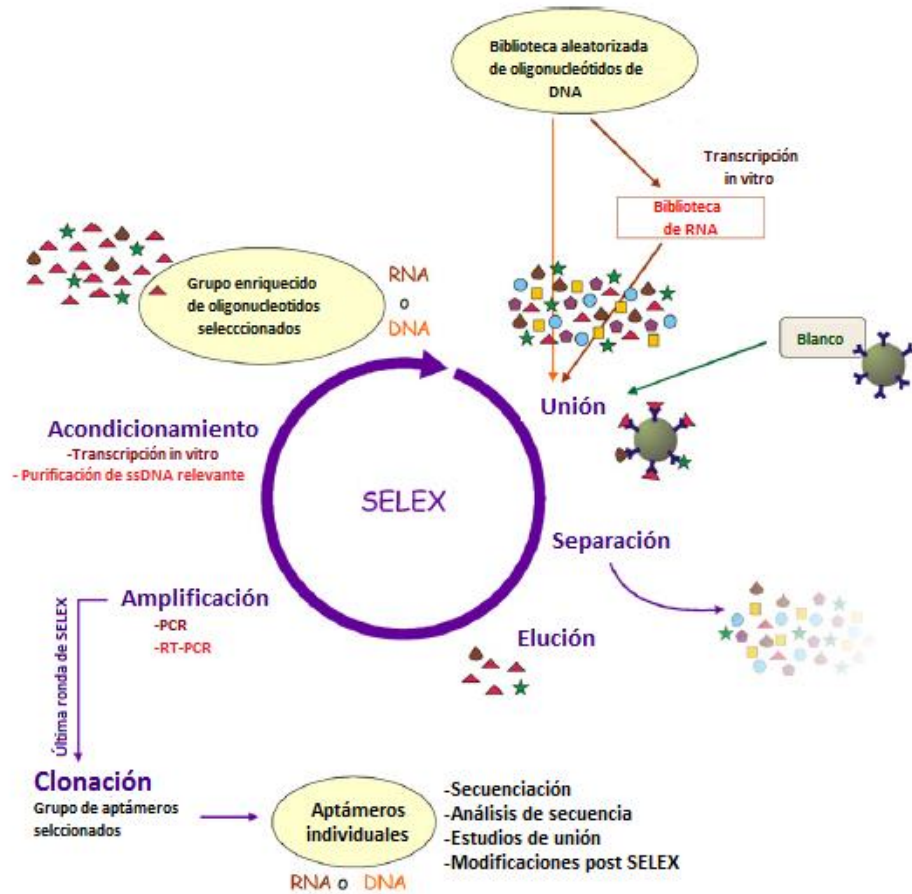


Figura 12. Representación del método SELEX.⁶⁰ Una biblioteca aleatorizada de DNA o RNA (figuras variadas de colores) es incubada con el blanco (círculo verde). Las secuencias unidas (triángulos rojos y estrella verde) son eluidas y amplificadas para iniciar una nueva ronda de incubación con el blanco.

- Se aíslan *in vitro*, por lo que pueden ser seleccionados contra sustancias tóxicas o no inmunogénicas y ser sintetizados en altas concentraciones con elevada reproducibilidad.

- Mantienen su estructura incluso después de repetidos ciclos de desnaturalización y renaturalización, recuperando su conformación nativa y conservando su capacidad de unión al blanco.
- En general, son moléculas con baja inmunogenicidad y baja toxicidad debido a que usualmente los ácidos nucleicos no son reconocidos por el sistema inmunitario humano como agentes externos.
- Tienen una alta afinidad y especificidad por algunos ligandos que no pueden ser reconocidos por los anticuerpos, como iones o moléculas muy pequeñas.

1.2.3 Aplicaciones de los aptámeros

Numerosas investigaciones han estudiado a los aptámeros como herramientas en diversas áreas. El uso de un aptámero en la fase estacionaria de una columna cromatográfica para la eficiente separación de enantiómeros; la detección de una proteína por electroforesis capilar mediante la fluorescencia emitida por el complejo proteína-aptámero marcado, y el uso de aptámeros como biocomponentes en biosensores, son algunos ejemplos de aplicaciones analíticas en donde los aptámeros han sido útiles.⁵⁹

Los aptámeros también han sido usados como agentes de diagnóstico, para el reconocimiento de proteínas comúnmente sobreexpresadas en carcinomas, con la finalidad de detectar el crecimiento o proliferación de tumores.^{63,64}

Uno de los ejemplos más importantes del uso de aptámeros como agentes terapéuticos es el aptámero que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); el VEGF está implicado en la inducción patológica del

crecimiento de vasos sanguíneos.⁶⁵ Este aptámero, comercialmente llamado Macugen™, fue el primero en ser aprobado por la FDA y comercializado para el tratamiento de la forma húmeda de degeneración macular asociada a la edad.⁶⁶

1.2.4. Modificaciones químicas a los aptámeros.

La principal desventaja de los aptámeros en aplicaciones biológicas, es su susceptibilidad a la degradación por nucleasas. Este problema ha sido parcialmente resuelto a través de la incorporación de modificaciones químicas que impiden el reconocimiento de las nucleasas.

La protección del extremo 3', mediante la conjugación de una timidina invertida o biotina, es una estrategia usada para proteger al aptámero de la degradación por las 3'-exonucleasas. Las modificaciones al anillo de ribosa, adicionando un grupo flúor (2'-F) o amino (2'-NH₂), y el reemplazo del enlace fosfodiéster por metilfosfonatos o fosforotioatos, son otras estrategias comúnmente usadas para incrementar la resistencia a nucleasas.

Por otra parte, los aptámeros de menor tamaño son susceptibles a la rápida excreción renal. Para resolver éste problema, se han añadido moléculas a los extremos 3' y 5' del aptámero como colesterol, lípidos y polietilenglicol (PEG). Estas moléculas incrementan el tamaño e impiden la filtración renal, resultando en un mayor tiempo de circulación.⁶⁷ Así, el uso de aptámeros en aplicaciones biológicas ha ido mejorando a lo largo del tiempo.

2

ANTECEDENTES

Previamente, nuestro equipo de investigación aisló y caracterizó el aptámero de RNA Sc5c3 que se une con alta afinidad y especificidad a VLPs formadas por la proteína L1 de VPH16.⁶⁸

La estructura del aptámero consta de 58 nucleótidos que forman un tallo de 6 nucleótidos (S1) seguido por una pequeña burbuja simétrica (B1), un segundo tallo (S2) de 4 nucleótidos, un loop principal (ML) de 16 nucleótidos y finalmente una región 3' no estructurada (UR) (Figura 13A).

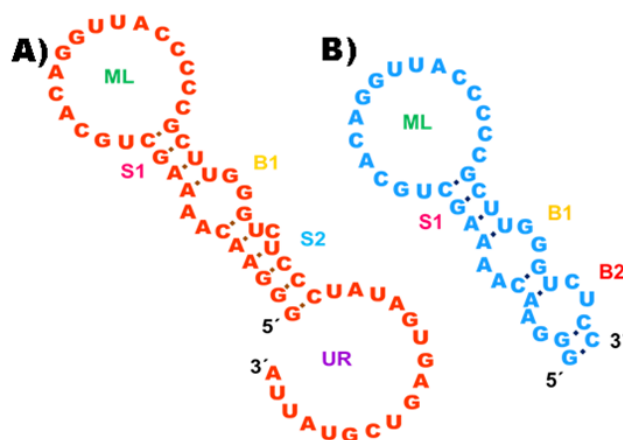


Figura 13. Estructura secundaria de los aptámeros Sc5c3 y Sc5c3Δ18.⁶⁸ A) Estructura del aptámero completo. Se indica la posición de los tallos (S1 y S2), la burbuja (B1), el loop principal (ML) y la región no estructurada (UR). B) Simulación *in silico* de la estructura del aptámero Sc5c3Δ18.

La región ML alberga nucleótidos importantes para la especificidad del aptámero. Particularmente, la modificación de los nucleótidos 15 al 28 en la región ML, disminuyó de forma importante la especificidad del aptámero. En contraste, la delección de 18 nucleótidos del extremo 3' (Figura 13B), condujo a un incremento de 40% en la unión, sin afectar la especificidad; por lo que esta versión corta, denominada Sc5c3Δ18, también podría ser útil en diversas aplicaciones biotecnológicas.

Los ensayos de unión mostraron una fuerte interacción entre el aptámero y las VLPs, con una constante de disociación (K_d) de 0.05 pM. Esta interacción parece ser más estable que la descrita para VPH33 y la superficie celular (K_d 100 pM), sugiriendo que la unión del aptámero con la cápside de VPH, podría impedir la interacción del virus con la superficie celular y de ésta forma evitar la infección.

Previas investigaciones han mostrado que es posible usar un aptámero para bloquear la infección de un virus y en general, se ha observado que los aptámeros que han sido aislados contra proteínas de la cápside, inhiben la infección viral al bloquear la interacción con el receptor celular.⁶⁹

Liu y su grupo de trabajo, aislaron aptámeros de RNA capaces de unirse fuertemente a partículas infectivas de citomegalovirus humano (CMVH). Para probar si los aptámeros eran capaces de inhibir la infección, los aptámeros y partículas infectivas de CMVH, se pre-incubaron antes de realizar una infección en células HFF (fibroblastos de prepucio humano). Las células HFF infectadas fueron cultivadas posteriormente en agarosa. Los resultados mostraron que dos de los aptámeros fueron capaces de reducir la formación de placas virales de manera dosis-dependiente. Además, se mostró la disminución de la producción de virus en células infectadas con CMVH pre-tratados con los aptámeros y la disminución de

la expresión de IE72, una proteína viral que se expresa inmediatamente después de la infección. Estos resultados conjuntos, mostraron que la infección por CMVH podía ser bloqueada por los aptámeros.⁷⁰

Joen y su grupo de investigación aislaron un aptámero de DNA denominado C-735M que se une a una región conservada de hemaglutinina (HA). HA es expresada en la envoltura del virus de la influenza aviar y participa en la interacción del virus con los receptores en la superficie celular (oligosacáridos que contienen ácido siálico). La actividad antiviral de C7-35M fue medida, mostrando que la exposición de un cultivo de células MDCK al virus de la influenza aviar, conducía a la muerte de prácticamente todas las células; mientras que la viabilidad celular se incrementó, de forma dosis-dependiente, al tratar las células con el aptámero. Finalmente, fue posible alcanzar hasta un 55% de inhibición de la infección viral usando 1 nmol del aptámero.⁷¹

Zhu y su equipo de trabajo aislaron un grupo de seis aptámeros de DNA contra la proteína de la cápside E1E2 del virus de la hepatitis C (VHC). El VHC infecta la célula hospedera a través de la interacción entre E1E2 y el receptor celular CD81. Los investigadores encontraron que los niveles de RNA viral intracelular y los niveles de virus infecciosos extracelulares, disminuían cuando la infección se realizaba en presencia de los aptámeros, mostrando con ello que los aptámeros podían inhibir la infección de VHC.⁷²

Estos trabajos sentaron un precedente positivo para el presente trabajo, el cual propuso usar el aptámero Sc5c3 para inhibir la infección de VPH16.

3

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervical es el segundo tipo de cáncer más común en mujeres en el mundo. Virtualmente todos los casos de cáncer cervical, están asociados a algún tipo de VPH de alto riesgo, especialmente a VPH16. Cada año, más de 270 000 mujeres mueren de cáncer cervical y el 85% de las muertes suceden en países de bajos y medianos recursos.

A la fecha, se han desarrollado y comercializado vacunas que previenen la infección de VPH; sin embargo, en México, las campañas de vacunación están dirigidas a niñas entre 11 y 13 años, dejando desprotegidas a mujeres que no cumplen estas características y a niños que eventualmente podrían convertirse en portadores del virus. Adicionalmente, la vacuna incluye tres aplicaciones independientes, cada una con un elevado costo; lo que reduce aún más el segmento de la población que tiene acceso a la inmunización. Dado lo anterior, el desarrollo de herramientas que complementen a la vacuna y que sean de más fácil acceso es una necesidad

El presente trabajo propuso probar la capacidad del aptámero Sc5c3 para bloquear la infección por VPH y que esto sirviera como base para el desarrollo de una herramienta de control de la infección por VPH16 de fácil producción y de fácil acceso.

4

HIPÓTESIS

La unión del aptámero Sc5c3 con pseudovirus de VPH16, impedirá el contacto de la cápside viral con la superficie celular, inhibiendo el proceso de pseudoinfección.

5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Inhibir la infección del virus del papiloma humano tipo 16 usando aptámeros de ácidos nucleicos dirigidos contra la proteína L1 de VPH16.

5.2 Objetivos específicos

- 1.- Producir pseudovirus de VPH16 formados por L1 y L2 y usando YFP como gen reportero.
- 2.- Evaluar la capacidad de los aptámeros Sc5c3 y Sc5c3 Δ 18 para bloquear la infección por VPH16.
- 3.- Producir partículas tipo virus (VLPs) de VPH16 con mutaciones en aminoácidos involucrados en el reconocimiento de HS
- 4.- Analizar la interacción de las VLPs mutantes con los aptámeros Sc5c3 y Sc5-c3 Δ 18 mediante análisis de asociación molecular.
- 5.- Proponer un modelo de la inhibición de la infección de VPH16 por aptámeros.

6

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo celular.

Las células 293T se cultivaron en placas de 100 mm a 37 °C y 5% de CO₂ usando medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS) (Thermo Fisher Scientific), 100 IU/mL de ampicilina, 100 µg/mL de estreptomycin (PAA Laboratories Inc., ON Canada) y 200 µg/mL de higromicina (Thermo Fisher Scientific)

Para la producción de VLPs, las células Sf-21 de *Spodoptera frugiperda* (Thermo Fisher Scientific) se cultivaron en botellas T-75 a 26 °C en medio SF 900-II (Thermo Fisher Scientific) libre de suero.

6.2 Plásmidos y oligonucleótidos.

Todos los oligonucleótidos se adquirieron de T4 oligo™ (ADN Sintético S.A.P.I., Gto., Mexico).

Los primers FwL1XhoI (5'-ATC TCG AGT AAT GAG CCT GTG GC-3') y RvL1HindIII-EcoRI (5'-CGG CCA TGA ATT CAA AAA GCT TCA CAG CTT CCT CTT-3') se usaron para amplificar las secuencias de L1 mutantes.

Los plásmidos p16L1h y p16L2h fueron gentilmente donados por el Doctor John T. Schiller (Laboratory of Cellular Oncology, Center for Cancer Research, NIH).

El plásmido p16SheLL se adquirió de Addgene (Cambridge MA).

El plásmido pSVLYFP se construyó mediante la inserción del gen YFP, derivado del plásmido pEYFP (BD Biosciences Clontech), en el vector de expresión pSVL (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh PA).

6.3 Producción de aptámeros.

Los aptámeros se produjeron mediante transcripción *in vitro* siguiendo el protocolo previamente descrito.⁷³ Brevemente, los aptámeros se amplificaron mediante PCR y el producto fue transcrito usando T3 RNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido se separó en un gel desnaturizante de poliacrilamida (acrilamida-bis acrilamida 29:1 al 8%, urea 7M). La banda correspondiente al producto completo se recuperó, se colocó en buffer de elución (Acetato de amonio 0.5 M, EDTA 1mM y SDS 0.1%) y se incubó a 4 °C durante toda la noche. El RNA eluido se purificó mediante extracción fenólica con TRIzol® (Invitrogen) seguida de precipitación con isopropanol.

En el caso de los aptámeros marcados radioactivamente, el UTP de la reacción de transcripción se sustituyó por 1µL de α -[³²P]-UTP (111 TBq/mmol). El procedimiento fue exactamente el mismo, teniendo las precauciones pertinentes para el uso de material radiactivo.

6.4 Producción de pseudovirus (PsVs) de VPH16.

Los pseudovirus (PsV) se produjeron con base en el método previamente descrito.⁷⁴ Se inocularon 5 millones de células 293TT en una placa de 100mm (Corning) y se incubaron durante 14 horas en DMEM suplementado con FBS y antibióticos. Al día siguiente, se colocaron 15 µg de pSVLYFP con 15 µg de p16L1h y 15 µg de p16L2h; o bien 15 µg de pSVLYFP con 27 µg de p16sheLL, en 0.5 mL de OptiMEM® (Thermo Fischer Scientific) y en otro tubo 16 µL de Lipofectin® (Thermo Fischer Scientific) con 0.5 mL de OptiMEM®. Ambas preparaciones se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los plásmidos y el agente transfectante se mezclaron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego la mezcla se adicionó a las células 293TT en 4 mL de medio de OptiMEM®. El cultivo se incubó durante 6 horas y posteriormente se cambió el medio por DMEM suplementado con FBS y antibióticos. 72 horas post-transfección, las células se cosecharon, se lavaron con DPBS (KCl 2.67 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, NaCl 137.93 mM y Na₂HPO₄·7H₂O 8.06 mM; pH 7.4) y se resuspendieron en DPBS-Mg (DPBS adicionado con 9.5 mM de MgCl₂) suplementado con Brij 58 a una concentración final de 0.25%. La mezcla se incubó a 37 °C durante 24 horas para su maduración. El lisado maduro se adicionó con Benzonasa® (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0.1% durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 0.17 volúmenes de NaCl 5M, se incubó en hielo durante 10 minutos y se clarificó por centrifugación a 2000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se recuperó y se colocó en un gradiente de OptiPrep™ (Sigma) y se sometió a ultracentrifugación a 170,000 x g, a 16 °C durante 20 h. La fracción del gradiente que contenía los PsVs se recuperó y se filtró a través de una columna de Sephadex® G25 column (GE Healthcare Biosciences) usando DPBS-0.5 M NaCl. La producción de PsVs se verificó mediante

inmunotransferencia de la proteína L1 y por microscopía de transmisión electrónica. Los PsVs se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

6.5 Inmunotransferencia.

15 µg de VLPs o 1 µg de PsVs se colocaron en un volumen de buffer Laemmli 2X (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerol 25%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 2% (v/v), azul de bromofenol 0.01% (p/v)) y se llevaron a ebullición durante 5 minutos. Las proteínas desnaturalizadas se cargaron en un gel de poliacrilamida para su separación. La electroforesis se llevó a cabo utilizando un gel concentrador al 4% (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 0.1% (p/v)) y un gel separador al 8% (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.1% (p/v)) en buffer TGS (Tris 25mM pH 8.3, glicina 192mM, SDS 0.1% (p/v)) durante 1 hora a 125 volts. El gel se transfirió a una membrana de PVDF (Millipore Corporation, Bedford MA) usando buffer de transferencia (Tris-base 25mM, glicina 192mM, Metanol 20% (v/v)) y dos ciclos de turbo blot para mini geles en un Transblot® (Trans-Blot®Turbo™Transfer System Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con leche (Svelty descremada en polvo) al 10% en DPBS-Tween (DPBS adicionado con Tween 0.1% v/v) y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario diluido en DPBS-Tween a la concentración indicada en el cuadro 2, en agitación suave durante 16 horas. El anticuerpo secundario se diluyó según lo indicado en el cuadro 2 en PBS-Tween adicionado con 1.5% de leche y se incubó con las membranas durante 2 horas. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces con 25 mL de PBS-Tween 0.1% durante 20 minutos y se revelaron con la solución Luminata™ Classico (EMD Millipore, Billerica MA) en un C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR Biosciences Inc., Lincoln NE) usando el protocolo estándar.

6.6 Microscopía electrónica de transmisión.

Aproximadamente 20 μL de PsVs se colocaron sobre una rejilla de cobre 200 mesh con una membrana de Formvar/carbón. Se permitió la adsorción durante 3 minutos y luego se retiró el exceso de líquido. Se adicionaron 20 μL de acetato de uranilo al 2% para realizar la tinción, luego de dos minutos se retiró el exceso de líquido y las membranas se almacenaron para su posterior análisis.

Cuadro 2. Anticuerpos usados en la inmunotransferencia

Anticuerpo	Concentración
HPV16 L1 (289-16981), mouse IgG Monoclonal. (Santa Cruz Biotechnology. Cat. SC57834)	400 ng/mL
HPV16 L2 (B14), mouse IgG Monoclonal. (Santa Cruz Biotechnology. Cat.SC138)	400 ng/mL
Donkey anti-mouse IgG-HPR. (Santa Cruz Biotechnology. Cat.SC2314)	200 ng/mL

6.7.- Titulación del stock viral.

La infectividad de los PsVs se determinó por el número de células fluorescentes generadas por 1 μL de stock viral. 1×10^5 células 293TT se inocularon en cada pozo de una placa de 24 pozos. Después de 16 horas, se inoculó 1 μL del stock de PsVs en al menos 3 pozos y el cultivo se incubó por 72 h. Transcurrido este tiempo, las células se cosecharon, se recuperaron por centrifugación, se lavaron con 1mL de DPBS y luego se resuspendieron en 0.5 mL del mismo buffer. El número de células fluorescentes se cuantificó mediante citometría de flujo. Cada célula fluorescente se consideró una unidad infecciosa (UI). La infectividad se determinó como el promedio de al menos tres mediciones. La linealidad

de éste método se conserva sólo hasta el 25% de células infectadas,⁷⁴ por lo que para la cuantificación de PsVs muy concentrados se realizaron diluciones seriadas.

6.8 Producción de partículas tipo virus (VLPs).

Las partículas tipo virus (VLPs) de VPH16 se produjeron con base en un método antes descrito.^{73,75} Las secuencias de L1 silvestre y mutantes (gentilmente donadas por el Doctor Martin Sapp, Department of Microbiology and Immunology, LSU Health Sciences Center) se amplificaron usando los primers FwL1XhoI y RvL1HindIII-EcoRI, y se clonaron en el plásmido pFastBac del kit Bac-to-Bac™ Baculovirus Expression System (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los baculovirus recombinantes obtenidos se usaron para infectar células Sf21 en proliferación en medio Sf900-II a 26 °C durante 72 horas. Transcurrido este tiempo las células se cosecharon, se resuspendieron en DPBS-Mg y se lisaron por sonicación en un equipo GEX 130 PB (Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills IL). Posteriormente, se siguió el protocolo para maduración descrito en la sección de “Producción de pseudovirus (PsVs) de VPH16”. El clarificado se purificó en un gradiente isopícnico de CsCl al 27 % a 170,000 x g, a 16 °C durante 20 h. La banda correspondiente a las VLPs se recuperó y la presencia de L1 se verificó mediante inmunotransferencia. Las preparaciones se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

6.9 Ensayos de unión.

Se preparó una mezcla de interacción con 500 ng de VLPs o PsVs, 2 pmol de aptámero marcado radioactivamente y 40 U de inhibidor de ribonucleasas Ribolock® (Thermo Fischer Scientific) en un volumen final de

80 μ L de DPBS. La mezcla se incubó en agitación suave a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se colocó en un sistema de slot blot previamente reportado.^{73,76} El slot blot se ensambló con una membrana de nitrocelulosa (NC) (GE Healthcare Biosciences) sobre una membrana de nylon (NY) (GE Healthcare Biosciences). Las membranas NC y NY retienen los complejos RNA-proteína y el RNA libre, respectivamente. Antes y después de colocar las mezclas de interacción, los pozos del slot blot se lavaron con 1 mL de PBS. Posteriormente, las membranas se expusieron a una placa de almacenamiento fluorográfico y luego se leyó en un escáner fluorográfico Typhoon 8600. La imagen se analizó con el software ImageQuant 5.2 para determinar el porcentaje de radiactividad en cada membrana

6.10 Inhibición de la pseudo-infección de VPH16.

Se inocularon 1×10^5 células 293TT en cada pozo de una placa de 24 pozos y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 16 h. Posteriormente, se retiró cuidadosamente el medio de cultivo y se adicionó 0.5 mL de DMEM libre de suero y antibióticos pre-calentado a 37 °C y se incubó durante 1 hora más. Las células 293TT se desprenden fácilmente durante el cambio de medio por lo que es necesario permitir que se adhieran nuevamente a la placa antes de continuar con el protocolo. Por otra parte, se prepararon las mezclas de infección con 5000 UI de PsVs, 80 U de Ribolock® y concentraciones crecientes de los aptámeros, tRNA o heparina, en un volumen final de 80 μ L de DPBS. Las mezclas de infección se incubaron en agitación suave durante 20 min a temperatura ambiente y luego se adicionaron a las células 293TT. Se permitió la adsorción del virus durante 20 minutos y luego el medio se reemplazó por 1 mL de DMEM adicionado e FBS y antibióticos pre-calentado a 37 °C. Las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 72 h y posteriormente se evaluaron mediante

microscopía de fluorescencia y se prepararon para ser cuantificadas por citometría de flujo.

6.11 Citometría de flujo.

Las células 293TT de los ensayos de inhibición de la infección y para cuantificación del título viral, se cosecharon mediante tripsinización y se recuperaron en un microtubo mediante centrifugación. El botón celular se lavó con 1 mL de PBS y posteriormente se resuspendió en 0.5 mL de PBS. El número de células fluorescentes se cuantificó en un citómetro FACScalibur (BD Biosciences, San Jose CA). La excitación se realizó con un láser de Argón de 488 nm y se colectó la fluorescencia emitida con un filtro de paso de banda a 530/30 nm (FL1). Se leyeron 1×10^4 eventos por muestra.

6.12 Análisis estadístico.

Se usó una prueba de comparación múltiple de Dunnett o una prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fischer, según fuese apropiado. La prueba estadística usada y la significancia se indicaron en cada experimento.

Las pruebas se realizaron usando el software GraphPad Prism 7.0.

7

RESULTADOS

7.1 Producción de pseudovirus (PsVs) de VPH16.

La producción de pseudovirus (PsVs) está basada en la co-expresión de las proteínas L1 y L2, las cuales ensamblan de forma espontánea la cápside de VPH y encapsidan el plásmido reportero (pseudogenoma) pSVLYFP. Los PsVs mimetizan el proceso de infección de los virus nativos resultando en la expresión de la proteína reportera YFP.

Los PsVs se produjeron co-transfectando en células 293TT, los plásmidos p16L1h y p16L2h que codifican las proteínas L1 y L2 de VPH16, respectivamente. Para caracterizar los PsVs, se verificó la expresión de L1, L2 y YFP mediante inmunotransferencia. La inmunotransferencia mostró la presencia de una banda de aproximadamente 28 kDa correspondiente a YFP (Figura 14A) y una banda ligeramente mayor a 55 kDa que confirma la expresión de L1 (Figura 14B); sin embargo, no se observó la banda correspondiente a L2 (Figura 13C).

A pesar de que no fue posible observar la presencia de L2, se procedió a evaluar la funcionalidad de los PsVs mediante la infección de un cultivo de

células 293TT. 72 horas después de la infección, las células presentaron fluorescencia (Figura 15), demostrando que los PsVs se internalizaron y liberaron el plásmido reportero, y sugiriendo que L2 sí se encontraba presente en los PsVs ya que ésta es indispensable para la encapsidación del genoma y la entrada del virus a la célula.⁷⁷ Así, es posible que L2 se estuviera expresando en bajas cantidades, pero suficiente para conseguir la infección.

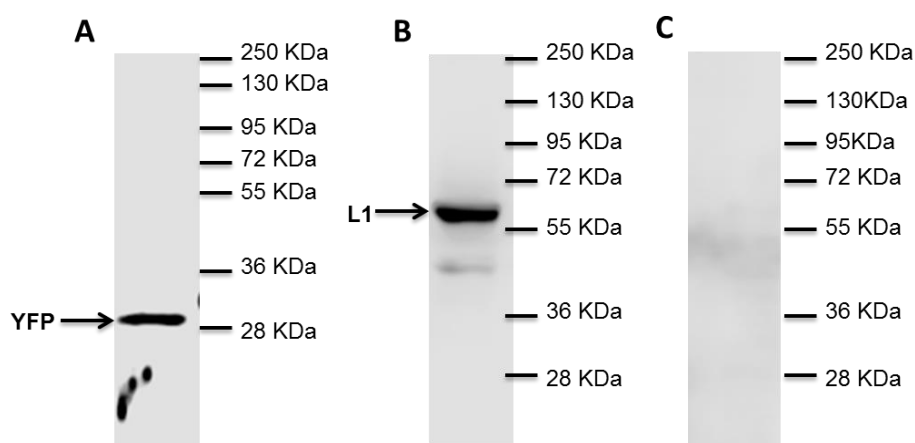


Figura 14. Caracterización de los PsVs de VPH16. Inmunotransferencia de los pseudovirus producidos usando los plásmidos p16L1h y p16L2h. Las flechas indican las bandas correspondientes a las proteínas (A) YFP, (B) L1 VPH16 y (C) L2 VPH16.

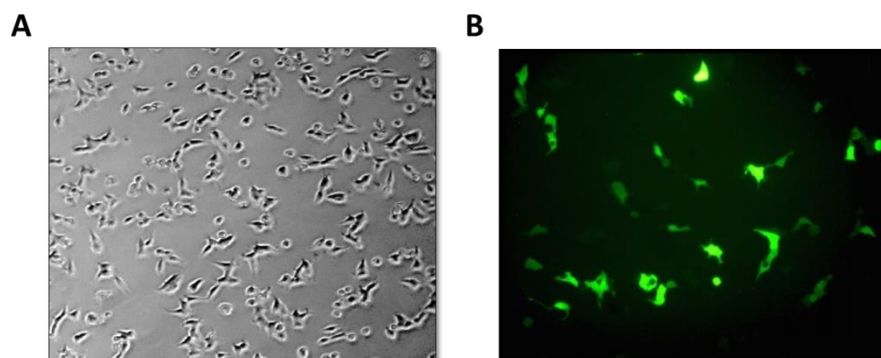


Figura 15. Infección de células 293TT con PsVs de VPH16. A) Microscopía de campo claro de células 293TT infectadas con PsVs de VPH16. B) Microscopía de fluorescencia de células 293TT, 72 horas después de la infección con PsVs de VPH16.

Como parte de la caracterización, se realizó una microscopía electrónica de transmisión de los PsVs. La microscopía mostró estructuras poliédricas de aproximadamente 50 nm con superficie irregular (Figura 16), como se ha descrito para los viriones nativos de VPH.^{18,78}

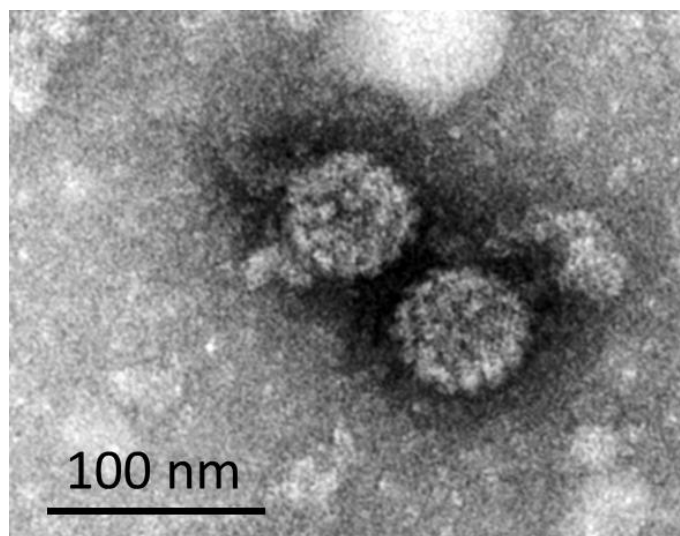


Figura 16. Microscopía electrónica de transmisión de PsVs de VPH16. Se observan estructuras de aproximadamente 50 nm, similares a los virus nativos de HPV. La escala se indica con una barra negra.

Estos resultados mostraron la correcta producción de PsVs y su utilidad para ser empleados como modelo de infección de VPH16.

7.2 Efecto del heparán sulfato (HS) en la unión Sc5c3- VLPs.

La infección de VPH comienza con la interacción de la cápside con heparán sulfato (HS) expuesto en la matriz extracelular o sobre la superficie celular. Considerando la elevada afinidad de Sc5c3 por las VLPs ($K_d=0.05$ pM), y que ésta es mayor a la reportada para VPH33 y la superficie celular

(Kd=100 pM), el aptámero podría ser una herramienta para bloquear la interacción VPH-HS, y de esta manera inhibir la infección.

Como ensayo preliminar para probar la capacidad inhibitoria de Sc5c3, se realizó un ensayo de unión entre el aptámero y las VLPs en presencia de HS. Para tal efecto, se incubaron cantidades fijas de VLPs y Sc5c3 marcado radioactivamente con cantidades crecientes de HS, heparina y condroitin sulfato. Luego, las mezclas de unión se separaron en un equipo de slot blot ensamblado con una membrana de nitrocelulosa (NC), que retiene el complejo aptámero-proteína y una membrana de nylon (NY), que retiene el aptámero libre. Así, la radioactividad presente en cada membrana, permite establecer la fracción de aptámero unido a la proteína y la fracción de aptámero libre.

La heparina y el condroitin sulfato son glucosaminoglicanos similares al HS. El HS y la heparina tienen básicamente la misma estructura; sin embargo, el grado de sulfatación en la heparina es mayor, mientras que en el condroitin sulfato, los grupos sulfato se encuentran en una posición diferente (Figura 17).

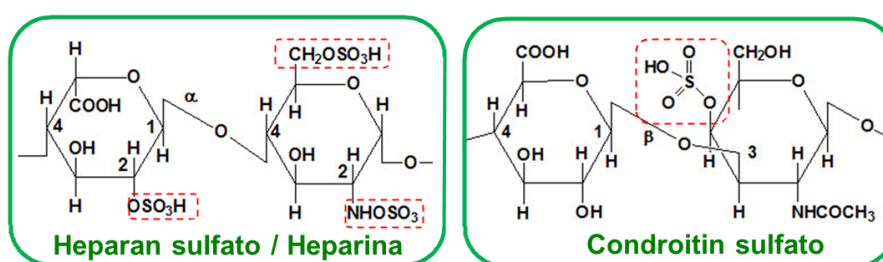


Figura 17. Estructura del HS, heparina y condroitin sulfato. Las tres moléculas están formadas por un ácido urónico y un azúcar; sin embargo difieren en el grado y posición de los grupos sulfato. Se marca en líneas punteadas rojas la posición de los grupos sulfato en cada molécula.

Se ha mostrado que las características estructurales del HS y la heparina permiten que intervengan en la interacción VPH-HS inhibiendo la

infección,^{23,79} por lo que la heparina se usó como control positivo. Por otra parte, el condroitin sulfato no tiene efecto en la infección, posiblemente debido a que la posición del grupo sulfato no promueve la interacción con la cápside; y por ello fue usado como control negativo en los ensayos de unión.^{79,80}

Los resultados mostraron que la presencia de HS genera una disminución dosis- dependiente de la unión de Sc5c3 a las VLPs. La heparina también disminuyó la unión de Sc5c3; sin embargo, su efecto fue mayor que el generado por HS, probablemente debido a su alto contenido de grupos sulfato. Como se esperaba, el condroitin sulfato no tuvo un efecto en la unión de Sc5c3 (Figura 18).

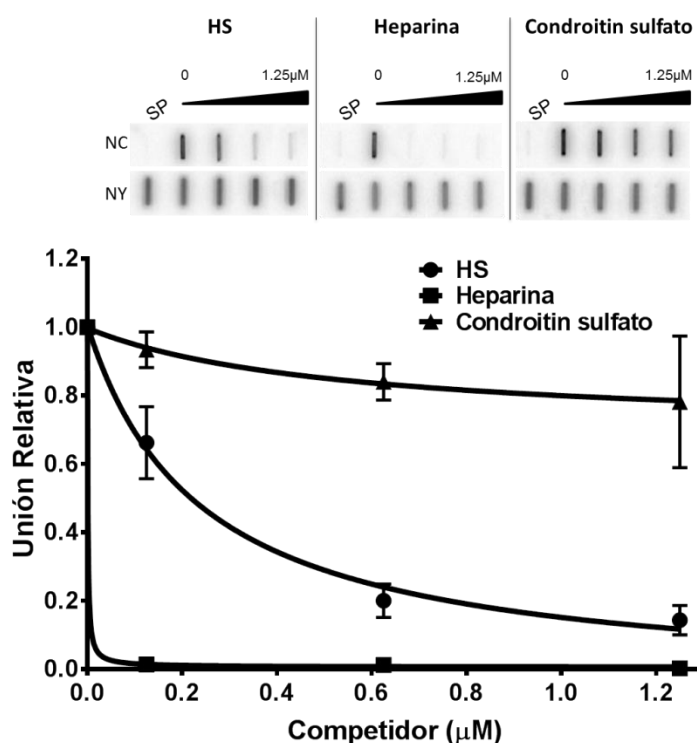


Figura 18. Efecto del HS en la unión de Sc5c3. *Panel superior:* Radioactividad residual en las membranas de nitrocelulosa (NC) y nylon (NY) del ensayo de unión Sc5c3-VLPs en presencia de HS, heparina o condroitin sulfato. Se incluyó un control sin proteína (SP). *Panel inferior:* Cuantificación de la radiactividad residual en cada membrana. Los resultados se muestran de forma relativa a la unión Sc5c3-VLPs sin competidor y representan el promedio y la desviación estándar de tres ensayos independientes.

Estos resultados mostraron que la presencia de HS afecta negativamente la unión del aptámero con las VLPs y sugiere que de forma semejante, el aptámero podría afectar negativamente la interacción HS-VLPs. Así, Sc5c3 podría ser empleado para impedir la interacción de la cápside viral con el HS celular y de esta forma inhibir la infección.

Considerando la disponibilidad y el efecto potenciado de la heparina frente al HS, en adelante la heparina fue usada como análogo del HS y se usó como control positivo.

7.3 Unión de Sc5c3 a PsVs de VPH16.

Tanto los PsVs como las VLPs son virtualmente indistinguibles del virión nativo; sin embargo, se realizó un ensayo de unión para demostrar que Sc5c3, inicialmente aislado contra VLPs, conservaba su capacidad de unión y reconocía a los PsVs. Para ello, se preparó una mezcla de interacción con el aptámero marcado radioactivamente y VLPs, PsVs o BSA. Los resultados mostraron que el aptámero se une indistintamente a las VLPs y a los PsVs de VPH16. Como controles se incluyeron una mezcla de interacción sin proteína (NP) y otra con la proteína BSA, por la cual el aptámero no presentó afinidad (Figura 19).

7.4 Inhibición de la infección de PsVs de VPH16 usando aptámeros.

Los PsVs son estructuras cuya cápside es indistinguible de los virus nativos de VPH, sin embargo, llevan el plásmido reportero pSVLYFP en lugar del genoma de VPH. Los PsVs mimetizan la entrada de VPH a la célula liberando el plásmido reportero y en consecuencia la proteína YFP es expresada. De esta forma, la presencia de fluorescencia en una célula que

fue expuesta a PsVs, se interpreta como una infección eficiente o pseudoinfección.

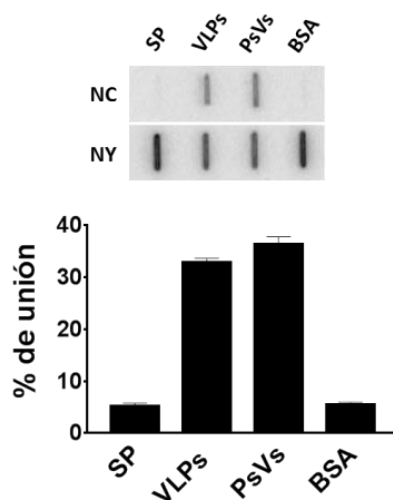


Figura 19. Unión del aptámero Sc5c3 a PsVs de VPH16. *Panel superior:* Membranas de nylon (NY) y nitrocelulosa (NC) del ensayo de unión de Sc5c3-PsVs. *Panel inferior:* Cuantificación de la fracción de Sc5c3 unida a VLPs, PsVs o BSA. SP, control sin proteína. Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Para mostrar que los aptámeros tenían la capacidad de inhibir la infección de VPH16, los PsVs se incubaron con 30 μ M de Sc5c3, Sc5c3 Δ 18, tRNA, como control negativo o heparina como control positivo, antes de infectar un cultivo de células 293TT. A 72 horas después de la infección, las células se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia donde se observó una clara disminución de la fluorescencia en los cultivos tratados con Sc5c3, Sc5c3 Δ 18 y heparina, respecto al control no tratado (NT) (Figura 20A). El cultivo tratado con tRNA no presentó cambios respecto a NT.

Posteriormente, el número de células infectadas se cuantificó por citometría de flujo. Los resultados mostraron que la pre-incubación de los PsVs con Sc5c3, ocasionó una disminución del 61% en el número de células fluorescentes (Figura 20B). El tratamiento con Sc5c3 Δ 18 disminuyó la fluorescencia en aproximadamente 55%; sin embargo, el análisis

estadístico indicó que no existía diferencia significativa entre el tratamiento con Sc5c3 y con Sc5c3 Δ 18 (prueba de LSD de Fisher, $n=3$, $\alpha=0.01$). Como se esperaba, el control negativo tRNA no generó un efecto significativo y la heparina inhibió en 80% la infección. Estos resultados mostraron que los aptámeros Sc5c3 y Sc5c3 Δ 18 tenían la capacidad de inhibir la infección de PsVs de VPH16.

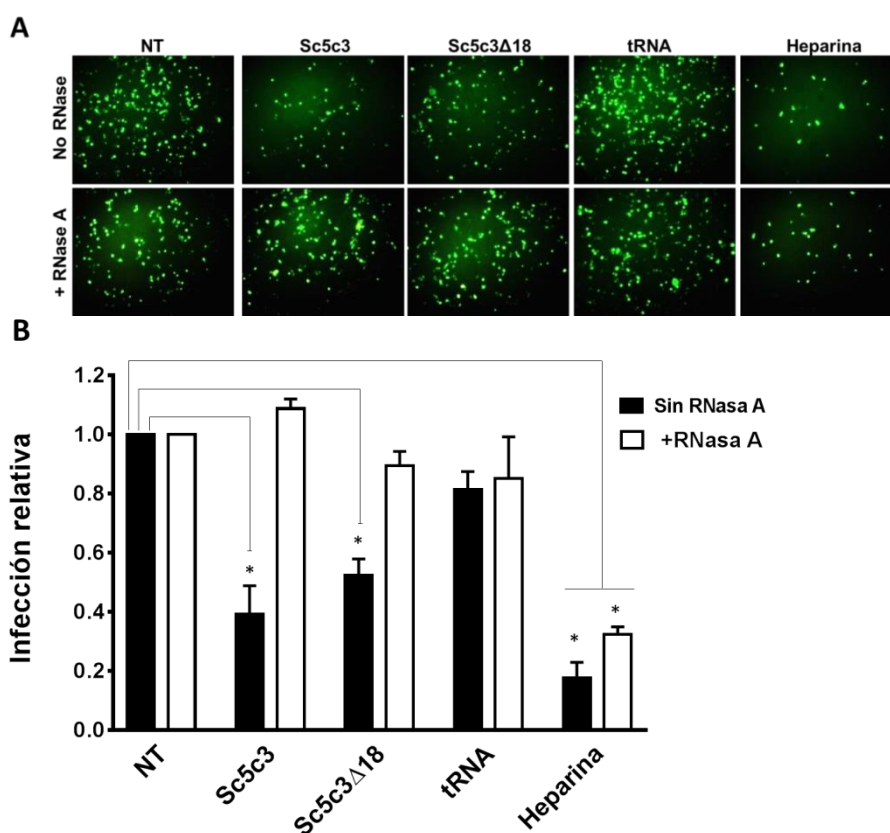


Figura 20. Inhibición de la infección de PsVs de VPH16 A) Microscopía de fluorescencia de células 293TT infectadas con PsVs preincubados con Sc5c3, Sc5c3 Δ 18, tRNA o heparina. B) Cuantificación por citometría de flujo de las células infectadas con PsVs pre-incubados con Sc5c3, Sc5c3 Δ 18, tRNA o heparina. Los resultados se presentan relativos al control no tratado (NT) y representan el promedio y la desviación estándar de tres ensayos independientes. *Disminución significativa de la infección respecto al control no tratado (NT) (Prueba de Dunnett, $n=3$, $\alpha=0.01$)

Para respaldar este resultado, la pre-incubación de los PsVs y los aptámeros se realizó en presencia de RNAsa A; así, la degradación de los aptámeros por la RNAsa A, resultaría en la restauración de la capacidad infectiva de los PsVs. La cuantificación citométrica de las células 293TT infectadas mostró que en efecto, los cultivos tratados con Sc5c3 y Sc5c3 Δ 18, tuvieron los mismos niveles de fluorescencia respecto al control no tratado (Figura 20); demostrando que la actividad inhibitoria reside en el RNA.

Como control adicional de especificidad, se usó una mutante del aptámero Sc5c3 previamente caracterizada (C27A). La mutante C27A tiene un cambio de citosina por adenina en la posición 27 y carece de capacidad de unión a las VLPs.⁵⁸ La falta de unión de C27A, implica que tampoco podría inhibir la infección, por lo que resulta un excelente control para demostrar que la inhibición de la infección es causada por la unión específica de Sc5c3 con la cápside viral. Para mostrar esto, los PsVs se pre-incubaron con Sc5c3, C27A o heparina y luego se infectaron células 293TT. La cuantificación citométrica mostró que el aptámero disminuyó la infección a los niveles antes observados (aproximadamente 50%); mientras que la mutante C27A no tuvo efecto significativo en los niveles de infección. La heparina mostró los niveles de inhibición previamente observados (aproximadamente 70%) (Figura 21).

Estos resultados en conjunto, demostraron la capacidad inhibitoria de los aptámeros Sc5c3 y Sc5c3 Δ 18 y sugieren que tienen potencial para ser aplicados *in vivo* en el control de la transmisión del VPH.

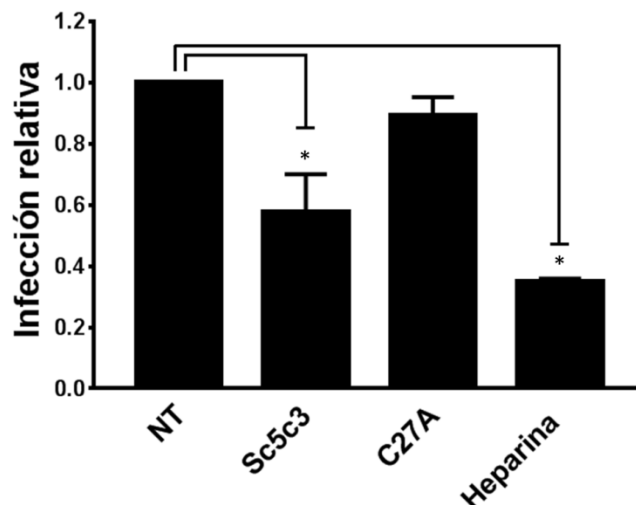


Figura 21. Efecto inhibitorio de la mutante C27A. Cuantificación por citometría de flujo de las células infectadas con PsVs pre-incubados con Sc5c3, la mutante C27A o heparina. Los resultados se presentan relativos al control no tratado (NT) y representan el promedio y la desviación estándar de dos ensayos independientes. *Disminución significativa de la infección respecto al control no tratado (NT) (Prueba de Dunnett, $n=2$, $\alpha=0.01$)

7.5 Efecto dosis-respuesta de los aptámeros.

Para evaluar el efecto dosis-respuesta de los aptámeros, los PsVs fueron pre-incubados con 5, 10, 20 o 30 μM de Sc5c3, Sc5c3 Δ 18 o heparina antes de infectar un cultivo celular. Las células 293TT fueron observadas por microscopía electrónica 72 horas después de la infección y cuantificadas mediante citometría de flujo (Figura 22).

El tratamiento con Sc5c3 alcanzó saturación a 10 μM (60% de inhibición), comparable al efecto generado por la heparina; sin embargo, aunque a altas concentraciones Sc5c3 y Sc5c3 Δ 18 tienen un efecto muy similar, a bajas concentraciones la inhibición causada por Sc5c3 Δ 18 es menor, sugiriendo que aunque la región 3'UR del aptámero no es indispensable para la unión, podría estar desempeñando un papel importante en la estabilidad del complejo.

de infección de PsVs en células 293TT ha sido ampliamente usado para el estudio de la biología del VPH; sin embargo, con la intención de usar un modelo celular más cercano al natural, decidimos infectar la línea celular HaCaT (queratinocitos de piel de adulto inmortalizados espontáneamente) y probar la inhibición de la infección por los aptámeros.

Para ello, un cultivo de células HaCaT fue inoculado con PsVs de VPH16; sin embargo, 72 horas después de la infección, no se observó fluorescencia (Figura 23), a diferencia de la línea celular 293TT que fue usado como control positivo y presentó la fluorescencia habitual.

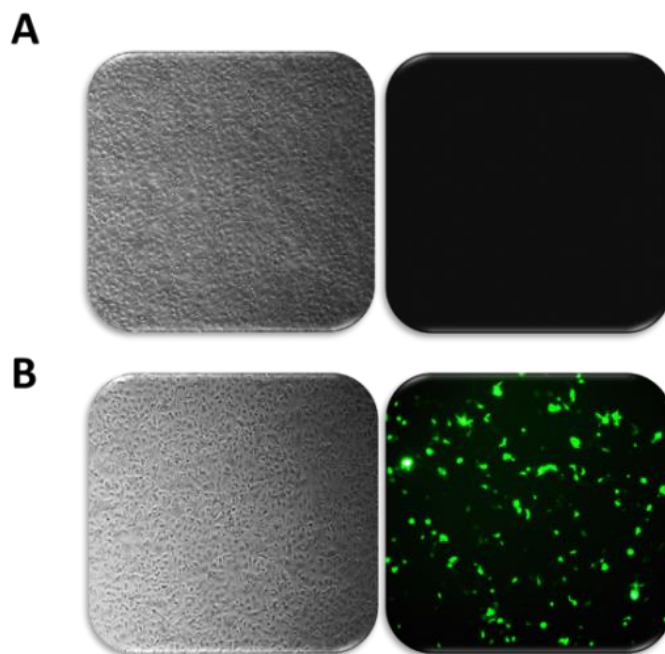


Figura 23. Infección de células HaCaT. A) Microscopía de células HaCaT infectadas con PsVs de VPH16. A la derecha la microscopía de campo claro y a la izquierda la microscopía de fluorescencia. B) Microscopía de células 293TT infectadas con PsVs de VPH16. A la derecha la microscopía de campo claro y a la izquierda la microscopía de fluorescencia.

El plásmido reportero pSVLYFP tiene un origen de replicación de SV40 y las células 293TT están modificadas para sobreexpresar el antígeno T grande

de SV40, de tal forma que el plásmido reportero se replica y esto intensifica la señal, un evento que no sucede en otras líneas celulares. Por otra parte, se determinó que la capacidad infectiva de nuestro stock de PsVs era al menos diez veces menor que lo reportado en la bibliografía.⁸¹

En un esfuerzo por obtener stock virales más concentrados e infectivos, y de esta forma incrementar la posibilidad de infectar HaCaT, se adquirió la construcción p16sheLL, a partir de la cual se expresan las proteínas L1 y L2 de VPH16. Al tener ambas proteínas en la misma construcción, la probabilidad de producir cápside infectivas era mayor (cápside formadas por L1, L2 y el plásmido reportero).

Se produjo un lote de PsVs usando los plásmidos p16sheLL y pSVLYFP y se caracterizó mediante inmunotransferencia y microscopía electrónica de transmisión. La inmunotransferencia mostró la banda correspondiente a L1 e interesantemente, la banda de L2 se pudo observar claramente, sugiriendo que, dado el mayor contenido de L2, estos PsVs podrían ser más infectivos (Figura 24A). Adicionalmente, la microscopía mostró un mayor número de PsVs por campo en comparación con el lote de PsVs producido anteriormente (Figura 24B).

La cuantificación de la capacidad infectiva mostró que los PsVs producidos usando p16sheLL, fueron hasta 10 veces más infectivos (15 000 UI/ μ L) que los PsVs producidos usando p16L1h y p16L2h (1500 UI/ μ L) (Figura 25).

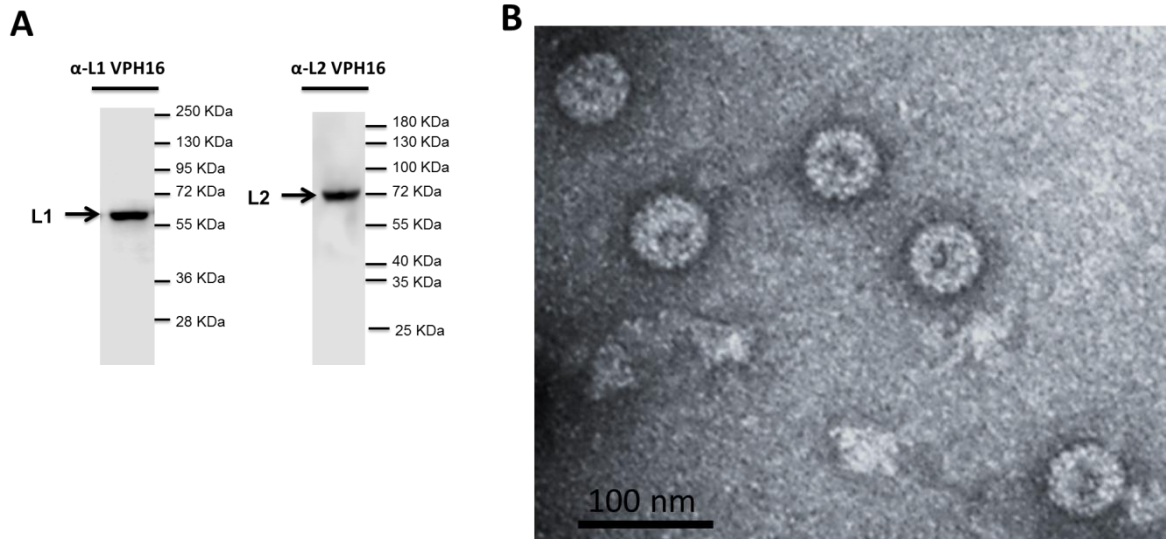


Figura 24. Caracterización de PsVs de VPH16 producidos con el plásmido p16sheLL. A) Inmunotransferencia de las proteínas L1 y L2 contenidas en los PsVs (flechas negras) B) Microscopía electrónica de transmisión de PsVs de VPH16 producidos con el plásmido p16sheLL. La escala se indica con una barra negra.

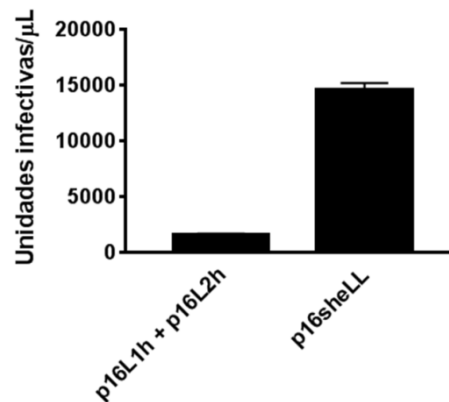


Figura 25. Cuantificación de la infectividad de PsVs de VPH16. Infectividad de PsVs de VPH16 producidos usando dos diferentes métodos: La co-transfección de los plásmidos p16L1h y p16L2h o la transfección del plásmido p16sheLL.

Con este nuevo lote de PsVs, se infectó nuevamente la línea celular HaCaT y una batería de otros queratinocitos de diferentes orígenes; sin embargo,

tampoco fue posible observar fluorescencia en ninguna de las líneas celulares empleadas (Figura 26).

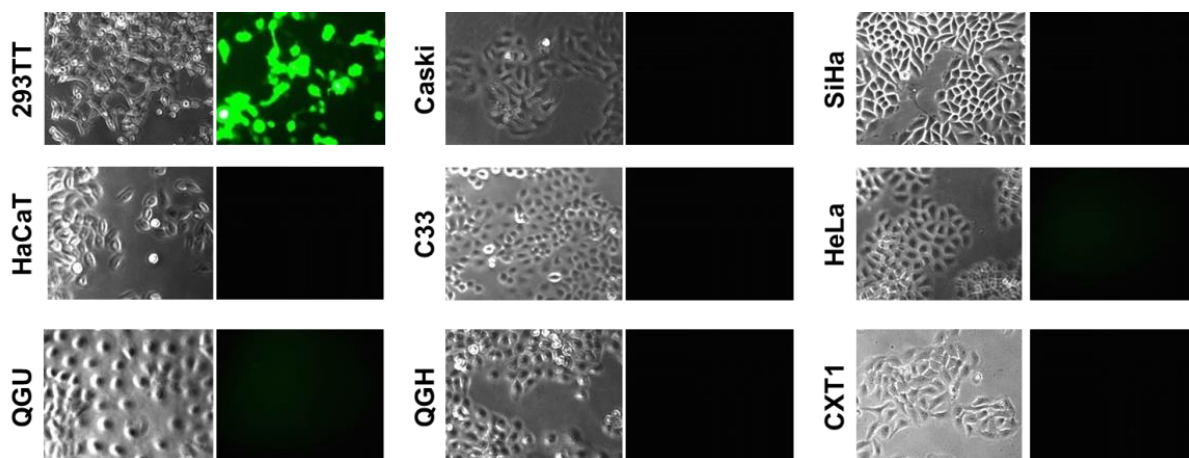


Figura 26. Infección de una batería de líneas celulares usando PsVs de VPH16. A la izquierda, la microscopía de campo claro de cada línea celular; a la derecha, la microscopía de fluorescencia.

Desconocemos la causa de este resultado; sin embargo, podría estar implicado el contenido natural de HS en cada línea celular y las modificaciones que el HS podría haber tenido a lo largo de los pasajes para mantener el cultivo.

7.7 Inhibición de la infección usando una versión modificada de Sc5c3.

Químicamente el RNA es menos estable que el DNA debido al grupo reactivo 2'-hidroxilo presente de la ribosa. Un enfoque sencillo para mejorar la estabilidad de los aptámeros de RNA es la transformación de los ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos para generar un aptámero de DNA. Previamente, nuestro equipo caracterizó la unión de una versión de

RESULTADOS

DNA del aptámero Sc5c3; sin embargo, ésta perdió completamente la afinidad por las VLPs. Por otra parte, se generó un aptámero quimérico DNA-RNA, en el que las posiciones involucradas en la especificidad del aptámero se mantuvieron como ribonucleótidos mientras que las demás se cambiaron por desoxirribonucleótidos (Figura 27). Interesantemente, la quimera DNA-RNA conservó aproximadamente el 80% de unión respecto al aptámero Sc5c3.⁵⁸



Figura 27. Posiciones modificadas en el aptámero quimérico. Las bases marcadas con un recuadro son importantes para la especificidad del aptámero y se mantuvieron como ribonucleótidos en la versión quimérica DNA-RNA del aptámero Sc5c3; las demás se cambiaron por desoxirribonucleótidos.

Considerando estos resultados, decidimos probar si la quimera DNA-RNA también conservaba la capacidad inhibitoria de Sc5c3. Los PsVs se incubaron con 20 μ M de Sc5c3, la versión quimérica, la mutante C27A como control negativo o heparina como control positivo. Luego, los PsVs tratados se usaron para infectar células 293TT. Después de 72 horas, las células infectadas se cuantificaron por citometría de flujo. Los resultados mostraron que el aptámero quimérico inhibió la infección de PsVs de VPH16 en niveles similares a la versión de RNA (aproximadamente 50% de inhibición) (Figura 28). Como se esperaba, la mutante C27A no tuvo efecto

significativo y la heparina alcanzó niveles de inhibición de aproximadamente 70%.

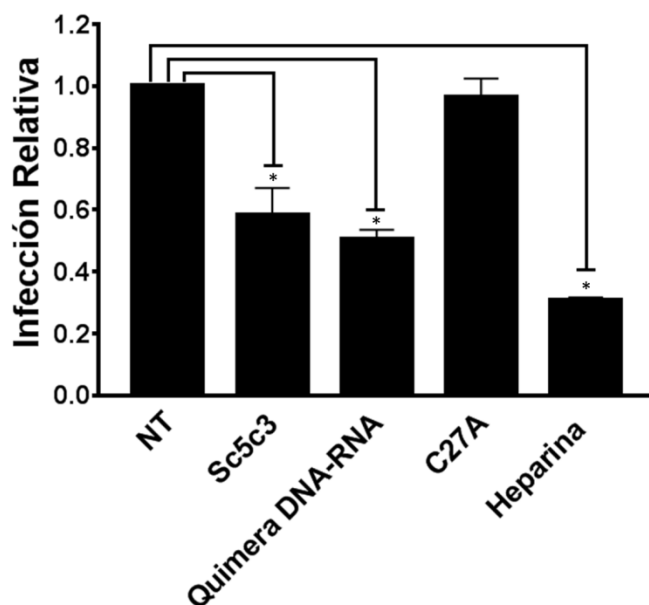


Figura 28. Inhibición de la infección de PsVs de VPH16 usando un aptámero quimérico DNA-RNA. Los PsVs de VPH16 se incubaron con 20 μ M de Sc5c3, una versión quimérica DNA-RNA de Sc5c3, la mutante C27A o heparina y luego se infectaron células 293TT. Los resultados se muestran de forma relativa al control no tratado (NT) y representan el promedio y la desviación estándar de tres ensayos independientes. *Disminución significativa de la infección respecto al control no tratado (NT) (Prueba de Dunnett, n=3, α =0.01).

Este resultado demostró que la quimera DNA-RNA mantiene la capacidad inhibitoria. Además, a pesar de que la quimera presentó menos unión a las VLPs que Sc5c3,⁵⁸ la capacidad inhibitoria es la misma, sugiriendo que la inclusión de desoxirribonucleótidos en el aptámero incrementó su estabilidad en el medio de cultivo, permitiendo observar la misma capacidad de inhibición que el aptámero original.

7.8 Mecanismo de inhibición de la infección.

Para explicar las bases moleculares de la inhibición de la infección, postulamos que el aptámero se unía a los sitios de unión para HS localizados en la cápside viral y de esta forma evitaba la interacción de la cápside con el HS de la superficie celular. Para probar esta hipótesis, se usaron VLPs formadas por moléculas de L1 mutantes, que previamente habían sido estudiadas.²⁷ Las mutaciones están localizadas en uno o varios de los aminoácidos involucrados en el reconocimiento del HS y se detallan en el cuadro 3.

Cuadro 3. VLPs mutantes

Nombre de la mutante	Mutaciones*
M2	K361A
M3	K356A
M4	K278A
M6	K278A, K361A
M12	K54A, K278A, K356A, K361A
M15	K452A
M24	N57A, K59A, K278A, K361A, N450A, K452A
M25	K54A, N57A, K59A, K278A, K361A, K442A, K443A

*Uno o varios residuos de lisina (K) o asparagina (N) de los sitios de unión para HS se sustituyeron por alanina (A). Los números indican la posición del aminoácido en la secuencia de L1 de VPH16.

La correcta producción de las VLPs se verificó mediante inmunotransferencia de la proteína L1, donde se observó una banda correspondiente a L1 (55 KDa) en las preparaciones de L1 silvestre y las mutantes M2, M3, M4, M6 y M24 y una banda de menor peso en las

preparaciones de las mutantes M12, M15, M25. La banda de 45 KDa ha sido observada comúnmente en las preparaciones de VLPs de L1 silvestre y parece no afectar la unión del aptámero (Figura 29).

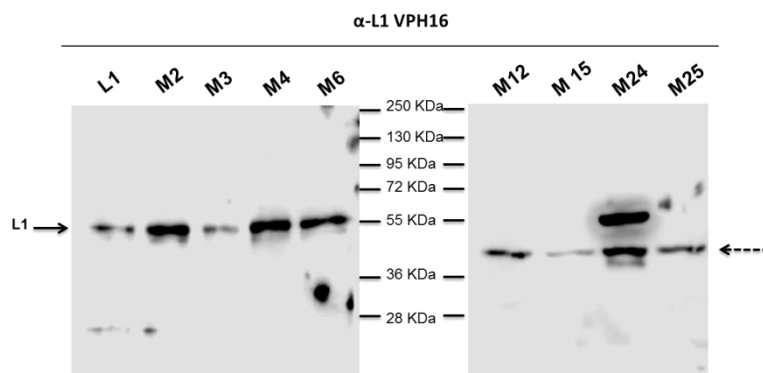


Figura 29. Inmunotransferencia de las VLPs mutantes. Se prepararon VLPs con mutaciones en sitios importantes para la unión del HS y su producción se verificó mediante inmunotransferencia. Se marca con una flecha sólida la banda de 55 KDa correspondiente a L1 y con una flecha punteada una banda de 45 KDa comúnmente observada en otras preparaciones de L1 silvestre.

Una vez verificadas, las VLPs se incubaron con Sc5c3 o Sc5c3 Δ 18 marcado radiactivamente para evaluar la unión de los aptámeros con cada mutante. Se esperaba que al mutar los sitios de unión para HS, el aptámero no pudiera unirse, mostrando así que Sc5c3 y HS tenían el mismo sitio de unión; sin embargo, el ensayo de unión no mostró diferencias significativas entre la unión de Sc5c3 a las VLPs silvestre (L1) y las mutantes M2, M3, M4, M6, M12, M15 y M24 (Figura 30). Hubo un pequeño pero estadísticamente significativo decremento en la unión con la mutante M25. La mutante M25 tiene siete mutaciones en la secuencia de L1, lo que de forma global representa una pérdida importante de la carga positiva de la VLP. De antemano, sabemos que existe un porcentaje de aptámero que se une a las VLPs de forma inespecífica,⁷³ probablemente a través atracciones electrostáticas generadas por la carga positiva de la VLP y los grupos

fosfato del RNA. Así, consideramos que la pequeña disminución de la unión observada en las mutante 25, posiblemente se debe a la pérdida de carga positiva en la superficie de la VLP, lo que abate en cierta medida las interacciones inespecíficas y no lo consideramos un evento con relevancia biológica.

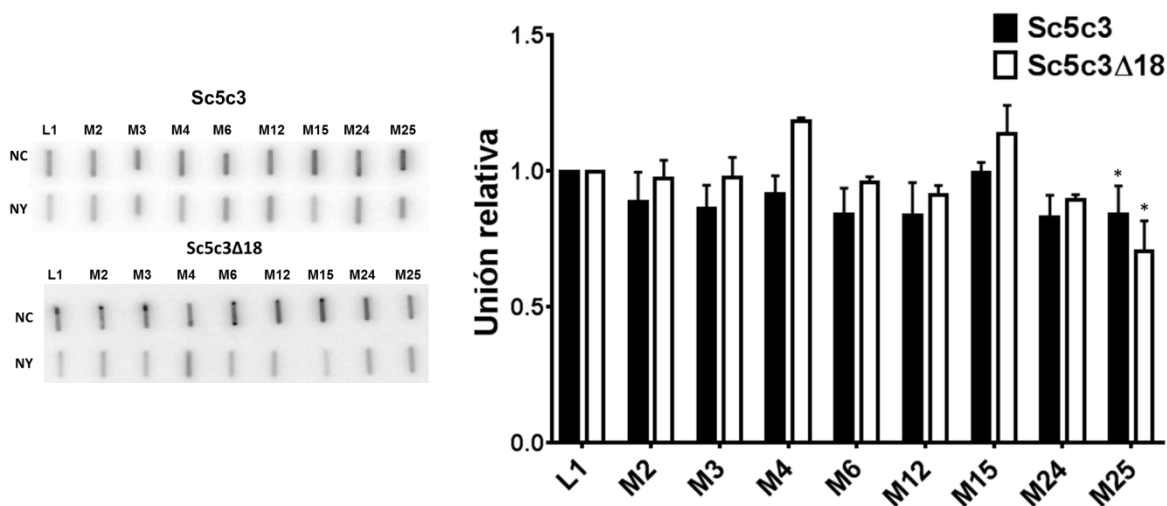


Figura 30. Unión de los aptámeros Sc5c3 y Sc5c3Δ18 con VLPs mutantes. Las VLPs silvestre (L1) y mutantes (M2, M3, M4, M6, M12, M15, M24 y M25), se incubaron con los aptámeros Sc5c3 y Sc5c3Δ18 y se determinó la fracción de aptámero unida a cada tipo de VLP. A la izquierda: membranas de nitrocelulosa (NC) y nylon (NY) del ensayo de unión. A la derecha la representación gráfica de la unión de cada aptámero con las VLPs. Los resultados se muestran relativos a la unión con las VLPs silvestres y representan el promedio y la desviación estándar de tres ensayos independientes. *Disminución significativa de la unión de los aptámeros respecto a la unión a VLPs silvestres (Prueba de Dunnett, n=3, $\alpha=0.05$).

Estos resultados sugieren que el sitio de unión para HS no está involucrado en la unión del aptámero; o bien, que las interacciones electrostáticas no median la interacción Sc5c3-VLPs.

8

DISCUSIÓN

Aunque las vacunas contra la infección por VPH se comercializan desde hace diez años, el cáncer cervical es todavía el segundo tipo de cáncer más común en mujeres que viven en países en vías de desarrollo.⁸² El elevado precio de la vacuna, una deficiente infraestructura en los sistemas de salud y barreras sociales y culturales podrían ser algunas de las razones para esta aparente falta de efectividad.⁵⁴ Estos hechos remarcan la necesidad de estrategias eficientes para el control de la transmisión y la detección temprana y el desarrollo de herramientas que complementen la vacunación.

En este trabajo reportamos el uso del aptámero de RNA Sc5c3 para inhibir la infección de PsVs de VPH16 en células 293TT. La inhibición lograda usando el aptámero fue similar a la generada por otros aptámeros de RNA no modificados que se emplearon para bloquear la unión del virus con el receptor celular; por ejemplo, el aptámero P30-10-16 y el aptámero A20 dirigidos contra hemaglutinina del virus de la influenza A y B, respectivamente.^{83,84} De forma similar a nuestro trabajo, en estas investigaciones se requirieron concentraciones micromolares del aptámero para conseguir inhibiciones de entre 53 y 93%.

Por otra parte, nuestros resultados mostraron que la inhibición causada por Sc5c3 fue comparable a la inhibición inducida por la heparina, una molécula estructuralmente similar al HS y reconocida como un eficiente inhibidor de la infección de VPH.⁸⁰ El uso de la heparina como agente antiviral se encuentra limitado por su actividad anticoagulante y las múltiples interacciones con proteínas celulares involucradas en migración, adhesión, angiogénesis, proliferación, etc, que podrían resultar en efectos tóxicos.⁸⁵ Al parecer, el aptámero supera estas desventajas, ya que mostró una elevada especificidad en una mezcla compleja de proteínas provenientes de un lavado cervical murino.⁶⁸

La principal desventaja del aptámero reside en su susceptibilidad a la degradación por nucleasas. Estudios previos mostraron que los aptámeros de DNA son más estables que los de RNA en biofluidos complejos como FBS y suero humano, resultando en inhibiciones de infecciones virales de alrededor de 90% usando concentraciones nanomolares.⁸⁶⁻⁸⁹ La conversión directa de un aptámero de RNA en uno de DNA para incrementar la estabilidad del aptámero es una estrategia previamente usada. La versión de DNA de un aptámero de RNA contra dopamina, no sólo conservó la especificidad por el blanco, sino que incluso mejoró la afinidad.⁹⁰ La versión de DNA de un aptámero contra la proteína CD4 también retuvo la capacidad de unión y se pudo observar hasta por dos horas en suero humano, una remarcable mejora sobre la versión de RNA.⁹¹ A pesar de estos antecedentes, nuestro equipo de investigación mostró que la versión de DNA del aptámero Sc5c3 perdió completamente la capacidad de unión a las VLPs.⁵⁸ Hasta el momento no hay suficiente conocimiento para determinar si una versión de DNA preservará las propiedades del aptámero de RNA, por lo que este enfoque representa básicamente un ensayo de prueba y error.

Por otra parte, la versión quimérica DNA-RNA conservó la mayor parte de la capacidad de unión de Sc5c3, sugiriendo que algunos de los grupos 2'-OH del RNA están involucrados en la unión a las VLPs. Aunque la quimera no produjo mayor inhibición de la infección que Sc5c3, su estabilidad en biofluidos debió ser mejorada por la inclusión de desoxirribonucleótidos; sin embargo, se requieren estudios adicionales para demostrar que la quimera realmente es más resistente que Sc5c3.

Si bien las modificaciones químicas al RNA también podrían mejorar la estabilidad de Sc5c3, éstas podrían afectar la afinidad y la especificidad del aptámero; por lo que se requiere un enfoque empírico en el que cada posición en el aptámero sea modificada y caracterizada hasta encontrar un equilibrio entre la pérdida de afinidad o especificidad y el incremento de la resistencia a la degradación.

Por otra parte, la cristalización de complejos proteína-aptámero ha mostrado que comúnmente los aptámeros interaccionan con el mismo sitio de unión que los ligandos nativos;⁹²⁻⁹⁴ por lo tanto, era posible que Sc5c3 se uniera a los sitios de unión para HS en la superficie de las VLPs y los PsVs; sin embargo, la unión eficiente de Sc5c3 con las VLPs mutantes, sugirió que la inhibición de la infección podría no ser totalmente dependiente del sitio de unión para HS. Análisis previos han determinado que la unión de un aptámero con su blanco conduce a cambios conformacionales tanto en el aptámero como en el blanco. Este reconocimiento adaptativo puede incluso inducir cambios en la estructura secundaria de un péptido.⁹⁵ Por lo tanto, nosotros hipotetizamos que la unión del Sc5c3 a los PsVs conduce a cambios conformacionales que impiden la unión de los PsVs al receptor celular primario (HS) en la superficie celular, o bien, impiden los cambios conformacionales necesarios para la internalización y desnudamiento del endosoma (Figura 31). Es necesaria una completa caracterización

estructural de Sc5c3 y experimentos adicionales de unión para poder esclarecer el mecanismo de inhibición del aptámero.

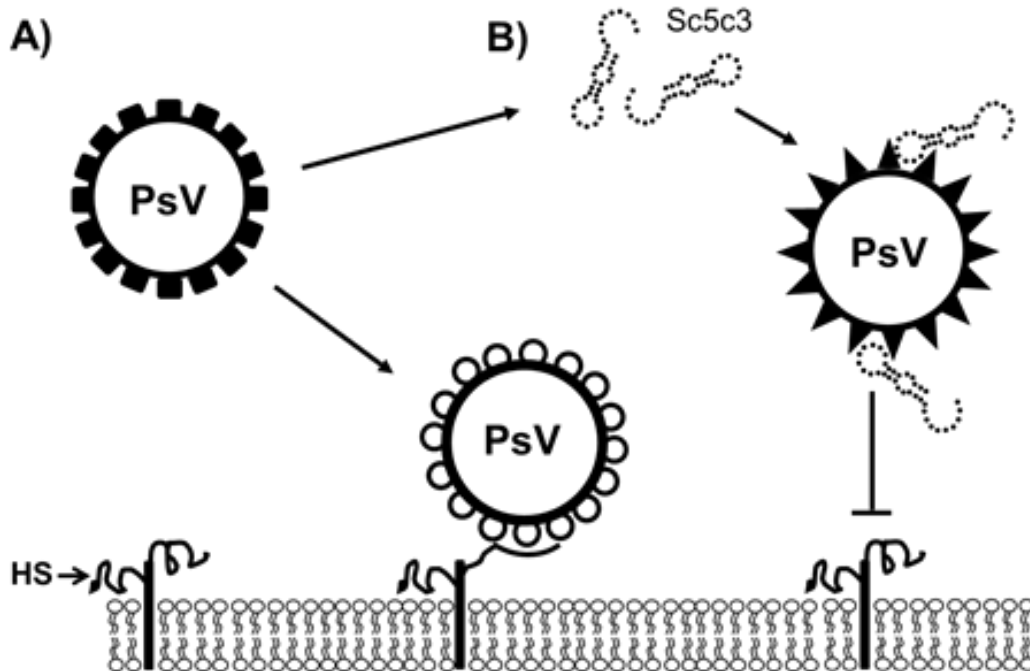


Figura 31. Modelo de inhibición de la infección de PsVs de VPH16 por Sc5c3. A) Los PsVs se unen a heparán sulfato (HS) en la superficie celular y se inducen cambios conformacionales necesarios para la internalización. B) La unión de Sc5c3 a los PsVs podría generar cambios conformacionales en la cápside viral que evitarían la unión a HS o impedir cambios conformacionales indispensables para la internalización.

Como perspectiva, el aptámero Sc5c3 podría ser incluido en un nuevo producto de aplicación tópica como se sugirió para la carragenina (un polisacárido estructuralmente similar al HS y un potente inhibidor de la infección de VPH) y para el polímero AGMA1.⁹⁶⁻⁹⁸ A diferencia de Sc5c3, la carragenina probablemente se une al sitio de unión para HS en el virus; mientras que AGMA1 interacciona directamente con el HS. Así, la incorporación de las tres moléculas en un único tratamiento podría inhibir

la entrada viral en diferentes formas, resultando en una herramienta más efectiva.

Además, la carragenina y AGMA1 se han propuesto como agentes antivirales para un amplio rango de tipos de VPH. Debido a que L1 está altamente conservada entre los diferentes tipos de VPH,^{8,9} no descartamos la posibilidad de que Sc5c3 reconozca otros tipos de VPH y también pueda ejercer un efecto inhibitorio.

En conclusión, esta es la primera vez que se reporta la inhibición de VPH usando un aptámero de RNA. Aunque se requiere una caracterización profunda de la función de Sc5c3 en un sistema *in vivo*, nosotros proponemos que Sc5c3 podría ser usado como una nueva alternativa para prevenir la infección por VPH16.

9

CONCLUSIONES

- Los aptámeros Sc5c3 y Sc5c3 Δ 18 inhiben significativamente la infección de PsVs de VPH16 en células 293TT.
- La inhibición de la infección generada por Sc5c3 es superior a la de Sc5c3 Δ 18
- El mecanismo de inhibición de los aptámeros es independiente del sitio de unión para heparán sulfato.

10

PERSPECTIVAS

- Investigar el efecto del aptámero en infecciones de otros tipos de VPH
- Verificar la especificidad y estabilidad del aptámero en muestras biológicas.
- Modificar el aptámero para darle mayor estabilidad en biofluidos.
- Verificar la inhibición de la infección usando un modelo murino.
- Incorporar el aptámero en un producto de uso accesible.

11

REFERENCIAS

1. Stanley, M. A., Pett, M. R. & Coleman, N. HPV: from infection to cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1456–60 (2007).
2. CDC. Human papilloma virus. (2016). Available at: <https://www.cdc.gov/hpv/parents/whatishpv.html>.
3. Walboomers, J. M. *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189, 12–19 (1999).
4. Zheng, Z.-M. & Baker, C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front. Biosci.* 11, 2286–2302 (2006).
5. Graham, S. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiol.* 5, 1493–1506 (2010).
6. Muñoz, N., Castellsagué, X., de González Berrington, A. & Gissmann, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24 Suppl 3, S3/1-10 (2006).
7. Doorbar, J. & Gallimore, P. H. Identification of Proteins Encoded by the L1 and L2 Open Reading Frames of Human Papillomavirus 1a. 61, 2793–2799 (1987).
8. De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. & Zur Hausen, H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17–27 (2004).
9. Hofmann, K. J. *et al.* Sequence consevation within within the major capsid protein of human papillomavirus (HPV) type 18 and formation of HPV-18 virus like particles in *_Saccharomyces cerevisiae_*. *J. Virol.* 77, 465–468 (1996).

REFERENCIAS

10. Chen, X. S. *et al.* Structure of Small Virus-like Particles Assembled from the L1 Protein of Human Papillomavirus 16. *Mol. Cell* 5, 557–567 (2000).
11. Chen, X. S., Garcea, R. L., Goldberg, I., Casini, G. & Harrison, S. C. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol. Cell* 5, 557–67 (2000).
12. Buck, C., Day, P. & Trus, B. The papiloma Major Capsid Protein L1. *Virology* 23, 1–7 (2008).
13. Buck, C. B. *et al.* Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J. Virol.* 82, 5190–7 (2008).
14. Buck, C. B., Day, P. M. & Trus, B. L. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* 445, 169–74 (2013).
15. Bishop, B. *et al.* Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 282, 31803–31811 (2007).
16. Sapp, M., Volpers, C., Müller, M. & Streeck, R. E. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 9), 2407–12 (1995).
17. Wolf, M., Garcea, R., Grigorieff, N. & Harrison, S. Subunit interactions in bovine papillomavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6298–303 (2010).
18. Li, M., Beard, P., Estes, P., Lyon, M. & Garcea, R. Intercapsomeric Disulfide Bonds in Papillomavirus Assembly and Disassembly. *J. Virol.* 72, 2160–2167 (1998).
19. Sapp, M., Fligge, C., Petzak, I. & Harris, J. R. Papillomavirus Assembly Requires Trimerization of the Major Capsid Protein by Disulfides between Two Highly Conserved Cysteines. *J. Virol.* 72, 6186–6189 (1998).
20. Modis, Y., Trus, B. & Harrison, S. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* 21, 4754–62 (2002).
21. Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. & Sapp, M. Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *J. Virol.* 75, 1565–1570 (2001).
22. Johnson, K. *et al.* Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J. Virol.* 83, 2067–74 (2009).

23. Joyce, J. G. *et al.* The L1 Major Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 11 Recombinant Virus-like Particles Interacts with Heparin and Cell-surface Glycosaminoglycans on Human Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 5810–5822 (1999).
24. Dreyfuss, J. L. *et al.* Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *An. Acad. Bras. Cienc.* 81, 409–429 (2009).
25. Shriver, Z. & Street, W. K. Heparin - A Century of Progress. *Handb Exp Pharmacol* 207, 159–176 (2012).
26. Balagurunathan, K. Neuroscience program. Available at: <http://neuroscience.med.utah.edu/faculty/balagurunathan.php>.
27. Dasgupta, J. *et al.* Structural basis of oligosaccharide receptor recognition by human papillomavirus. *J. Biol. Chem.* 286, 2617–24 (2011).
28. Knappe, M. *et al.* Surface-exposed amino acid residues of HPV16 L1 protein mediating interaction with cell surface heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 282, 27913–27922 (2007).
29. Conway, M. J. & Meyers, C. Replication and assembly of human papillomaviruses. *J. Dent. Res.* 88, 307–17 (2009).
30. Selinka, H.-C., Giroglou, T., Nowak, T., Christensen, N. D. & Sapp, M. Further Evidence that Papillomavirus Capsids Exist in Two Distinct Conformations. *J. Virol.* 77, 12961–12967 (2003).
31. Richards, R. M., Lowy, D. R., Schiller, J. T. & Day, P. M. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1522–7 (2006).
32. Day, P. M., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. Heparan Sulfate-Independent Cell Binding and Infection with Furin-Precleaved Papillomavirus Capsids. *J. Virol.* 82, 12565–12568 (2008).
33. Yoon, C.-S., Kim, K.-D., Park, S.-N. & Cheong, S.-W. $\alpha 6$ Integrin Is the Main Receptor of Human Papillomavirus Type 16 VLP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 668–673 (2001).
34. Abban, C. & Meneses, P. Usage of heparan sulfate integrins and FAK in HPV16 infection. *Virology* 6, 2166–2171 (2010).
35. Spoden, G. *et al.* Human Papillomavirus Types 16, 18, and 31 Share Similar Endocytic Requirements for Entry. *J. Virol.* 87, 7765–7773 (2013).

36. Bousarghin, L., Touze, A., Sizaret, P.-Y. & Coursaget, P. Human Papillomavirus Types 16, 31, and 58 Use Different Endocytosis Pathways To Enter Cells. *J. Virol.* 77, 3846–3850 (2003).
37. Fay, A., Iv, W. H. Y., Roden, R. B. S. & Moroianu, J. The Positively Charged Termini of L2 Minor Capsid Protein Required for Bovine Papillomavirus Infection Function Separately in Nuclear Import and DNA Binding The Positively Charged Termini of L2 Minor Capsid Protein Required for Bovine Papillomavirus Infec. *J. Virol.* 78, 13447–13454 (2004).
38. Bordeaux, J. *et al.* The L2 Minor Capsid Protein of Low-Risk Human Papillomavirus Type 11 Interacts with Host Nuclear Import Receptors and Viral DNA. *J. Virol.* 80, 8259–8262 (2006).
39. Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A. & Sakai, H. Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front. Microbiol.* 3, 1–12 (2012).
40. Horvath, C. a J., Boulet, G. a V, Renoux, V. M., Delvenne, P. O. & Bogers, J.-P. J. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology* 7, 11 (2010).
41. Zhou, J., Sun, X., Stenzel, D. & Frazer, I. Expression of Vaccinia Recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF Proteins in Epithelial Cells Is Sufficient for Assembly of HPV Virion-like Particles. *Virology* 185, 251–257 (1991).
42. Kirnbauer, R., Booyt, F., Chengt, N., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 12180–12184 (1992).
43. Hagensee, M., Yaegashi, N. & Galloway, De. Self-Assembly of Human Papillomavirus Type 1 Capsids by of the L1 and L2 Capsid Proteins. *Virology* 67, 315–322 (1993).
44. Zhou, J., Stenzel, D. J., Sun, X. & Frazer, I. Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro. *Gen. Virol.* 74, 763–768 (1993).
45. Buck, C. B., Pastrana, D. V., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. Efficient Intracellular Assembly of Papillomaviral Vectors. *J. Virol.* 78, 751–757 (2004).
46. Buck, C. B., Thompson, C. D., Pang, Y.-Y. S., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. Maturation of Papillomavirus Capsids. *J. Virol.* 79, 2839–2846 (2005).

-
47. Pastrana, D. V. *et al.* Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology* 321, 205–216 (2004).
 48. Richards, K. F., Bienkowska-Haba, M., Dasgupta, J., Chen, X. S. & Sapp, M. Multiple Heparan Sulfate Binding Site Engagements Are Required for the Infectious Entry of Human Papillomavirus Type 16. *J. Virol.* 87, 11426–11437 (2013).
 49. Cerqueira, C. *et al.* Efficient Production of Papillomavirus Gene Delivery Vectors in Defined In Vitro Reactions. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 5, 165–179 (2017).
 50. NIH. National Cancer Institute. Human Papillomavirus (HPV) Vaccines. (2016). Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents/hpv-vaccine-fact-sheet>.
 51. Bonanni, P. *et al.* Human papilloma virus vaccination: impact and recommendations across the world. *Ther. Adv. Vaccines* 3, 3–12 (2015).
 52. Lee, L.-Y. & Garland, S. M. Human papillomavirus vaccination: the population impact. *F1000Research* 6, 866 (2017).
 53. Mukhopadhyay, P. & Paul, B. Introducing HPV vaccine in developing countries - addressing the challenge. *Indian J. Community Med.* 34, 370 (2009).
 54. Wigle, J., Coast, E. & Watson-Jones, D. Human papillomavirus (HPV) vaccine implementation in low and middle-income countries (LMICs): Health system experiences and prospects. *Vaccine* 31, 3811–3817 (2013).
 55. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818–822 (1990).
 56. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* (80-.). 249, 505–510 (1990).
 57. Famulok, M., Mayer, G. & Blind, M. Nucleic acid aptamers—from selection in vitro to applications in vivo. *Acc. Chem. Res.* 33, 591–9 (2000).
 58. Palomino-Vizcaino, G. Desarrollo de un método de detección para el virus del papiloma humano tipo 16. (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de IPN, 2018).

-
59. Tombelli, S., Minunni, M. & Mascini, M. Analytical applications of aptamers. *Biosens. Bioelectron.* 20, 2424–34 (2005).
 60. Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng.* 24, 381–403 (2007).
 61. Song, K.-M., Lee, S. & Ban, C. Aptamers and their biological applications. *Sensors (Basel)*. 12, 612–31 (2012).
 62. Mairal, T. *et al.* Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 989–1007 (2008).
 63. Ding, C., Wei, S. & Liu, H. Electrochemiluminescent determination of cancer cells based on aptamers, nanoparticles, and magnetic beads. *Chemistry* 18, 7263–8 (2012).
 64. Hicke, B. J. *et al.* Tumor targeting by an aptamer. *J. Nucl. Med.* 47, 668–78 (2006).
 65. Ruckman, J. *et al.* 2 -Fluoropyrimidine RNA-based Aptamers to the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF 165). *J. Biol. Chem.* 273, 20556–20567 (1998).
 66. Pestourie, C., Tavitian, B. & Duconge, F. Aptamers against extracellular targets for in vivo applications. *Biochimie* 87, 921–30 (2005).
 67. Ni, S. *et al.* Chemical modifications of nucleic acid aptamers for therapeutic purposes. *Int. J. Mol. Sci.* 18, (2017).
 68. Leija-Montoya, A. G., Benítez-Hess, M. L., Toscano-Garibay, J. D. & Alvarez-Salas, L. M. Characterization of an RNA Aptamer Against HPV-16 L1 Virus-Like Particles. *Nucleic Acid Ther.* 0, 1–12 (2014).
 69. Shum, K.-T., Zhou, J. & Rossi, J. Aptamer-based therapeutics: new approaches to combat human viral diseases. *Pharmaceuticals* 6, 1507–1542 (2013).
 70. Wang, J., Jiang, H. & Liu, F. In vitro selection of novel RNA ligands that bind human cytomegalovirus and block viral infection. *RNA* 6, 571–83 (2000).
 71. Choi, S. K. *et al.* DNA aptamers against the receptor binding region of hemagglutinin prevent avian influenza viral infection. *Mol. Cells* 32, 527–33 (2011).
 72. Yang, D. *et al.* Inhibition of hepatitis C virus infection by DNA aptamer against envelope protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4937–44

- (2013).
73. Leija-Montoya, A. G. Caracterización de aptámeros de ARN contra VLPs de VPH-16. (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, 2010).
 74. Buck, C. B. & Thompson, C. D. Production of papillomavirus-based gene transfer vectors. *Curr. Protoc. cell Biol.* 37, 26.1.1-26.1.9 (2007).
 75. Kirnbauer, R. *et al.* Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J. Virol.* 67, 6929–36 (1993).
 76. Wong, I. & Lohman, T. M. A double-filter method for nitrocellulose-filter binding: application to protein-nucleic acid interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5428–32 (1993).
 77. Wang, J. W. & Roden, R. B. S. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology* 445, 175–186 (2013).
 78. Baker, T. *et al.* Structures of bovine and human papillomaviruses Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophysical* 60, 1445–1456 (1991).
 79. Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. & Sapp, M. Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *J. Virol.* 75, 1565–1570 (2001).
 80. Joyce, J. G. *et al.* The L1 Major Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 11 Recombinant Virus-like Particles Interacts with Heparin and Cell-surface Glycosaminoglycans on The L1 Major Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 11 Recomb. *J. Biol. Chem.* 274, 5810–5822 (1999).
 81. Buck, C. B. & Thompson, C. D. in *Current protocols in cell biology* Chapter 26, 26.1.1-26.1.17 (2007).
 82. WHO. Human papilloma virus (HPV) and cervical cancer. (2016). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>.
 83. Gopinath, S. C. B., Sakamaki, Y., Kawasaki, K. & Kumar, P. K. R. An efficient RNA aptamer against human influenza B virus hemagglutinin. *J. Biochem.* 139, 837–846 (2006).
 84. Gopinath, S. C. B. *et al.* An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion. *J. Gen. Virol.* 87, 479–487 (2006).
 85. Lever, R. & Page, C. P. Novel Drug Development Opportunities for

- Heparin. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 140–148 (2002).
86. Sung, H. J., Kayhan, B., Ben-Yedidia, T. & Arnon, R. A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* 279, 48410–48419 (2004).
 87. Cheng, C. *et al.* Potent inhibition of human influenza H5N1 virus by oligonucleotides derived by SELEX. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 670–674 (2008).
 88. Moore, M. D. *et al.* Generation of neutralizing aptamers against herpes simplex virus type 2: Potential components of multivalent microbicides. *J. Gen. Virol.* 92, 1493–1499 (2011).
 89. Liang, H.-R. *et al.* Aptamers targeting rabies virus-infected cells inhibit viral replication both in vitro and in vivo. *Virus Res.* 173, 398–403 (2013).
 90. Walsh, R. & DeRosa, M. C. Retention of function in the DNA homolog of the RNA dopamine aptamer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 732–735 (2009).
 91. Zhu, Q., Shibata, T., Kabashima, T. & Kai, M. Inhibition of HIV-1 protease expression in T cells owing to DNA aptamer-mediated specific delivery of siRNA. *Eur. J. Med. Chem.* 56, 396–399 (2012).
 92. Rowsell, S. *et al.* Crystal structures of a series of RNA aptamers complexed to the same protein target. *Nat. Struct. Biol.* 5, 970–5 (1998).
 93. Huang, D.-B. *et al.* Crystal structure of NF-kappaB (p50)₂ complexed to a high-affinity RNA aptamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9268–73 (2003).
 94. Long, S. B., Long, M. B., White, R. R. & Sullenger, B. a. Crystal structure of an RNA aptamer bound to thrombin. *RNA* 14, 2504–2512 (2008).
 95. Hermann, T. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science* (80-.). 287, 820–825 (2000).
 96. Buck, C. B. *et al.* Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. *PLoS Pathog.* 2, 0671–0680 (2006).
 97. Rodríguez, A. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of two carrageenan-based formulations to prevent HPV acquisition. *Antiviral Res.* 108, 88–93 (2014).
 98. Cagno, V. *et al.* The agmatine-containing poly(Amidoamine) polymer AGMA1 binds cell surface heparan sulfates and prevents attachment

REFERENCIAS

of mucosal human papillomaviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 5250–5259 (2015).

12

ANEXO

PUBLICACIÓN

Inhibition of Human Papillomavirus Type 16 Infection Using an RNA Aptamer

Diana Gabriela Valencia-Reséndiz, Giovanni Palomino-Vizcaino, Juana Virginia Tapia-Vieyra,*
María Luisa Benítez-Hess, Ana Gabriela Leija-Montoya†, and Luis Marat Alvarez-Salas

Human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA has been found in ~50% of cervical tumors worldwide. HPV infection starts with the binding of the virus capsid to heparan sulfate (HS) receptors exposed on the surface of epithelial basal layer keratinocytes. Previously, our group isolated a high-affinity RNA aptamer (Sc5c3) specific for HPV16 L1 virus-like particles (VLPs). In this study, we report the inhibition of HPV16 infection by Sc5c3 in a pseudovirus (PsVs) model. 293TT cells were infected by HPV16 PsVs containing the yellow fluorescent protein (YFP) as reporter gene. Incubation of HPV16 PsVs with Sc5c3 before infection resulted in a dose-dependent decrease in YFP fluorescence, suggesting infection inhibition. Aptamer degradation by RNase A restored PsVs infectivity, supporting the previous observation that Sc5c3 aptamer can inhibit infection. VLP mutants with removed HS binding sites were used in binding assays to elucidate the Sc5c3 blocking mechanism; however, no binding difference was observed between wild-type and mutant VLPs, suggesting that pseudoinfection inhibition relies on mechanisms additional to electrostatic HS binding site interaction. A DNA/RNA Sc5c3 version also inhibited HPV PsVs infection, suggesting that a modified, nuclease-resistant Sc5c3 may be used to inhibit HPV16 infection *in vivo*.

Keywords: aptamer, papillomavirus, HPV, pseudovirus, binding, viral inhibition

Introduction

PAPILLOMAVIRUSES ARE SMALL nonenveloped DNA viruses that infect mucosal or cutaneous epithelium. More than 99% of cervical cancer cases contain human papillomavirus (HPV) DNA sequences; particularly, HPV type 16 (HPV16) is the most prevalent type worldwide [1]. The HPV capsid is 50–60 nm in size and contains 360 units of the L1 protein (major capsid protein) and a variable quantity of the L2 protein (minor capsid protein) arranged in 72 capsomers [2–5]. The key event for HPV infection is the binding of the viral capsid to heparan sulfate (HS), a negatively charged linear oligosaccharide attached to a protein core on the cell surface [6–8]. There are multiple superficial HS binding sites on the HPV capsid integrated by positively charged amino acids from the L1 protein. Nevertheless, the HS binding site composed by residues K278 and K361 has been proposed as the primary binding site for HS. Other L1 HS binding sites, including residues K54, K356, N57, K59, K442, and K443, do not affect attachment to the cell

surface or basal membrane, although mutagenesis experiments showed that HPV infectivity is significantly compromised when such positions are affected [9–11].

The availability of prophylactic vaccines for HPV has resulted in a significant decrease of HPV infections, precancerous lesions, and genital warts. HPV immunization has been included in the national immunization schedule in many developed countries [12,13]. In contrast, 84% of the new cases of cervical cancer every year take place in developing countries where application of HPV immunization is limited by diverse factors, including the high cost of the vaccine, inadequate healthcare infrastructure, and sociocultural barriers [14,15]. In addition, over 90% HPV infections are spontaneously cleared in immunocompetent subjects and only a fraction of infected women develop cervical cancer [16]. Thus, additional factors are likely to contribute to cervical malignant progression, making necessary a continuing development of accessible and affordable complementary tools to prevent HPV infection and cervical cancer.

Laboratorio de Terapia Génica, Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Ciudad de México, México.

*Current affiliation: Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular-U.N.A.M. Ciudad de México, México.

†Current affiliation: Laboratorio de Bioquímica, Unidad de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali BC, México.

Aptamers are small single-stranded oligonucleotides that fold into three-dimensional structures that tightly and specifically bind to a diverse range of ligands [17,18]. It is well known that aptamers have several advantages as theranostics tools, such as low immunogenicity, resistance to temperature changes, low cost, and reproducible production [19,20]. Recently, aptamers have emerged as powerful antiviral agents. Inhibition of viral infections such as influenza A and B, hepatitis C, and HIV-1 has been accomplished by interaction of specific aptamers directed toward viral capsid proteins and a consequent blockage of the viral fusion [21–23].

Previously, our group isolated an RNA aptamer (Sc5c3) directed against HPV16 L1 virus-like particles (VLPs). Sc5c3 specifically bound HPV16 L1 VLPs in a complex mix of proteins from murine cervical washes [24]. There are no specific reports on the affinity of HPV16 for cell-surface HS, although the HPV-HS interaction, mediated by hydrogen bonds and electrostatic forces, appears conserved among the diverse HPV types [10]. Moreover, the binding affinity of VLPs to cell surface receptors ($K_D=100$ pM [25]) from the closely related HPV33 (HPV species group 9 [26]) suggests that HPV16 attachment to cell surface receptors may have a similar value. In such case, the higher affinity of Sc5c3 for HPV16 L1 VLPs ($K_D=0.05$ pM) [24] may have the potential to block HPV16 infection by competing out the viral attachment to the cell surface.

In this study, we report that the Sc5c3 aptamer has the potential to inhibit HPV16 infection. HPV16 pseudoviruses (PsVs), containing the yellow fluorescent protein (YFP) as reporter gene, were used to model HPV16 infection in 293TT cells [27]. The incubation of HPV16 PsVs with Sc5c3 before pseudoinfection resulted in a dose-dependent decrease in YFP fluorescence, indicating infection inhibition by Sc5c3. HPV16 L1 VLPs comprising reported mutant HS union sites were used in binding assays to elucidate the Sc5c3 infection-inhibiting mechanism. However, no difference in Sc5c3 binding was observed between wild-type and mutant VLPs, suggesting that infection inhibition may rely on mechanisms additional to electrostatic HS binding site interaction. To increase Sc5c3 stability, we produced a DNA/RNA chimera, which retained about 80% binding and also inhibited HPV16 PsVs infection, suggesting that a modified, nuclease-resistant Sc5c3 may be used to inhibit HPV16 infection *in vivo*. Altogether, the results presented in this study show the proof-of-concept of the use of aptamers to inhibit HPV infection.

Materials and Methods

Cell culture

The 293TT cells were cultured in Gibco® Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) supplemented with 5% Gibco fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific), 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (PAA Laboratories, Inc., ON, Canada), and 200 µg/mL Gibco hygromycin (Thermo Fisher Scientific) at 37°C and 5% CO₂. For VLP production, recombinant baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* Sf-21 cells (Thermo Fisher Scientific) were cultivated in Gibco SF 900-II serum-free medium (Thermo Fisher Scientific) at 26°C.

Oligonucleotides and plasmids

All oligonucleotides were purchased from T4 oligo® (ADN Sintético S.A.P.I. de C.V., Gto., México). Primers FwL1XhoI (5'-ATC TCG AGT AAT GAG CCT GTG GC-3') and RvL1HindIII-EcoRI (5'-CGG CCA TGA ATT CAA AAA GCT TCA CAG CTT CCT CTT-3') were used to amplify L1 sequences. The p16sheLL expression plasmid was obtained from Addgene (Cambridge, MA) and contains both HPV16 L1 and L2 genes. The reporter plasmid pSVLYFP contains the YFP gene derived from the pEYFP plasmid (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) cloned into the pSVL expression vector (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh PA).

Aptamer production

Single-stranded DNA (ssDNA) oligonucleotides for Sc5c3 and Sc5c3A18 aptamers were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using FWD and REV primers as previously reported [24]. The double-stranded DNA product was *in vitro* transcribed using T3 RNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Transcripts were purified by denaturing polyacrylamide gels (8% polyacrylamide, 7 M urea) and eluted overnight in an elution buffer (0.5 M ammonium acetate, 1 mM EDTA, and 0.1% SDS) at 4°C. Recovered RNA was purified using the Invitrogen™ TRIzol® reagent (Thermo Fisher Scientific) followed by isopropanol precipitation. For labeled aptamers, UTP was substituted by α -[³²P]-UTP (3000 Ci/mmol) (Perkin Elmer, Inc., Waltham, MA).

Immunoblotting

VLPs (15 µg) were boiled in Laemmli loading buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 2% (v/v) β -mercaptoethanol, and 0.01% (w/v) bromophenol blue) before electrophoresis in denaturing 8% polyacrylamide/SDS gels. Gels were electrotransferred to Immobilon®-P membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA). Membranes were blocked and incubated with a primary mouse monoclonal antibody (sc-57834) against HPV16 L1 (aa 289-16981) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) and a secondary donkey anti-mouse IgG-HRP antibody (sc-2314) (Santa Cruz Biotechnology). Detection was accomplished with the Luminata™ Forte HRP Substrate (EMD Millipore, Billerica, MA) in a C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR Biosciences, Inc., Lincoln, NE).

HPV16 PsVs production

HPV16 PsVs were produced based on the reported method by Buck and Thompson [28]. 293TT cells were cotransfected with the p16sheLL expression plasmid [29] and the reporter plasmid pSVLYFP using the Lipofectin® transfection reagent (Thermo Fischer Scientific) and incubated for 72 h. Cells were harvested and washed with Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 137.93 mM NaCl, and 8.06 mM Na₂HPO₄·7H₂O pH 7.2–7.7) before resuspension with DPBS-Mg (DPBS supplemented with 9.5 mM MgCl₂) in siliconized microtubes. For PsVs maturation, Brij-58 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) was added to the cellular suspension to a final concentration of 0.25% and the mixture was incubated at

37°C for 24 h. After maturation, the mixture was digested with Benzonase® (Sigma-Aldrich) at 0.1% final concentration during 1 h at 37°C and chilled on ice before clarification by centrifugation at 2,000g for 15 min. Supernatant was removed and placed on an OptiPrep™ gradient (Sigma-Aldrich) for ultracentrifugation at 170,000g during 20 h. The fraction containing PsVs was recovered and filtered through a Sephadex® G25 column (GE Healthcare Biosciences) in DPBS-0.5 M NaCl. PsVs production was verified by immunoblotting and transmission electron microscopy (TEM). Infectivity was a measure of the number of 293TT fluorescent cells generated by 1 µL of viral stock after 72 h postinfection. Each fluorescent cell was considered an infectious unit (InU). PsVs were stored at 4°C until use.

VLP production

Production of HPV16 L1 VLPs was performed as previously described [24]. Briefly, HPV16 wild-type and mutant L1 sequences with substitutions in relevant sites for HS binding [11] (kindly provided by Martin Sapp, PhD, Department of Microbiology and Immunology, LSU Health Sciences Center) (Table 1), were PCR amplified and VLPs were obtained using Invitrogen Bac-to-Bac™ Baculovirus Expression System, as indicated by the manufacturer (Thermo Fisher Scientific). Recombinant baculovirus was used to infect proliferating Sf21 cells in SF900 II medium for 72 h at 26°C. Infected cells were pelleted by centrifugation and resuspended in DPBS-Mg supplemented with cOmplete™ protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) in siliconized microtubes before sonication in a GEX 130 PB ultrasonic processor (Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL). VLPs were purified through ultracentrifugation on CsCl isopycnic gradients and extensively dialyzed against DPBS at 4°C. VLPs were verified by immunoblotting and TEM and stored at 4°C until use.

Binding assays

Purified HPV16 VLPs or PsVs were incubated with 2 pmol of ³²P-labeled Sc5c3 or Sc5c3Δ18 and 40 U of RiboLock™

TABLE 1. MUTANT HPV16 L1 VIRUS-LIKE PARTICLES USED IN THIS STUDY

VLP name	Mutation ^{a-c}
M2	K361A
M3	K356A
M4	K278A
M6	K278A, K361A
M12	K54A, K278A, K356A, K361A
M15	K452A
M24	N57A, K59A, K278A, K361A, N450A, K452A
M25	K54A, N57A, K59A, K278A, K361A, K442A, K443A

VLPs were prepared using mutant HPV16 L1 sequences with substitutions in one or more amino acids relevant for HS binding.

^aResidues of lysine (K) or asparagine (N) on HS binding sites were substituted by alanine (A).

^bThe numbers indicate the amino acid residue position on the HPV16 L1 sequence.

^cAll HPV16 L1 mutants have been previously reported [10]. HPV16, human papillomavirus type 16; VLPs, virus-like particles.

RNase inhibitor (Thermo Fischer Scientific) in DPBS for 30 min at room temperature. The binding mix was placed on a slot blot apparatus with a nitrocellulose (NC) membrane (aptamer:protein complex retainer) (GE Healthcare Biosciences) layered on a nylon (NY) membrane (unbound aptamer retainer) (GE Healthcare Biosciences), as previously reported [30]. The residual label on the membranes was quantified using a Typhoon Variable Mode Imager (GE Healthcare Biosciences).

Pseudovirus (PsVs) infection inhibition

293TT cells were seeded into 24-well plates (1×10^5 /well) and incubated overnight at 37°C. Infection mixes were prepared with 5,000 InU PsVs and increasing concentrations of Sc5c3, Sc5c3Δ18, tRNA, or heparin plus 80 U of Ribolock RNase inhibitor (Thermo Fischer Scientific) in 80 µL DPBS final volume. Infection mixes were maintained on gentle agitation at room temperature for 20 min and then added to 293TT in 500 µL DMEM. PsVs adsorption was allowed for 20 min before removal of the infection mix followed by addition of 1 mL of prewarmed DMEM supplemented with 5% FBS. After 72 h, cells were harvested, washed with DPBS, and resuspended in 0.5 mL of DPBS for analysis in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) with a band-pass filter at 530/30 nm (FL1). Excitation was performed with a 488 nm argon laser (1×10^4 cells/read).

Results

HS inhibits aptamer binding

The Sc5c3 RNA aptamer comprises 58 nt distributed in five structural domains: the double stranded stem domains (S1 and S2), the central bubble (B1), the main loop (ML), and the 3'-end unstructured region (UR) (Fig. 1A). The ML region contains positions required for VLP recognition, but deletion of the UR region (Sc5c3Δ18) does not modify specificity [24] (Fig. 1B), suggesting that both Sc5c3 and Sc5c3Δ18 can be used to inhibit HPV infection.

It has been reported that both HS and heparin can interact with HPV and inhibit infection, while no effect on HPV infection has been reported using chondroitin sulfate [6,7]. To initially establish the potential of Sc5c3 to inhibit HPV infection, binding assays were made with HPV16 L1 VLPs and constant amounts of labeled Sc5c3 aptamer competed against increasing concentrations of HS, heparin, or chondroitin sulfate. Both HS and heparin, but not chondroitin sulfate, inhibited Sc5c3 binding in a dose-dependent manner (Fig. 1C). The heparin inhibitory effect was stronger than the HS, probably due to the higher content of sulfate groups within the molecule backbone. Additional experiments using lower heparin concentrations showed that nanomolar quantities are enough to inhibit Sc5c3 binding (Supplementary Fig. S1; Supplementary Data are available online at www.liebertpub.com/nat). These results suggested that Sc5c3, HS, and heparin may compete for the same site on the VLP surface and thus harbor a potential to inhibit HPV16 infection.

Sc5c3 aptamer inhibits HPV16 pseudoinfection

Because of lack of a reliable *in vitro* model for HPV infection, HPV16 PsVs containing the pSVLYFP plasmid as pseudogenome were produced to mimic the HPV infection

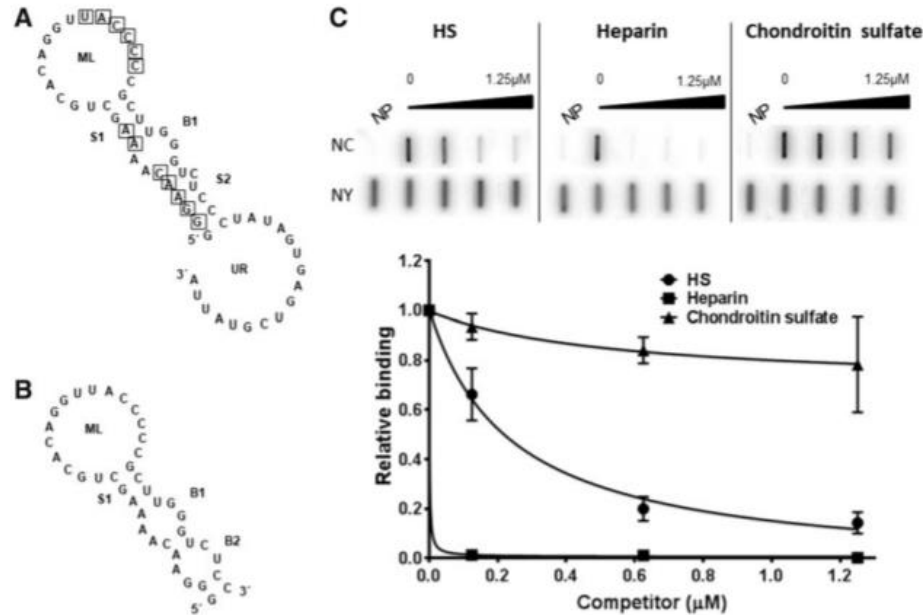


FIG. 1. HS inhibits Sc5c3 binding. (A) Structural representation of the Sc5c3 aptamer. The structural features of the Sc5c3 aptamer, including the double-stranded stem domains (S1 and S2), the central bubble (B1), the main loop (ML), and the 3'-end unstructured region, are shown. Nucleotides conserved as ribonucleotides in the DNA/RNA chimera aptamer are indicated with *squares*. (B) Structural representation of the Sc5c3Δ18 aptamer. The ML, S1, and B2 regions are conserved and a second bubble (B2) is formed. (C) *Upper panel.* Effect of HS on Sc5c3 binding. Representative binding assays using fixed amounts of 32 P-labeled Sc5c3 RNA and HPV16 L1 VLPs competed with increasing concentrations (up to 1.25 μM) of HS, heparin, or chondroitin sulfate. Residual aptamer on NC and NY membranes is shown. An NP negative control was included. *Lower panel.* Competitive binding quantification. The ratio of residual radioactivity on NC membranes over the total input was quantified and plotted against HS (black circles), heparin (black squares), or chondroitin sulfate (black triangles) concentrations. Plotted data are relative to Sc5c3 binding to HPV16 L1 VLPs with no competitors and represents the mean and standard deviation of three experiments. HS, heparan sulfate; VLPs, virus-like particles; NC, nitrocellulose; NY, nylon; NP, no protein; HPV16, human papillomavirus type 16.

process in 293TT cells (pseudoinfection). An effective pseudoinfection procedure will result in fluorescent cells through the expression of YFP as reporter protein. Although it is well known that HPV16 VLPs and PsVs display the same immunogenicity and are structurally similar to the native virus, a binding analysis was performed to show that Sc5c3 (initially isolated against HPV16 L1 VLPs) retains affinity for PsVs. HPV16 L1 VLPs and PsVs were incubated with 32 P-labeled Sc5c3 in binding assays. Analysis of the residual radioactivity on the NC and NY membranes showed that the bound aptamer was similar for both HPV16 L1 VLPs and PsVs, thus indicating that Sc5c3 can indistinctly bind both PsVs and VLPs (Fig. 2A). The negative controls with no protein and with the unrelated protein BSA produced no significant binding.

To test pseudoinfection inhibition by the Sc5c3 aptamer, HPV16 PsVs were incubated with 30 μM of Sc5c3, Sc5c3Δ18, tRNA, or heparin before addition to 293TT monolayer cultures. Flow cytometry quantification of pseudoinfected cells showed that Sc5c3 treatment significantly decreased pseudoinfection by 61% relative to the nontreated (NT) PsVs control. Pseudoinfection inhibition by Sc5c3Δ18 was statistically similar to that of Sc5c3 ($p < 0.01$). The

heparin-treated PsVs-positive control resulted in 80% pseudoinfection inhibition, but no significant inhibition was observed with the tRNA-treated PsVs control (Fig. 2B). Analysis of the stability of Sc5c3 RNA in the basal culture medium showed that a substantial amount of the aptamer RNA survives the transfection procedure (Supplementary Fig. S2).

To further show pseudoinfection inhibition specificity, the PsVs:aptamer infection mix was incubated with RNase A before pseudoinfection. Treatment with RNase A restored fluorescence in infected cells showing that pseudoinfection inhibition is caused by the presence of aptamer RNA. The RNase A treatment did not significantly affect the heparin-induced pseudoinfection inhibition (Fig. 2B). As an additional control, we selected the inactive Sc5c3 mutant C27A, harboring a single-nucleotide change in position 27 (cytosine to adenine) within the ML region (Fig. 2C). C27A is unable to bind HPV16 L1 VLPs, probably due to a strong change on Sc5c3 secondary structure (Fig. 2D). Treatment of PsVs with C27A (20 μM) before 293TT infection resulted in similar fluorescence levels to the NT control, supporting our previous observation that the inhibitory effect on PsVs infection is specific for Sc5c3 (Fig. 2E). The heparin-positive control

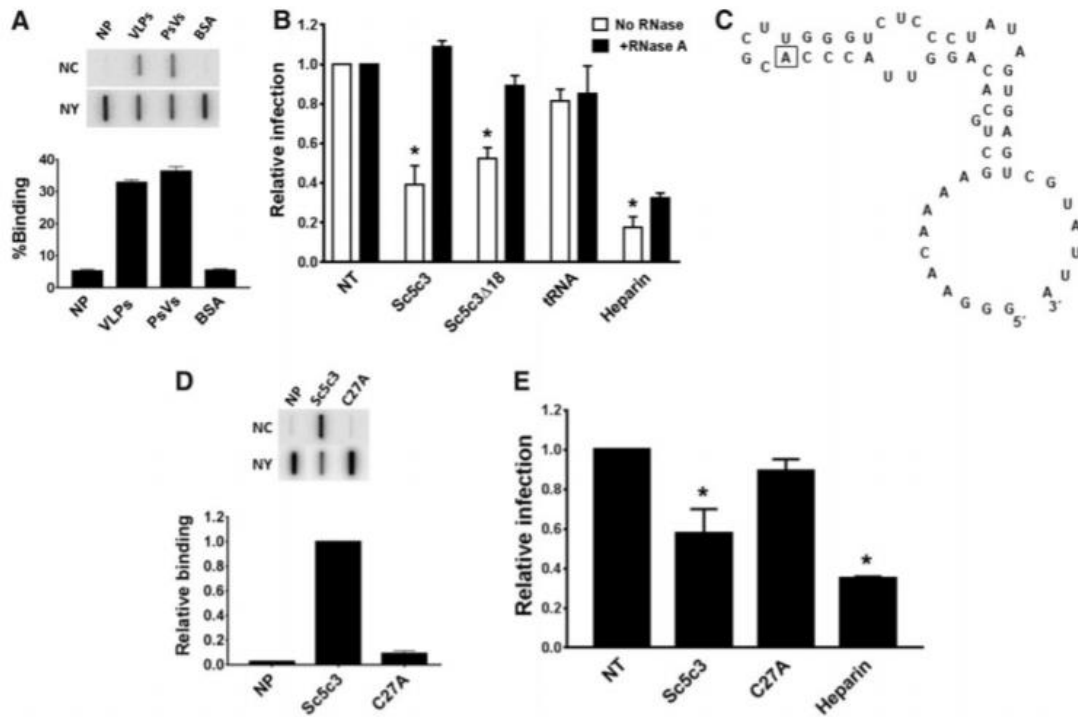


FIG. 2. Sc5c3 inhibits HPV16 PsVs pseudoinfection. (A) Binding of Sc5c3 aptamer to HPV16 L1 VLPs and HPV16 PsVs. *Upper panel.* Binding assays of labeled Sc5c3 RNA incubated with HPV16 L1 VLPs, PsVs, or BSA. Residual aptamer on NC and NY membranes is shown. NP negative control. *Lower panel.* The plot shows the percentage of bound RNA relative to total RNA input and the data represent the mean and standard deviation of three independent experiments. (B) Inhibition of PsVs pseudoinfection by the Sc5c3 aptamer. HPV16 PsVs were incubated with 30 μ M of Sc5c3, Sc5c3 Δ 18, the negative control tRNA, or the positive control heparin before infection (*white bars*). RNase A was added to the infection mix to eliminate RNA before infection (*black bars*). Pseudoinfected 293TT cell fluorescence was quantified by flow cytometry and plotted as relative to the NT PsVs pseudoinfection control. The graphs represent the mean and standard deviation of three independent experiments. Asterisks indicate statistical significance ($n=3$, $p<0.01$). (C) Structural representation of Sc5c3 mutant C27A. The cytosine at position 27 was transversed to adenine (*square*). (D) Binding analysis of mutant C27A. *Upper panel.* Binding assays of VLPs with labeled Sc5c3 or mutant C27A. Residual aptamer RNA on NC and NY membranes is shown. The negative control does not contain protein (NP). *Lower panel.* The plot shows the percentage of bound aptamer relative to total aptamer input and data represent the mean and standard deviation of three independent experiments. (E) Inhibition of HPV pseudoinfection by mutant C27A. HPV16 PsVs were incubated with 20 μ M of Sc5c3, C27A, or heparin. Pseudoinfected 293TT cell fluorescence was quantified by flow cytometry and plotted as relative to the NT PsVs pseudoinfection control. The graphs represent the mean and standard deviation from independent experiments. Asterisks indicate statistical significance ($n=2$, $p<0.01$). PsVs, pseudovirus.

showed the expected level of inhibition (30%–40%) (Fig. 2E). Taken together, these results strongly suggest that Sc5c3 inhibits HPV16 PsVs infection.

Aptamers inhibit HPV16 infection in a dose-dependent manner

To show dose dependence of the Sc5c3-mediated inhibition of HPV16 pseudoinfection, PsVs were incubated with increasing amounts of Sc5c3, Sc5c3 Δ 18, and heparin (5, 10, 20, and 30 μ M) before addition to 293TT monolayer cultures and quantification by flow cytometry. Pseudoinfection inhibition by Sc5c3 treatment reached saturation at 10 μ M (about 60%), comparable to the inhibition observed in heparin-

treated PsVs (Fig. 3). However, Sc5c3 Δ 18 treatment caused lower pseudoinfection inhibition relative to Sc5c3 or heparin at lower concentrations, suggesting that although dispensable for VLP binding, the 3' UR domain may play a role on the stability of the Sc5c3-PsVs complex.

PsVs infection inhibition by aptamers requires nonelectrostatic interactions

To further explore the molecular basis of the Sc5c3-mediated inhibition of HPV16 pseudoinfection, binding assays were made with several HPV16 L1 VLPs containing mutations on the reported HS union sites on the capsid surface [10,11]. Mutant HPV16 L1 VLPs containing a single or

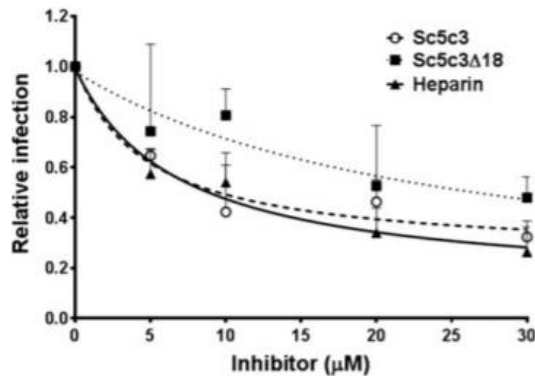


FIG. 3. Sc5c3 inhibits HPV16 PsVs pseudoinfection in a dose-dependent manner. 293TT cells were pseudoinfected with HPV16 PsVs treated with increasing concentrations of Sc5c3 (open circles) or Sc5c3Δ18 (black squares) aptamer RNA or the heparin positive control (black triangles) and quantified by flow cytometry. Plots show pseudoinfection relative to inhibitor-free PsVs control and represent the mean and standard deviation of three independent experiments.

multiple substitutions of lysine and asparagine residues by alanine (Table 1) were produced and verified by immunoblotting (Fig. 4A). Mutant VLPs were incubated with labeled Sc5c3 or Sc5c3Δ18 and then loaded on the slot blot setup for binding quantification. No significant binding differences were observed between the wild-type VLPs and single (M2, M3, M4, and M15), double (M6), or even quadruple VLP mutants (M12) (Fig. 4B). Nevertheless, the multiple mutant VLPs M24 and M25 showed a small, but significant decrease in binding for both Sc5c3 and Sc5c3Δ18. This modest inhibitory effect observed could be caused by the strong loss of positively charged amino acids on the VLP surface, which may mediate electrostatic interactions with the negatively charged RNA, instead of indicating biologically relevant binding sites for Sc5c3. These results suggest that Sc5c3-mediated inhibition may rely on additional mechanisms to electrostatic HS binding site interaction.

A Sc5c3 DNA/RNA chimera maintains infection inhibition activity

Chemically, RNA is less stable than DNA since the reactive 2'-hydroxyl group of the ribose sugar. In addition, the large amount of ribonucleases present in biofluids and tissues rapidly process most unprotected RNAs, as shown for Sc5c3 in culture medium with serum (Supplementary Fig. S2). As an initial step to improve aptamer stability, an ssDNA version of Sc5c3 was synthesized to ease the selection of chemical substitutions required to synthesize ribonuclease-resistant aptamers. Also, an ssDNA/RNA chimera was synthesized keeping as RNA positions within the ML, S1, and S2 regions, which are important for binding and specificity [24] (Fig. 1A). To evaluate the effect on binding, the labeled Sc5c3 ssDNA or DNA/RNA chimera were incubated with HPV16 L1 VLPs in binding assays using Sc5c3 RNA as positive control. Sc5c3 ssDNA nearly lost all VLP binding capacity relative to Sc5c3 RNA and was no longer considered

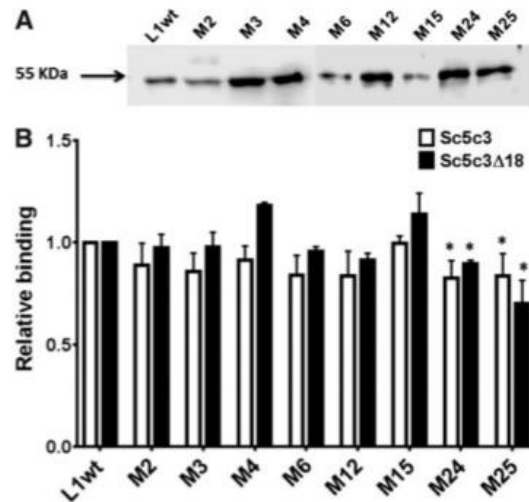


FIG. 4. Sc5c3 binding to HPV16 L1 VLPs is independent of HS sites. (A) Wild-type (L1 wt) and mutant (M2, M3, M4, M6, M12, M15, M24, and M25) HPV16 L1 VLPs were produced and verified by immunoblotting. The arrow indicates the approximate size (55 kDa) of wild-type HPV16 L1 (L1wt). Nomenclature corresponds to the different HPV16 L1 mutants described in Table 1. (B) Binding assays using HPV16 L1 mutant (M2, M3, M4, M6, M12, M15, M24, and M25) and wild-type (L1wt) VLPs with labeled Sc5c3 (white bars) or Sc5c3Δ18 (black bars) RNA. Aptamer binding with each mutant was plotted as relative to wild-type HPV16 L1 VLP binding and they represent the mean and standard deviation of three independent experiments. Asterisks indicate statistical significance ($n=3$, $p<0.05$).

for further experiments (Fig. 5A). However, the Sc5c3 DNA/RNA chimera conserved about 80% VLPs binding relative to Sc5c3 RNA, suggesting that the 2' OH may play a significant role in VLP recognition (Fig. 5A). Treatment of HPV16 PsVs with the Sc5c3 DNA/RNA chimera (20 μM) before 293TT infection resulted in pseudoinfection inhibition at a similar level than Sc5c3 RNA. The positive (heparin) and negative (C27A mutant) controls resulted in 70% of inhibition and no significant effect, respectively (Fig. 5B). Therefore, although a small loss in VLP binding, the DNA/RNA chimera conserved the pseudoinfection inhibition capacity of Sc5c3 RNA, suggesting that several positions within the Sc5c3 structure can be modified without substantial changes in activity.

Discussion

Although prophylactic vaccines against HPV infection were introduced about a decade ago, cervical cancer is still one of the deadliest threats for women living in developing countries [31]. High costs, poor healthcare infrastructure, cultural issues, and vaccine toxicity issues can be cited as the main reasons for this apparent lack of effectivity [15]. These facts remark the lack of efficient strategies for HPV transmission control, early detection, and treatment, indicating that implementation of new strategies complementary to HPV vaccination is still necessary.

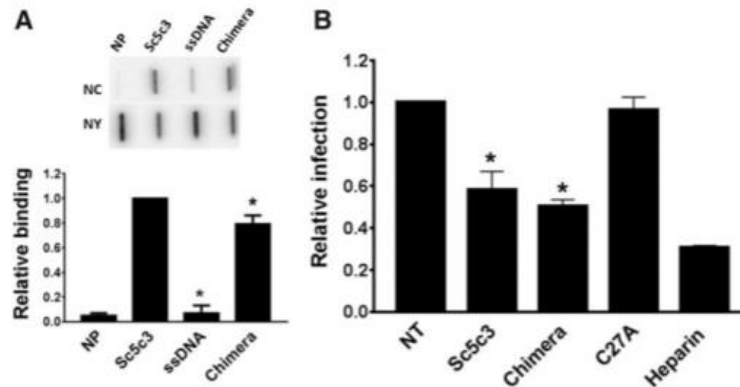


FIG. 5. A Sc5c3 DNA/RNA chimera inhibits HPV16 PsVs infection. **(A)** Binding of Sc5c3 ssDNA and DNA/RNA chimera HPV16 L1 VLPs. *Upper panel.* Native Sc5c3 RNA and the modified ssDNA and DNA/RNA chimera versions were radiolabeled and incubated with HPV16 L1 VLPs in binding assays. Residual aptamer on NC and NY membranes is shown. The negative control does not contain protein (NP). *Lower panel.* The plot shows the percentage of bound aptamer relative to total aptamer input and data represent the mean and standard deviation of three independent experiments. **(B)** Inhibition of PsVs pseudoinfection by the chimeric DNA/RNA aptamer. HPV16 PsVs were incubated with 20 μ M of Sc5c3, the DNA/RNA chimera, the C27A mutant (negative control), or the heparin (positive control) before 293TT cell infection. Fluorescence was quantified by flow cytometry and plotted as relative to the nontreated PsVs pseudoinfection control. The graphs represent the mean and standard deviation of three independent experiments. Asterisks indicate statistical significance ($n=3$, $p<0.01$).

In this study, we report the use of an RNA aptamer to inhibit HPV16 PsVs infection in 293TT cells. Pseudoinfection inhibition by Sc5c3 was comparable to that reported for other unmodified RNA aptamers used to block cell receptor binding such as P30-10-16 and A20 aptamers against hemagglutinin from influenza A and B, respectively (55%–93% inhibition at micromolar range) [32]. In addition, our results showed that Sc5c3 pseudoinfection inhibition was similar to heparin-induced inhibition, a molecule structurally related to HS and accepted as an efficient inhibitor of the HPV infection [7]. Nevertheless, heparin application as an antiviral agent is limited by its anticoagulant activity and the multiple interactions with cellular proteins involved in cell migration, adhesion, angiogenesis, proliferation, and so on, which could result in high toxicity [33]. On the other hand, Sc5c3 has shown high specificity in a complex mixture of proteins [24]. However, the main disadvantage of RNA aptamers lies in its susceptibility to rapid degradation in biofluids. Previous studies have shown that DNA aptamers are more stable than RNA aptamers in complex biofluids such as FBS and human serum, resulting in infection inhibition of about 90% at nanomolar concentrations [34–37]. Thus, the addition of modified nucleotides to Sc5c3 may confer a higher inhibition capacity by adding stability in biofluids through resistance to nuclease-directed degradation [38]. The direct conversion of aptamer RNA into ssDNA to increase nuclease resistance has been previously tested, using the ssDNA version of an RNA aptamer against dopamine, resulting in similar binding specificity and even improved affinity [39]. The ssDNA version of an RNA aptamer against the CD4 protein also retained its binding abilities. Moreover, the ssDNA aptamer lasted up to 2 h in human serum, a remarkable improvement over the RNA version [40]. In this work, the Sc5c3 ssDNA lost most binding capacity for the VLPs. There is not enough knowledge on Sc5c3 RNA structure to predict what nucleo-

tide positions can be modified without significant loss of binding, while conferring nuclease resistance. Thus, an empirical approach is required modifying or mutating positions one by one to obtain the best binding/resistance compromise. The production of an Sc5c3 DNA/RNA chimera resulted in the retention of most of the Sc5c3 binding capacity, suggesting that at least some of the 2' OH groups within Sc5c3 RNA must participate in VLP binding. Although the DNA/RNA chimera did not produce higher inhibition than Sc5c3 RNA, its stability in biofluids should be improved by the inclusion of deoxynucleotides as no known nuclease can process DNA/RNA chimeras. Further studies on the stability

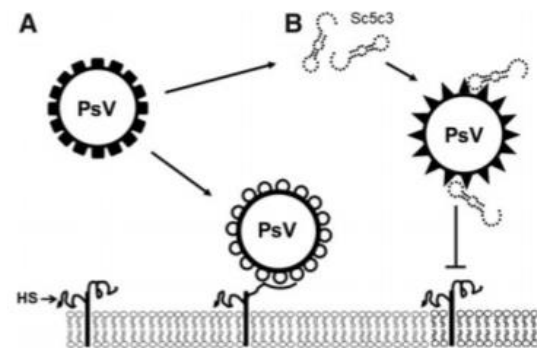


FIG. 6. Model of HPV16 PsVs pseudoinfection inhibition by Sc5c3. **(A)** PsVs bind to HS residues on the cell surface and induce conformational changes on the PsVs that allow internalization. **(B)** Binding of Sc5c3 to PsVs generates conformational changes on the viral surface, which would prevent primary receptor recognition, thus impeding viral attachment.

of the Sc5c3 chimera in biofluids are required to firmly establish nuclease resistance.

Crystallization of protein:aptamer complexes has shown that aptamers interact with the same binding site of the native ligand [41–43]; therefore, it was feasible that Sc5c3 could bind to several HS binding sites found on the PsVs and VLP surface. However, efficient Sc5c3 binding with mutant VLPs M2, M3, M4, M6, M12, and M15, which lack positively charged amino acids, suggested that pseudoinfection inhibition may not rely solely on HS binding sites. Moreover, previous analyses have determined that aptamer binding lead to conformational changes on both aptamer and target. This adaptive recognition can even induce secondary structure changes on the target peptide [44]. Therefore, we hypothesized that additional nonelectrostatic forces could modify Sc5c3-PsVs conformation by adaptive interaction, thus preventing successful viral attachment to the primary receptor or other downstream conformational changes indispensable for internalization and uncoating (Fig. 6). Further experiments on Sc5c3-VLP/PsVs binding and a complete Sc5c3 structural characterization should be performed to resolve the inhibitory mechanism on the HPV infection process.

As a perspective, the Sc5c3 aptamer could be a component of a new topical application product as suggested for carrageenan (a polysaccharide structurally similar to HS and a potent inhibitor of HPV infection) and the positively charged polymer AGMA1 [29,45,46]. Unlike Sc5c3, carrageenan probably binds HS binding site and AGMA1 binds directly to HS. Thus, incorporation of the three molecules in a single treatment could inhibit viral entry in different ways, resulting in an even more effective tool. In addition, carrageenan and AGM1 have been proposed as antivirals for a wide range of HPV types. Because L1 is highly conserved among HPV types [26,47], we do not exclude the possibility that Sc5c3 may cross-react with other HPV types and inhibit infection.

In conclusion, this is the first report of an RNA aptamer efficiently blocking HPV infection. Although further characterization on the molecular mechanisms involved remains to be solved, we propose that Sc5c3 could be used as a novel alternative to prevent HPV infection.

Acknowledgments

The aptamer sequences in this report are covered under patent MX327972. This work was supported by ICYTDF grant 220/2011. We thank Dr. John T. Schiller, Center for Cancer Research-NCI/NIH, by the generous gift of 293T cells, and Dr. Martin Sapp, PhD, Department of Microbiology and Immunology, LSU Health Sciences Center by the kind donation of HPV16 L1 mutants.

Author Disclosure Statement

All the authors manifest that there is no current commercial association that might create a conflict of interest in connection with the article.

References

- Walboomers JM, MV Jacobs, MM Manos, FX Bosch, JA Kummer, KV Shah, PJ Snijders, J Peto, CJ Meijer and N Munoz. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12–19.
- Doorbar J and PH Gallimore. (1987). Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. *J Virol* 61:2793–2799.
- Baker TS, WW Newcomb, NH Olson, LM Cowser, C Olson and JC Brown. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 60:1445–1456.
- Chen XS, RL Garcea, I Goldberg, G Casini and SC Harrison. (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* 5:557–567.
- Buck CB, N Cheng, CD Thompson, DR Lowy, AC Steven, JT Schiller and BL Trus. (2008). Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol* 82:5190–5197.
- Joyce JG, JS Tung, CT Przysiecki, JC Cook, ED Lehman, JA Sands, KU Jansen and PM Keller. (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 274:5810–5822.
- Giroglou T, L Florin, F Schafer, RE Streeck and M Sapp. (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75:1565–1570.
- Johnson KM, RC Kines, JN Roberts, DR Lowy, JT Schiller and PM Day. (2009). Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol* 83:2067–2074.
- Knappe M, S Bodevin, HC Selinka, D Spillmann, RE Streeck, XS Chen, U Lindahl and M Sapp. (2007). Surface-exposed amino acid residues of HPV16L1 protein mediating interaction with cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 282:27913–27922.
- Dasgupta J, M Bienkowska-Haba, ME Ortega, HD Patel, S Bodevin, D Spillmann, B Bishop, M Sapp and XS Chen. (2011). Structural basis of oligosaccharide receptor recognition by human papillomavirus. *J Biol Chem* 286:2617–2624.
- Richards KF, M Bienkowska-Haba, J Dasgupta, XS Chen and M Sapp. (2013). Multiple heparan sulfate binding site engagements are required for the infectious entry of human papillomavirus type 16. *J Virol* 87:11426–11437.
- Bonanni P, A Bechini, R Donato, R Capei, C Sacco, M Levi and S Boccalini. (2015). Human papilloma virus vaccination: impact and recommendations across the world. *Ther Adv Vaccines* 3:3–12.
- Lee LY and SM Garland. (2017). Human papillomavirus vaccination: the population impact. *F1000Res* 6:866–877.
- Mukhopadhyay P and B Paul. (2009). Introducing HPV vaccine in developing countries—addressing the challenge. *Indian J Community Med* 34:370–371.
- Wigle J, E Coast and D Watson-Jones. (2013). Human papillomavirus (HPV) vaccine implementation in low and middle-income countries (LMICs): health system experiences and prospects. *Vaccine* 31:3811–3817.
- Nobbenhuis MA, TJ Helmerhorst, AJ van den Brule, L Rozendaal, FJ Voorhorst, PD Bezemer, RH Verheijen and CJ Meijer. (2001). Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet* 358:1782–1783.
- Tuerk C and L Gold. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249:505–510.
- Ellington AD and JW Szostak. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346:818–822.

19. Song KM, S Lee and C Ban. (2012). Aptamers and their biological applications. *Sensors (Basel)* 12:612–631.
20. Nimjee SM, RR White, RC Becker and BA Sullenger. (2017). Aptamers as therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 57:61–79.
21. Shum KT, J Zhou and JJ Rossi. (2013). Aptamer-based therapeutics: new approaches to combat human viral diseases. *Pharmaceuticals (Basel)* 6:1507–1542.
22. Wandtke T, J Wozniak and P Kopinski. (2015). Aptamers in diagnostics and treatment of viral infections. *Viruses* 7: 751–780.
23. Leija-Montoya AG, ML Benitez-Hess and LM Alvarez-Salas. (2016). Application of nucleic acid aptamers to viral detection and inhibition. In: *Nucleic Acids: From Basic Aspects to Laboratory Tools*. Larramendy ML and S Solonesky, eds. In Tech Open Access Publishers, Croatia; pp. 93–119.
24. Leija-Montoya AG, ML Benitez-Hess, JD Toscano-Garibay and LM Alvarez-Salas. (2014). Characterization of an RNA aptamer against HPV-16L1 virus-like particles. *Nucleic Acid Ther* 24:344–355.
25. Volpers C, F Unckell, P Schirmacher, RE Streeck and M Sapp. (1995). Binding and internalization of human papillomavirus type 33 virus-like particles by eukaryotic cells. *J Virol* 69:3258–3264.
26. de Villiers EM, C Fauquet, TR Broker, HU Bernard and HH Zur. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17–27.
27. Buck CB, DV Pastrana, DR Lowy and JT Schiller. (2004). Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol* 78:751–757.
28. Buck CB and CD Thompson. (2007). Production of papillomavirus-based gene transfer vectors. *Curr Protoc Cell Biol* 37:26.1.1–26.1.19.
29. Buck CB, CD Thompson, JN Roberts, M Muller, DR Lowy and JT Schiller. (2006). Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. *PLoS Pathog* 2:e69.
30. Toscano-Garibay JD, ML Benitez-Hess and LM Alvarez-Salas. (2011). Isolation and characterization of an RNA aptamer for the HPV-16 E7 oncoprotein. *Arch Med Res* 42:88–96.
31. Torre LA, F Bray, RL Siegel, J Ferlay, J Lortet-Tieulent and A Jemal. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65:87–108.
32. Gopinath SC, TS Misono, K Kawasaki, T Mizuno, M Imai, T Odagiri and PK Kumar. (2006). An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion. *J Gen Virol* 87:479–487.
33. Lever R and CP Page. (2002). Novel drug development opportunities for heparin. *Nat Rev Drug Discov* 1:140–148.
34. Jeon SH, B Kayhan, T Ben-Yedidia and R Arnon. (2004). A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin. *J Biol Chem* 279:48410–48419.
35. Cheng C, J Dong, L Yao, A Chen, R Jia, L Huan, J Guo, Y Shu and Z Zhang. (2008). Potent inhibition of human influenza H5N1 virus by oligonucleotides derived by SELEX. *Biochem Biophys Res Commun* 366:670–674.
36. Moore MD, J Cookson, VK Coventry, B Sproat, L Rabe, RD Cranston, I McGowan and W James. (2011). Protection of HIV neutralizing aptamers against rectal and vaginal nucleases: implications for RNA-based therapeutics. *J Biol Chem* 286:2526–2535.
37. Liang HR, Q Liu, XX Zheng, WW Gai, XH Xue, GQ Hu, HX Wu, HL Wang, ST Yang and XZ Xia. (2013). Aptamers targeting rabies virus-infected cells inhibit viral replication both in vitro and in vivo. *Virus Res* 173:398–403.
38. Zhu Q, G Liu and M Kai. (2015). DNA aptamers in the diagnosis and treatment of human diseases. *Molecules* 20: 20979–20997.
39. Walsh R and MC DeRosa. (2009). Retention of function in the DNA homolog of the RNA dopamine aptamer. *Biochem Biophys Res Commun* 388:732–735.
40. Zhu Q, T Shibata, T Kabashima and M Kai. (2012). Inhibition of HIV-1 protease expression in T cells owing to DNA aptamer-mediated specific delivery of siRNA. *Eur J Med Chem* 56:396–399.
41. Rowsell S, NJ Stonehouse, MA Convery, CJ Adams, AD Ellington, I Hirao, DS Peabody, PG Stockley and SE Phillips. (1998). Crystal structures of a series of RNA aptamers complexed to the same protein target. *Nat Struct Biol* 5:970–975.
42. Huang DB, D Vu, LA Cassiday, JM Zimmerman, LJ Maher, III and G Ghosh. (2003). Crystal structure of NF-kappaB (p50)2 complexed to a high-affinity RNA aptamer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9268–9273.
43. Long SB, MB Long, RR White and BA Sullenger. (2008). Crystal structure of an RNA aptamer bound to thrombin. *RNA* 14:2504–2512.
44. Hermann T and DJ Patel. (2000). Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* 287:820–825.
45. Rodriguez A, K Kleinbeck, O Mizenina, L Kizima, K Leventosky, N Jean-Pierre, G Villegas, BE Ford, ML Cooney, et al. (2014). In vitro and in vivo evaluation of two carrageenan-based formulations to prevent HPV acquisition. *Antiviral Res* 108: 88–93.
46. Cagno V, M Donalizio, A Bugatti, A Cibra, R Cavalli, E Ranucci, P Ferruti, M Rusnati and D Lembo. (2015). The agmatine-containing poly(amidoamine) polymer AGMA1 binds cell surface heparan sulfates and prevents attachment of mucosal human papillomaviruses. *Antimicrob Agents Chemother* 59:5250–5259.
47. Hofmann KJ, MP Neeper, HZ Markus, DR Brown, M Muller and KU Jansen. (1996). Sequence conservation within the major capsid protein of human papillomavirus (HPV) type 18 and formation of HPV-18 virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Virol* 77:465–468.

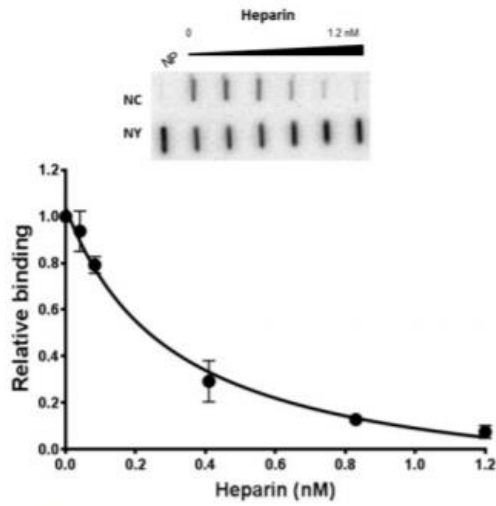
Address correspondence to:

Luis Marat Alvarez-Salas
Laboratorio de Terapia Génica
Departamento de Genética y Biología Molecular
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.
Ciudad de México 07360
México

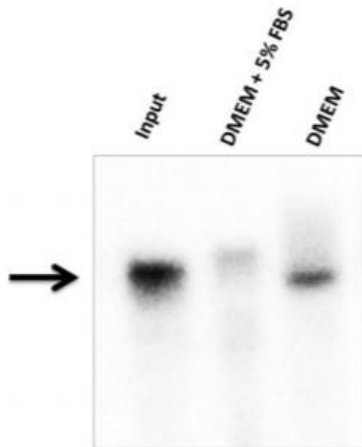
E-mail: lalvarez@cinvestav.mx

Received for publication July 19, 2017; accepted after revision January 8, 2018.

Supplementary Data



SUPPLEMENTARY FIG. S1. Effect of heparan sulfate on Sc5c3 binding. *Upper panel:* Representative binding assays using fixed amounts of ³²P-labeled Sc5c3 RNA and HPV16 L1 VLPs competed with increasing concentrations of HS. Residual label on NC and NY membranes is shown. A negative control with NP was included. *Lower panel:* Competitive binding quantification. The ratio of residual label on NC membranes over the total input was quantified and plotted against HS concentration. Plotted data are relative to Sc5c3 binding to HPV16L1 VLPs with no competitors and represent the mean and standard deviation of three experiments. NC, nitrocellulose; NY, nylon; NP, no protein.



SUPPLEMENTARY FIG. S2. Labeled Sc5c3 RNA was incubated with complete culture medium (DMEM +5% fetal bovine serum) or serum-free medium (DMEM) from cultured 293TT cells at 37°C for 20 min. The residual RNA was electrophoresed in denaturing 7M urea 8% polyacrylamide gels and analyzed in a Typhoon scanner. The arrow indicates the relative migration of the full Sc5c3 RNA. DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium.