



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis de la participación de la proteína E2 de HPV16 en la
regulación de la maquinaria epigenética**

T E S I S

Que presenta

KAREN IVETTE DE LEÓN BARRERA

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de tesis:

Dr. José Efraín Garrido Guerrero

Ciudad de México

Noviembre, 2019

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Biología Molecular y Celular del Cáncer (Laboratorio 1) del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. José Efraín Garrido Guerrero y con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante los fondos del proyecto CB-256514.

Durante mi estancia en la maestría conté con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 851212, apoyo que se agradece profundamente.

Agradezco a la Dra. Dulce María Delgadillo Álvarez, de la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica, de los Laboratorios Nacionales de Servicios Experimentales (LaNSE) del CINVESTAV-IPN, por el apoyo y la asesoría técnica brindados para la realización de los experimentos de Disrupción de Cromatina, requeridos para los ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP), reportados en el presente trabajo.

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por brindarme la oportunidad de realizar una maestría de una calidad tan buena y en especial al Departamento de Genética y Biología Molecular.

Al Dr. J. Efraín Garrido Guerrero por todo el apoyo y la confianza que me dio durante mi estancia en el laboratorio, por todas las enseñanzas y por siempre motivarme a ser mejor estudiante.

Al auxiliar del laboratorio el Biol. Pedro Chávez Olmos por su asesoramiento y apoyo en los aspectos de biología molecular.

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega por formar parte de mi comité tutorial, por el tiempo dedicado a la revisión y por las contribuciones a esta tesis.

Al Dr. Glustein Pozo Molina por formar parte de mi comité tutorial, por el tiempo dedicado a la revisión y por su asesoramiento en algunas técnicas de biología molecular.

A todos mis compañeros del Laboratorio 1, Brenda, Edgar, Mariana, Daniela y Ángeles por el agradable ambiente de trabajo que brindan.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco a mi familia por todo el apoyo brindado durante esta etapa, a Teresita por ser el pilar de la familia, por el amor y la gran educación que me diste, todo esto es por ti mamá. A Alex por siempre motivarme a ser la mejor en todo lo que me propusiera. A Axel por siempre apoyarme, cuidarme y darme cariño (a su manera).

A mis abuelitos, Pablito y Chabe porque son una inspiración para mí. A Lupita y Héctor porque me enseñaron tanto y forman parte de lo que soy ahora.

Te agradezco Ale, por todo el apoyo y amor incondicional que me has dado, porque también me inspiras a mejorar siempre.

A mis amigos que siempre han estado ahí, Osvaldo, Maru, Eli y Alex porque me han ayudado a llevar de la mejor manera todos los momentos difíciles.

Y a los grandes amigos que conocí en esta etapa, Maritere, David, Brenda, Edgar y Mariana porque sé que seguiremos ahí para siempre.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS	I
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	III
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
4. INTRODUCCIÓN	5
3.1 EL EPITELIO ESCAMOSO ESTRATIFICADO	5
3.2 ETAPAS DE LA DIFERENCIACIÓN EPIDÉRMICA	6
3.3 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	7
3.4 CICLO VIRAL	9
3.5 PROTEÍNA VIRAL E2	11
3.6 FUNCIONES DE LA PROTEÍNA E2	13
3.7 EPIGENÉTICA	17
6. ANTECEDENTES	22
7. JUSTIFICACIÓN	29
9. HIPÓTESIS	30
10. OBJETIVO GENERAL	30
11. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
13. METODOLOGÍA	31
9.1 CULTIVO CELULAR	31
9.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE E2	31
9.3 EXTRACCIÓN DE RNA Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN	33
9.4 WESTERN BLOT	34
9.5 INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA	35
9.6 ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL DNA	39
15. RESULTADOS	42
10.1 LA PROTEÍNA E2 REPRIME LA EXPRESIÓN DE COMPONENTES DE LA MAQUINARIA EPIGENÉTICA	42
10.2 EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE E2 SOBRE LA ABUNDANCIA DE LAS MODIFICACIONES H3K4ME3 Y H3K27ME3	

10.3	EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DE E2 SOBRE LA METILACIÓN DE ISLAS CpG PRESENTES EN EL GEN P16.....	49
17.	DISCUSIÓN	53
11.1	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COMPONENTES DE LA MAQUINARIA EPIGENÉTICA	53
11.2	EFFECTO BIOLÓGICO DE LA REPRESIÓN DE COMPONENTES DE LA MAQUINARIA EPIGENÉTICA	55
11.3	MODIFICACIÓN EN LA ABUNDANCIA DE LAS MARCAS EN HISTONAS H3K4ME3 Y H3K27ME3	57
11.4	EFFECTO BIOLÓGICO DE LA ALTERACIÓN DE LAS MODIFICACIONES EN HISTONAS H3K4ME3 Y H3K27ME3 EN EL GEN JUNB.....	58
11.5	REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE P16	59
19.	CONCLUSIONES	62
20.	PERSPECTIVAS	63
21.	BIBLIOGRAFÍA.....	64

1. RESUMEN

E2 es una proteína de gran relevancia en el ciclo de vida de los papilomavirus ya que puede realizar diversas funciones que afectan directamente a los genes o proteínas virales, también se ha reportado su interacción con proteínas celulares, así como su capacidad de modificar la expresión de un gran número de genes celulares. A nivel transcripcional, la regulación de estos genes ocurre por la interacción de E2 con factores transcripcionales, sin embargo, estas interacciones parecen no ser las únicas que permiten la represión o activación de genes. También se ha reportado la interacción de E2 con proteínas que forman parte de complejos remodeladores de cromatina, por lo que nosotros propusimos evaluar si E2 puede participar en la regulación epigenética. Nos enfocamos en dos mecanismos de regulación epigenética, la modificación de histonas y la metilación del DNA. La evaluación de la expresión de componentes de la maquinaria epigenética permitió detectar que E2 reprime la expresión de la metiltransferasa de histonas EZH2, la acetiltransferasa de histonas KAT2A y la metiltransferasa de DNA DNMT3B; cada uno de estos genes involucrado en una modificación epigenética distinta. Adicionalmente, evaluamos la abundancia de las marcas H3K4me3 y H3K27me3 en histonas de los genes JunB y p16, cuya expresión se modifica en células que expresan E2. JunB presentó cambios en las dos marcas evaluadas, la H3K4me3 disminuyó, aunque no significativamente, mientras que la marca H3K27me3 aumentó notoriamente; resultados que concordaron con el estado transcripcional del gen. En el caso de p16 se observó también una disminución de la marca H3K4me3, mientras que la abundancia de H3K27me3 no se modificó.

Los resultados de expresión de algunos componentes de la maquinaria y de la abundancia en las modificaciones de histonas fortalece la hipótesis de que

E2 pudiera estar modificando algunos de los mecanismos de regulación epigenética.

Finalmente, la evaluación del porcentaje de metilación en 37 sitios CpG cercanos al promotor del gen p16, permitió detectar que un gran número de estos sitios se encuentra hipermetilado en todas las líneas celulares evaluadas, independientemente de la presencia de E2, lo que nos llevó a concluir que esta región rica en CpG no es la responsable de los cambios observados en su expresión en presencia de E2 de HPV16.

2. ABSTRACT

E2 is a protein of great relevance in the life cycle of papillomaviruses since it has various functions that directly affect viral genes or proteins, its interaction with cellular proteins has also been reported, as well as its ability to modify the expression of many cellular genes. At a transcriptional level, the regulation of these genes occurs by the interaction between E2 and transcriptional factors, however, the repression or activation of these genes is not only caused by these interactions. There are some reports that show that E2 also interacts with proteins that are part of chromatin remodeling complexes, so in this work we proposed to evaluate the participation of E2 in the epigenetic regulation. We focused on two mechanisms of epigenetic regulation, histone modification and DNA methylation. The evaluation of the expression of genes components of the epigenetic machinery, suggests that E2 represses the expression of histone methyltransferase EZH2, histone acetyltransferase KAT2A and DNA methyltransferase DNMT3B; each of these genes involved in a different epigenetic modification. Additionally, we evaluated the abundance of the H3K4me3 and H3K27me3 marks in histones of the JunB and p16 genes, whose expression is modified in cells expressing E2. JunB presented changes in the two evaluated marks, the H3K4me3 decreased, although not significantly, while the H3K27me3 mark increased markedly. These results correlate with the transcriptional state of the gene. In the case of p16, a decrease in the H3K4me3 mark was also observed, while the abundance of H3K27me3 was not modified.

The results of the expression of some components of the machinery and of the abundance in histone modifications strengthens the hypothesis that E2 could be modifying some of the mechanisms involved in epigenetic regulation.

Finally, the evaluation of the percentage of methylation in 37 CpG sites near the promoter of the p16 gene, allowed to detect that a large number of these

sites are hypermethylated in all the cell lines evaluated, regardless of the presence of E2, which led us to conclude that this region rich in CpG is not responsible for the changes observed in its expression in the presence of HPV16 E2.

4. INTRODUCCIÓN

3.1 El epitelio escamoso estratificado

Un epitelio es una lámina de células que recubren el lumen de un órgano o la superficie de un órgano. Es un tejido avascular, con una gran cantidad de células. Los epitelios tienen la función de proteger las estructuras subyacentes, ayudan en la absorción, secreción, transporte de superficie, y recepción sensorial. Cada epitelio se clasifica de acuerdo con el número de capas celulares y la forma de las células en la capa superficial (Eurell, 2004).

Un epitelio escamoso estratificado es generado por queratinocitos mediante un proceso de diferenciación regulado estrechamente, llamado diferenciación terminal epidérmica o cornificación (Pasquariello, Oddi, Malaponti, & Maccarrone, 2009), y está formado de varias capas que contienen células con diferentes características morfológicas. Las capas del epitelio pueden ser subdivididas en diferentes clases, con relación a su etapa de maduración: basal (estrato cilíndrico), parabasal (estrato espinoso profundo), intermedio (estrato espinoso superficial), y superficial (estrato corneo) (Walker, Brown, Tidy, & Smallwood, 2003). Los cambios morfológicos que ocurren durante la estratificación epidérmica se asocian con modificaciones en la expresión de marcadores de diferenciación como puede verse en la **Figura 1** donde se muestran las diferentes capas, así como algunos de los marcadores característicos de cada una.

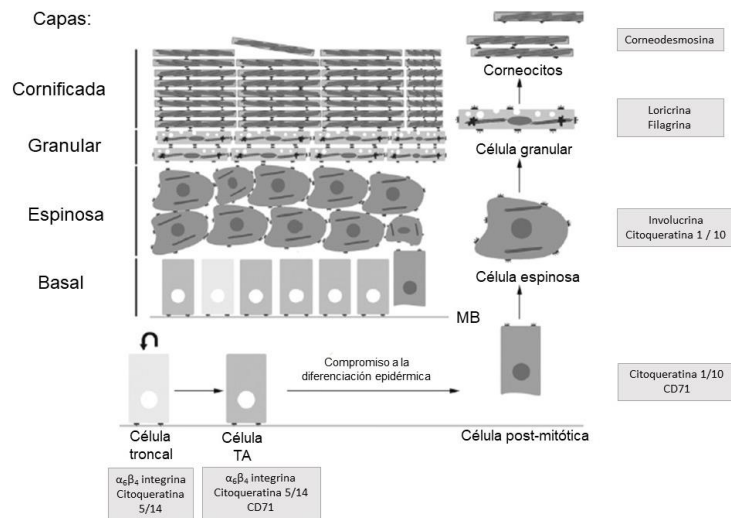


Figura 1. Diferenciación del epitelio escamoso estratificado. En la capa basal residen las células troncales epidérmicas que pueden autorrenovarse, para dar origen a otras células troncales, además de generar células transitoriamente amplificadas (TA). Después de un número limitado de divisiones las células TA, dan origen a células postmitóticas. Las células TA se desprenden de la membrana basal (BM) e inician su diferenciación. Las células migran conforme ocurre su diferenciación dando origen a las capas suprabasales: espinosa, granular y cornificada. Modificado de Pasquariello y cols., 2009

3.2 Etapas de la diferenciación epidérmica

Capa basal. Las células troncales del epitelio son escasas, residen en la capa basal proliferativa, son relativamente indiferenciadas, tienen un gran potencial proliferativo, y rara vez ciclan. Las células troncales dan origen a células transitoriamente amplificadas (TA). Comparadas con las células troncales, las células TA tienen potencial proliferativo limitado y probablemente se encuentran limitadas a continuar con el programa de diferenciación epidérmica. Sin embargo, se dividen rápidamente, proveyendo células que están comprometidas a diferenciación terminal, llamadas células postmitóticas. Estas tres subpoblaciones de la capa basal pueden ser distinguidas con base en sus diferentes localizaciones, potencial mitótico, y propiedades adhesivas. El citoesqueleto de los queratinocitos indiferenciados en la capa basal está formado principalmente por una red relativamente

dispersa de queratinas, las citoqueratinas 5 (K5) y 14 (K14), expresadas específicamente en los queratinocitos basales.

Capa espinosa. Después de un número limitado de divisiones mitóticas, nuevas células basales salen del ciclo celular y se comprometen a diferenciación. La primera consecuencia de la ejecución de este programa es que proteínas de adhesión como integrinas, son reprimidas y las células postmitóticas desensamblan sus contactos célula-matriz para moverse hacia la capa espinosa. El compromiso a diferenciación terminal es definido por la supresión de la expresión de K5 y K14, junto con la síntesis de las queratinas K1 y K10.

Capa granular. La capa espinosa es seguida por la capa granular, caracterizada por los gránulos que aparecen en las células en esta etapa de la diferenciación epidérmica. Se observan en ella dos tipos de gránulos: gránulos queratohialinos y cuerpos lamelares, formados principalmente por profilagrina que es una proteína involucrada en la agrupación de tonofilamentos.

Capa cornificada. Conforme las células llegan a la capa cornificada superior, entran en una fase destructiva, similar a la apoptosis, volviéndose metabólicamente inertes, estas células son llamadas corneocitos. En este punto, secretan bicapas de lípidos y pierden sus organelos citoplasmáticos, incluyendo el núcleo. Finalmente, se desprenden de la superficie y son continuamente reemplazadas por células del interior (Pasquariello, Oddi, Malaponti, & Maccarrone, 2009).

3.3 Virus del Papiloma Humano

Los Papilomavirus son virus pequeños, no envueltos, con DNA de doble cadena circular que infectan epitelios cutáneos y de mucosas en una amplia

variedad de vertebrados superiores de manera especie-específica (Doorbar, y otros, 2012). El genoma (**Figura 2**) de los papilomavirus contiene aproximadamente 8,000 pares de bases (pb), las cuales contienen ocho o nueve marcos de lectura abierta (ORFs, del inglés *open reading frames*).

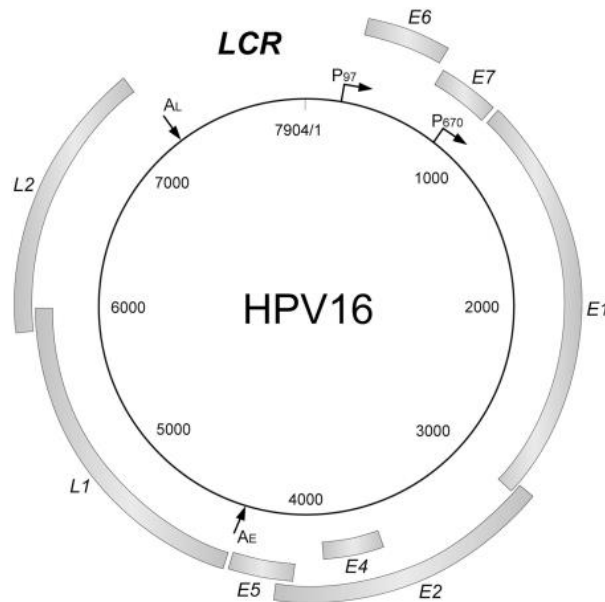


Figura 2. Organización del genoma de HPV tipo 16. Contiene 6 proteínas no estructurales (E1, E2, E4, E5, E6, E7), dos estructurales (L1 y L2) y una región larga de control (LCR). Los promotores principales y las señales de poliadenilación son indicadas (P97, P670, AE, AL). Tomado de (Kajitani, Satsuka, Kawate, & Sakai, 2012).

Los papilomavirus humanos (HPVs, del inglés *human papillomaviruses*) están agrupados filogenéticamente en cinco géneros, alfa, beta, gamma, mu y nu, y además se dividen en especies. Los alfa papilomavirus contienen virus que infectan epitelios de mucosas, algunos de los cuales son considerados de alto riesgo y otros de bajo riesgo de acuerdo con su asociación con el desarrollo de cáncer. Los HPVs de bajo riesgo pueden causar lesiones cutáneas, y otros solo causan infecciones cutáneas benignas. Los HPVs de alto riesgo han sido asociados a la etiología de cáncer anogenital y orofaríngeo (Galloway & Laimins, 2015).

Los ORFs individuales dentro del genoma viral se designan como tempranos o tardíos. A pesar de la variación en el tamaño y número de los ORFs, todos los papilomavirus contienen genes centrales bien conservados, involucrados en la replicación (E1 y E2) y empaquetamiento (L1 y L2) con una gran diversidad en los genes restantes.

El gen E1 codifica una helicasa de DNA necesaria para la replicación y amplificación del genoma viral. El gen E2 codifica para una proteína que puede unirse a secuencias específicas en el genoma viral y celular, y funciona en transcripción viral, replicación, y partición del genoma.

Los genes E6 y E7 pueden ser regulados a nivel transcripcional por E2, y participan en dirigir la entrada al ciclo celular en todos los tipos de HPVs para permitir la amplificación del genoma viral en las capas intermedias del epitelio, y en la inhibición de algunos eventos de inmunidad innata.

El ORF E5 está involucrado en la evasión inmune y en optimizar la eficiencia de la amplificación del genoma. La proteína E4 participa en el escape del virus de la superficie epitelial; muestra considerable heterogeneidad de secuencia entre tipos, lo cual refleja los diferentes tropismos y rutas de transmisión de los diferentes papilomavirus.

La región larga control (LCR, del inglés *long control region*) de los papilomavirus está localizada entre el final de L1 y el inicio de la región temprana; contiene elementos promotores, sitios de unión a factores de transcripción y el origen de replicación viral (Doorbar, Egawa, Griffin, Kranjec, & Murakami, 2016).

3.4 Ciclo viral

Los papilomavirus infectan exclusivamente epitelios escamosos estratificados (**Figura 3**) y su replicación es dependiente de la diferenciación de la célula

hospedera infectada y de proteínas de replicación celular (Galloway & Laimins, 2015). La infección requiere del acceso de partículas virales a la lámina basal, donde infectan células epiteliales (entre ellas troncales) que están localizadas en la capa basal. En estas células y en su progenie, conocida como células transitoriamente amplificadas, se replica el DNA viral manteniéndose como episoma en un bajo número de copias usando dos proteínas no estructurales virales, E1 y E2, y la maquinaria de replicación celular.

Las proteínas E6 y E7 en la mayoría de los tipos de HPV tienen la función clave de estimular el reingreso al ciclo celular en las capas medias del epitelio con la finalidad de permitir la amplificación del genoma. La expresión de E6 y E7 en estas capas permite a las células infectadas reingresar a la fase S del ciclo, lo que permite el aumento en el número de copias del genoma viral. También es necesaria la expresión de las proteínas de replicación E1 y E2, las cuales incrementan cuando se regula positivamente el promotor tardío de HPV.

Además, de las proteínas E1 y E2, se piensa que las proteínas E4 y E5 contribuyen indirectamente al éxito en la amplificación del genoma al modificar el ambiente celular. Se cree que E5 posee una capacidad de formar poros en las membranas e interferir con la apoptosis y el tráfico intracelular de vesículas endocíticas. La proteína E4, por otro lado, se acumula en altos niveles en la célula durante la síntesis viral, probablemente permitiendo la liberación de partículas virales (Doorbar, y otros, 2012).

La terminación del ciclo de vida de HPV finalmente involucra la expresión de la proteína menor de la cubierta (L2), la salida de la célula del ciclo celular, y la expresión de la proteína mayor de la cubierta L1 para permitir el empaquetamiento del genoma (Doorbar, Egawa, Griffin, Kranjec, & Murakami, 2016).

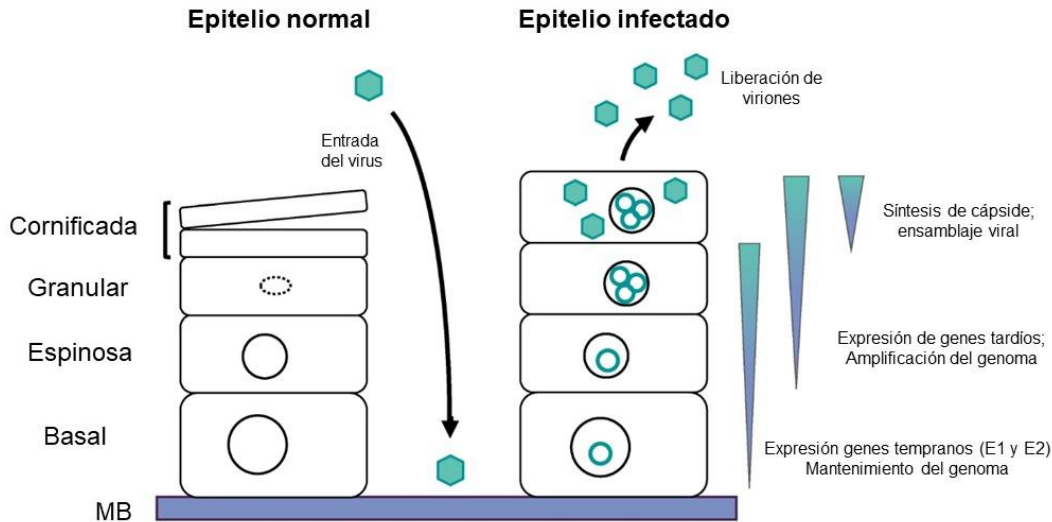


Figura 3. Ciclo de vida de los papilomavirus humanos. La infección inicia cuando el virus ingresa a las células de la capa basal a través de una micro lesión en el tejido. El genoma del virus se mantiene como episoma en el núcleo de las células infectadas en un bajo número de copias, cuando las células se dividen y migran a las capas suprabasales la expresión de genes virales (E6 y E7) permite que permanezcan activas en el ciclo celular y el genoma viral se amplifica. La expresión de genes tardíos y ensamblaje de viriones ocurre en las capas superiores del epitelio. Modificado de (*Spriggs & Laimins, 2017*).

3.5 Proteína viral E2

Como se mencionó anteriormente, el gen E2 es uno de los mejor conservados en todos los papilomavirus, éste codifica para una proteína (**Figura 4**) que contiene de 350 a 500 aminoácidos, dependiendo del tipo viral, que forman dos dominios modulares conservados, un dominio N-terminal de 200 aminoácidos llamado TAD (del inglés *TransActivation Domain*), y un dominio C-terminal de 100 aminoácidos llamado DBD (del inglés *DNA Binding Domain*). Los dos dominios están separados por una región bisagra no estructurada, no conservada y de longitud variable entre los diferentes genotipos de HPV (Muller & Demeret, 2012).

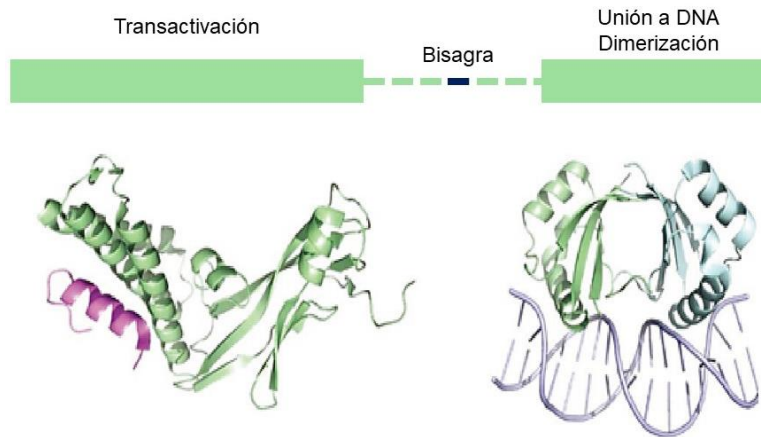


Figura 4. Estructura de la proteína E2 de papilomavirus. Se muestran los dos dominios principales de la proteína: el dominio de transactivación (E2 de HPV16, archivo pdb 2NNU) y el dominio de unión a DNA (E2 de HPV tipo 18, archivo pdb 1JJ4), en lila se observa el DNA al que se encuentra unido. Se muestra una región bisagra en la representación y en azul se resalta la señal de localización nuclear. Modificada de McBride & Jang, 2013.

Los 200 aminoácidos del dominio N-terminal de la proteína E2 se pliegan en un dominio estructural conservado. Para HPV tipo 16 (HPV16), la mitad del dominio N-terminal (N1: residuos 1-91) está compuesta por tres hélices alfa plegadas de manera antiparalela en forma de haz; se ha demostrado que dichas estructuras son importantes para la función de activación de transactivadores eucariontes (McBride, Romanczuk, & Howley, 1991). La mitad C-terminal (N2:110-201) está compuesta principalmente de hojas beta. La región entre N1 y N2 (residuos 93-109) llamada “fulcro” consiste en una hélice de dos giros.

Por otro lado, un dominio conservado C-terminal (de aproximadamente 85-100 aminoácidos) comprende el dominio de unión a DNA. El dominio de unión a DNA también participa en la formación de dímeros de la proteína E2. La estructura de este dominio en la proteína E2 de BPV1 (del inglés *bovine papillomavirus type 1*) es de ocho cadenas, en beta barril antiparalelo, con dos alfa hélices en la superficie del barril que comprenden la superficie de reconocimiento de DNA.

La región bisagra de la proteína E2 está codificada por una región variable de los genomas de papilomavirus que se superpone con el ORF E4. Esta región no es requerida para las funciones básicas transcripcionales y de replicación de E2, se piensa que se requiere un espaciador para evitar impedimentos estéricos entre los dominios. En los alfa papilomavirus, un dominio altamente conservado KRXR promueve en las proteínas E2 su localización nuclear y asociación con la matriz nuclear (McBride A. , 2013).

3.6 Funciones de la proteína E2

Unión a DNA

La proteína E2 es capaz de unirse como dímero a secuencias palindrómicas específicas en el DNA (ACCN₆GGT o más rigurosamente ACCGN₄CGGT), denominadas sitios de unión de E2 (E2BS, del inglés *E2 binding sites*). Estas secuencias se encuentran repetidas en los genomas de papilomavirus especialmente en la LCR (Muller & Demeret, 2012).

El número de nucleótidos espaciadores (N) generalmente no varía, pero las proteínas E2 de los alfa papilomavirus se unen más fácilmente a los sitios con espaciadores ricos en A-T, mientras que no existe una preferencia aparente por E2 de BPV-1 (McBride A. , 2013).

Los puntos de contacto precisos de las proteínas E2 en el motivo ACCN₆GGT han sido determinados. La proteína contacta residuos de guanosina en cualquier hebra del motivo, los cuales se predice están presentes en la misma cara de la hélice de DNA. Los dinucleótidos no conservados y nucleótidos fuera del sitio de unión determinan la afinidad por la proteína. En cuanto al dominio DBD de la proteína E2, no se han reportado motivos consenso de unión al DNA; sin embargo, algunas proteínas E2 contienen varios residuos de leucina espaciados por intervalos de siete aminoácidos, similar a la

estructura de dimerización “cremallera de leucina” (McBride, Romanczuk, & Howley, 1991).

Papel en procesos virales

En el genoma de los HPVs que infectan mucosas se encuentran cuatro sitios E2BS, dos próximos al promotor viral temprano, el tercero localizado en el origen de replicación de DNA, y el cuarto en la región *enhancer* (Graham, 2016). Se ha mostrado que E2 es capaz de regular la transcripción de genes virales, pudiendo funcionar como activador transcripcional a bajas concentraciones y como represor transcripcional a altas concentraciones, lo cual probablemente ocurre debido a la unión diferencial de los cuatro sitios E2BS dentro del promotor (Grm, Massimi, Gammoh, & Banks, 2005). La represión es atribuida a obstrucción que evita el reconocimiento de la proteína de unión al motivo TATA (TBP, del inglés *TATA-binding protein*) o la proteína Sp1 en experimentos realizados in vitro con la proteína E2 de BPV-1. Alternativamente, la represión puede ser causada por cambios conformacionales en el DNA debidos a la unión de E2 (Dong, Broker, & Chow, 1994).

E2 también participa en la iniciación de la replicación del DNA viral acarreando a la helicasa E1 al origen de replicación. E1 es la proteína primaria en la replicación, pero E2 potencia y soporta las funciones de E1.

Por otro lado, el mantenimiento persistente y estable de los replicones del genoma viral requiere la presencia de sitios de unión de E2 en *cis* al origen de replicación. La proteína E2 acopla el genoma viral a través de esos sitios al genoma del hospedero en mitosis para facilitar la retención, mantenimiento y segregación del genoma viral. Uno de los blancos de acoplamiento mejor estudiado en los cromosomas mitóticos es la proteína adaptadora de cromatina BRD4.

En eventos tardíos del ciclo viral E2 también está involucrado, pues se sabe que interactúa con la proteína menor de cápside L2 en los cuerpos nucleares ND10, una asociación que puede ser importante para el establecimiento temprano de la infección y el potenciamiento del empaquetamiento viral (McBride A. , 2013).

Interacción con proteínas celulares

La proteína E2 tiene múltiples papeles en el ciclo viral, incluyendo la regulación transcripcional de la expresión de genes virales. Esta actividad es realizada mediante el reconocimiento de los sitios de unión a DNA en promotores dependientes de E2, pero también por la interacción con proteínas celulares que modulan su actividad, potenciando o reprimiendo la transcripción dependiente de E2 (Centeno, Ramírez-Salazar, García-Villa, Gariglio, & Garrido, 2008).

Como se muestra en la **Figura 5a** las proteínas celulares que se asocian con E2 se ubican en varias categorías funcionales que incluyen regulación transcripcional, procesamiento de RNA, transporte de proteínas, vía de ubiquitina, ciclo celular, estructura y fraccionamiento de cromosomas, replicación y reparación del DNA y apoptosis (McBride A. , 2013).

Un número significativo de proteínas que son blanco de E2 se encuentran en la categoría de regulación de la transcripción (**Figura 5b**), corroborando el papel prominente de E2 como factor de transcripción (Muller, y otros, 2012). Las interacciones reportadas de E2 abarcan un espectro amplio de blancos, desde factores transcripcionales basales hasta factores relacionados con la cromatina.

TFIID es un componente esencial del complejo de iniciación de la transcripción, y está compuesto de TBP y TAFs (del inglés *TBP-associated factors*). Se han detectado interacciones de E2 con factores basales de la

transcripción como TAF1, TBP y GTF2B; pero también con factores regulatorios como SP1, HOXC9, C/EBP, así como coactivadores como TMF, sugiriendo que la regulación transcripcional mediada por E2 depende en gran medida de la modulación de la formación del complejo de iniciación de la transcripción.

Por otro lado, existen blancos de E2 que actúan a nivel de reorganización de la cromatina para regular la transcripción. Uno de los compañeros de E2 mejor caracterizados es BRD4, que es una proteína capaz de unirse a histonas acetiladas que estimula la transcripción de promotores dependientes de la RNA polimerasa II (Muller & Demeret, 2012). Igualmente, se han reportado proteínas blanco de E2 que forman parte de complejos remodeladores de cromatina, como NuRD (CHD4, SMARCA5, MTA 1/2) y TRRAP/TIP60 (INO80, EP400, TRRAP) (Jang, Anderson, van Doorslaer, & McBride, 2015). El reporte de estas interacciones es interesante ya que se ha visto con anterioridad la asociación de estos complejos con la regulación de la expresión de genes virales tanto en citomegalovirus (Terhune, y otros, 2010) como en alfa papilomavirus (Smith, y otros, 2014). Cabe destacar que en los complejos remodeladores de cromatina antes mencionados se encuentran modificadores de histonas que se ha reportado interactúan con E2, como histona acetiltransferasas (INO80, p400, TRRAP, TIP60), deacetilasas (NCOR1/HDAC), desmetilasas (KDM1B) y metilasas (WDR5, WHSC y PRMT5); estas interacciones pueden ser importantes en las funciones realizadas por E2 en el ciclo viral (Jang, Anderson, van Doorslaer, & McBride, 2015).

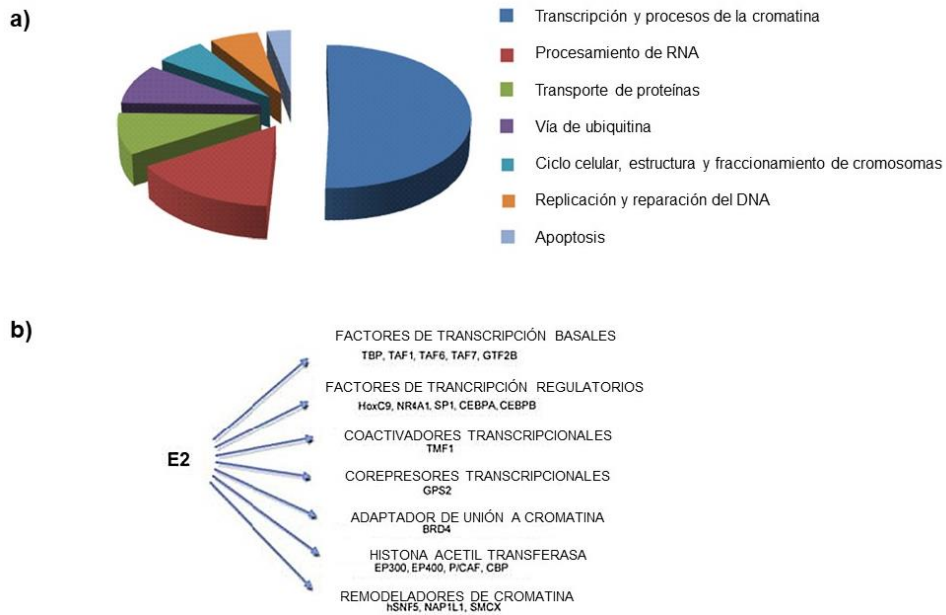


Figura 5. Proteínas celulares asociadas a E2. (a) Categorías funcionales de las proteínas asociadas con E2 (Modificada de McBride, 2013). **(b)** Compañeros de interacción de E2 relacionados con la regulación de transcripción o factores de cromatina (Modificada de Muller & Demeret, 2012).

3.7 Epigenética.

La epigenética es definida como el estudio de cambios heredables en la expresión de genes sin que se alteren las secuencias de DNA. Los patrones epigenéticos juegan un papel importante en varios procesos biológicos incluyendo el desarrollo embrionario, la impronta genética y la inactivación del cromosoma X. La disrupción de dichos procesos puede causar una variedad de patologías.

Los procesos claves responsables de la regulación epigenética son la metilación de DNA, la modificación de la cromatina (alteraciones covalentes en los núcleos de histonas), el posicionamiento de nucleosomas, y la regulación postranscripcional mediante RNAs no codificantes (Kanwal, Gupta, & Gupta, 2015).

La metilación de DNA involucra la adición de un grupo metilo en el quinto carbón de un nucleótido de citosina y ocurre predominantemente en el

contexto de un dinucleótido CpG (Rivera & Bennett, 2010). Las regiones ricas en CpG son conocidas como islas CpG (CGIs, del inglés *CpG islands*) y se encuentran en las regiones 5' regulatorias de más del 50% de los genes humanos y generalmente no están metiladas en células normales. La metilación en estas regiones es generalmente represiva por que previene la unión de factores de transcripción o la facilita la unión de proteínas de unión a CpG metiladas, lo cual previene también la unión de factores de transcripción.

La metilación de DNA es mediada por DNA metiltransferasas (DNMT1, DNMT3A y DNMT3B, DNMT3L) en eucariontes. DNMT1 es responsable del mantenimiento de patrones de metilación durante la replicación. DNMT3A y DNMT3B realizan la metilación de *novo* (Rivera & Bennett, 2010) y aunque estas proteínas son codificadas en distintos *loci*, la disposición de sus dominios es similar y su función biológica parece estar parcialmente superpuesta al menos durante la embriogénesis temprana (Chédin, 2011).

Por otro lado, las histonas pueden ser modificadas postraduccionalmente de múltiples formas con la finalidad de remodelar la cromatina, incluyendo fosforilación, ubiquitinación, acetilación, y metilación.

De las modificaciones descritas en histonas, la acetilación de histonas está asociada de manera más consistente con la promoción de la transcripción (Handy, Castro, & Loscalzo, 2011). Estas modificaciones son altamente dinámicas y están reguladas por dos familias de enzimas con acciones opuestas, acetiltransferasas de histonas (HATs, del inglés *histone acetyltransferases*) y deacetilasas de histonas (HDACs, del inglés *histone deacetylases*).

Las HATs utilizan acetilCoA como cofactor y catalizan la transferencia de un grupo acetilo al grupo amino- ϵ en la cadena lateral de lisinas. Existen dos clases principales de HATs: las tipo A y las tipo B. Las tipo B se encuentra

altamente conservadas compartiendo homología de secuencia con scHat1. Las HATs tipo A pueden clasificarse en tres grupos dependiendo de la homología en su secuencia de aminoácidos y su estructura conformacional en las familias GNAT, MYST y CBP/p300.

Las enzimas HDAC contrarrestan el efecto de las HATs y revierten la acetilación de lisinas, por lo que las HDACs son considerados represores transcripcionales. Existen cuatro clases de HDAC: las clases I y II, contienen enzimas que están relacionadas más cercanamente a las proteínas de levadura scRpd3 y scHda1, respectivamente; la clase IV tiene un solo miembro, HDAC11, mientras la clase III contiene proteínas homólogas a scSir2 de levadura.

La metilación de histonas ocurre principalmente en las cadenas laterales de lisinas y argininas (Bannister & Kouzarides, 2011). Los patrones de metilación y sus efectos en transcripción son más complejos que la acetilación, algunos sitios son asociados con cromatina transcripcionalmente activa y algunos son represivos. En general, los estados H3K27me3 y H3K9me son asociados con silenciamiento, mientras que los estados H3K4me3 y H3K36me3 son modificaciones de activación transcripcional. La mayoría de las lisina-metiltransferasas tienen un dominio de homología con SET, una vasta familia de proteínas que se encuentra agrupada en siete subfamilias con base en sus similitudes estructurales.

Las enzimas capaces de desmetilar las cadenas laterales de lisinas, incluyen a la desmetilasa específica de lisinas 1 (LSD1, del inglés lysine-specific demethylase 1), la cual remueve mono- o di- metilaciones de H3K4. La trimetilación es removida por las desmetilasas que contienen el dominio Jumonji C (JmJc) (Handy, Castro, & Loscalzo, 2011).

La transición entre diferentes estados de la cromatina es dinámica y depende de un balance entre factores que sostienen el estado reprimido (por ejemplo, HDACs e histona metiltransferasa H3K9) y los que promueven un estado transcripcionalmente activo (por ejemplo, HATs e histona metiltransferasa de H3K4) (Jaenisch & Bird, 2003).

Uno de los sistemas más prominentes y enigmáticos de la regulación epigenética involucra a los componentes evolutivamente conservados del grupo Polycomb (PcG) y el grupo Trithorax (TrxG), los cuales actúan antagonicamente para orquestar la expresión de genes clave en la diferenciación celular y procesos de desarrollo.

La maquinaria PcG se divide en dos complejos principales: *Polycomb repressive complex 1* (PRC1) y *Polycomb repressive complex 2* (PRC2). Los complejos PRC1 se subdividen en el complejo canónico y no canónico, pero ambos comparten un núcleo de proteínas compuesto por RING1A y RING1B, las cuales tienen actividad ubiquitin ligasa E3 y llevan a cabo la metilación de la lisina 119 en la histona H2A, y en una de las seis proteínas del grupo Polycomb con dominio anillo-dedo (PCGF1-PCGF6). El complejo canónico PRC1 se ensambla alrededor del núcleo y es especificado por la presencia de una de las proteínas CBX 2,4, 6-8 (del inglés *chromobox protein*) que se une a H3K27me3 y a una proteína PHC1-3 (del inglés *Polyhomeotic homologous protein*). El complejo no canónico contiene además de las proteínas del núcleo, a la proteína KDM2B (histona desmetilasa específica de H3K36).

Por otro lado, el núcleo funcional del complejo PRC2 en mamíferos que es esencial para mediar la actividad de histona metiltransferasa está compuesto de una proteína EZH1 o EZH2 (del inglés *SET-domain containing histone methyltransferases enhancer of zeste*), la proteína EED (del inglés *embryonic ectoderm development*), SUZ12 (del inglés *suppressor of zeste*), y las proteínas RBBP4 y RBBP7 (Schuettengruber, Bourbon, Di Croce, & Cavalli,

2017). EZH2 es la subunidad catalítica, actuando como metiltransferasa de H3K27, que a su vez es reconocida por proteínas como EED y CBX, ésta última al interactuar con la trimetilación de la lisina 27 recluta al complejo PRC1 (Harikumar & Meshorer, 2015).

Los complejos TrxG que contrarrestan la represión mediada por las proteínas PcG son el complejo SWI/SNF y la familia COMPASS principalmente. En mamíferos existen dos complejos distintos del complejo SWI/SNF llamados BAF y PBAF, cuya función es regular la estructura de la cromatina en genes implicados en el ciclo celular, señalización y proliferación. Por otra parte, la familia COMPASS incluye enzimas modificadoras de histonas. El complejo SET1/COMPASS requiere de proteínas que forman el núcleo para poder realizar sus funciones, las cuales son WDR5, ASH2, RBBP5 y DPY30. Adicionalmente contiene las proteínas WDR82, CFP1 y en conjunto regulan la trimetilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4me3) (Schuettengruber, Bourbon, Di Croce, & Cavalli, 2017).

6. ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente la proteína E2 es crucial para la replicación del genoma de los papilomavirus, y para la regulación de genes virales; se conoce ampliamente su papel en estos procesos, sin embargo, no se conoce mucho sobre las funciones que realiza E2 dentro de la célula.

En los primeros estudios donde se analizó el efecto de la expresión de E2 en líneas celulares, se encontró que esta proteína llevaba a las células a muerte celular, como el reporte realizado por Desaintes y cols. (1999), quienes expresaron de manera ectópica la proteína E2 de HPV18 en la línea celular HeLa. Esta línea celular proviene de carcinoma cervical y se caracteriza por tener integrado el genoma del HPV tipo 18, pero carece de la expresión de E2 debido a la disrupción del gen durante el proceso de integración. La expresión ectópica de E2 indujo la acumulación de p53 silvestre debido a la inhibición parcial de la expresión del gen viral E6. El resultado de la acumulación de p53 fue el arresto del ciclo celular en la fase G1 y adicionalmente, alrededor del 20% de las células sufrieron apoptosis, aparentemente causada por un mecanismo independiente de p53, ya que la apoptosis ocurre entre las 20 y 24 h posteriores al inicio de la expresión de E2, tiempo en el que la actividad transcripcional de E2 aumenta alrededor de 100 veces mientras que la expresión de p53 es baja (Desaintes, Goyat, Garbay, Yaniv, & Thierry, 1999). De manera similar, la expresión de E2 de HPV16 en células SiHa, una línea celular proveniente de carcinoma cervical que contiene el genoma de HPV16, resultó en la inhibición del crecimiento celular, y en ausencia de factores de crecimiento, se observó iniciación de muerte celular por apoptosis. (Sanchez-Perez, Soriano, Clarke, & Gaston, 1997).

Como se menciona anteriormente, la función proapoptótica de E2 ocurre parcialmente debido a la represión transcripcional de los oncogenes virales (E6 y E7), sin embargo, se buscó conocer si E2 podía causar apoptosis

independientemente de la presencia de otros genes virales. Demeret y cols. (2003) estudiaron la inducción de apoptosis dada por E2 de HPV tipo 18 en células asociadas o no a HPV. La muerte celular se midió mediante un análisis de contenido de DNA por citometría de flujo y se usó a la fracción sub-2N como medida de apoptosis. En las líneas celulares asociadas con HPV (HeLa, HK18, SiHa y Caski) en donde se expresó E2 se observó la inducción de apoptosis (**Figura 6a**), mientras que en las líneas celulares negativas para HPV (C-33A, Saos-2, MCF7 y queratinocitos primarios) de igual manera se observó de manera sistemática apoptosis tras la expresión de E2, lo que indicó que la actividad proapoptótica de E2 es independiente de otras funciones virales (**Figura 6b**).

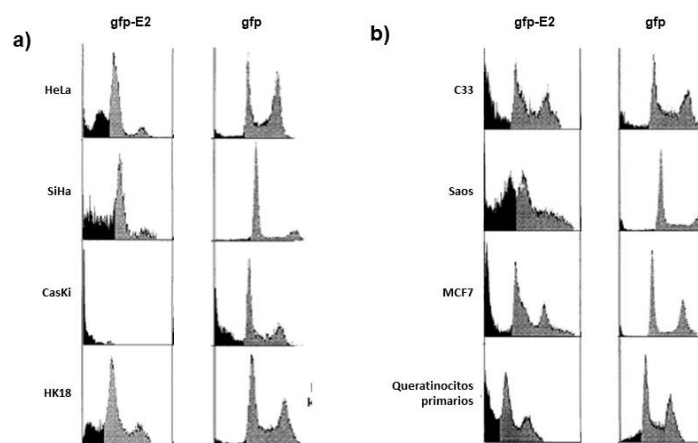


Figura 6. Susceptibilidad de diferentes líneas celulares a la actividad proapoptótica de E2. (a) Las gráficas muestran el análisis del contenido de DNA de una variedad de células provenientes de carcinoma celular infectadas con adenovirus gfp-E2 o gfp (control); las células se cosecharon 24-48 h después de la infección y se procesaron mediante citometría de flujo, la fracción de células con contenido de DNA sub-2N (se muestra en color negro) se tomó como medida de apoptosis. (b) Análisis del contenido de DNA de una variedad de células que no contienen secuencias de HPV infectadas con adenovirus gfp-E2 y gfp. Tomada de Demeret, y cols., 2003.

Posteriormente, se investigó si existía una relación entre los niveles de expresión de E2 y la inducción de muerte celular, para ello se infectó a la línea celular Saos-2 con cantidades crecientes de multiplicidad de infección de adenovirus gfp-E2, encontrando que la proteína E2 difícilmente se acumula en

las células debido a su alta inestabilidad. Además, los análisis de citometría de flujo confirmaron la existencia de un nivel de umbral de E2, a partir del cual la fracción de células sub-2N se empieza a acumular, es decir, que las células que expresan E2 arriba de tal límite son eliminadas por apoptosis (Demeret, Garcia-Carranca, & Thierry, 2003).

Los estudios mencionados previamente se centran en observar el efecto de la expresión de E2 en líneas celulares asociadas a HPV y como se menciona en el trabajo hecho por Demeret y cols.

(2003) los niveles de expresión de la proteína E2 superan un nivel de umbral que lleva a eliminación de las células vía apoptosis, por ello Burns y cols. (2010) se plantearon analizar el efecto de la expresión de E2 de HPV16 como ocurre en las células hospederas naturales durante la infección viral, es decir, a niveles que permiten el crecimiento celular. Para ello, transfectaron de manera estable con E2 de HPV16 células HaCaT, esta línea celular proviene de queratinocitos humanos y es competente para diferenciación celular y no contiene secuencias de HPV. Observaron que las células transducidas con E2 mostraron evidencia de una morfología diferenciada, caracterizada por la presencia células elongadas, células con morfología escamosa y colonias con múltiples capas, incluso cuando las células se mantuvieron en un medio libre de calcio. Asimismo, se examinó mediante inmunocitoquímica (**Figura 7**) la expresión de marcadores de diferenciación

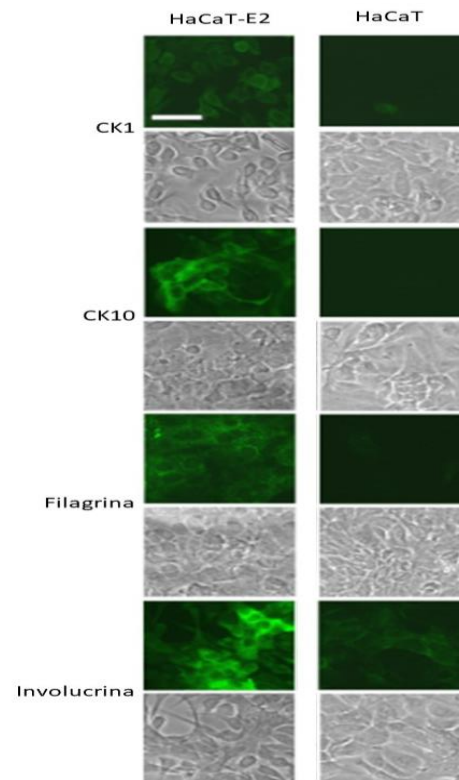


Figura 7. Inmunodetección de marcadores de diferenciación epidérmica en células HaCaT. La expresión de todos los marcadores fue más alta en las células transfectadas con E2, especialmente en áreas con morfología diferenciada. Tomada de Burns, y cols., 2010.

epidérmica. Las células transfectadas con E2 expresaron en niveles altos de los marcadores involucrina, filagrina y citoqueratinas 1 y 10, particularmente en áreas con morfología diferenciada. Las células transfectadas con un vector vacío no mostraron evidencia morfológica de diferenciación, ni expresión de los marcadores de diferenciación.

En el contexto del ciclo de vida del virus, estos resultados no son inesperados ya que, aunque el virus requiere que la célula se mantenga ciclando para que se pueda establecer la infección y se amplifique su genoma, también es necesario que la célula hospedera continúe con el proceso de diferenciación para permitir que el ciclo de vida sea completado (Burns, Walker, Schmitz, & Maitland, 2010).

Posteriormente, se buscó observar el efecto de la expresión de E2 en etapas tempranas de la diferenciación epitelial, debido a que E2 es uno de los genes que se expresa primero cuando inicia la infección viral en la capa basal del epitelio. Para ello, Domínguez-Catzín y cols. (2017) identificaron las subpoblaciones presentes en la capa basal del epitelio en la línea celular HaCaT mediante de la detección simultánea de los marcadores $\alpha 6$ -integrina y CD71 por citometría de flujo, de esta forma se detectaron las subpoblaciones de la capa basal epitelial, que corresponden a: células en proceso de diferenciación temprana $\alpha 6$ -integrinadim ($8.16 \pm 0.52\%$), células transitoriamente amplificadas $\alpha 6$ -integrinabri/CD71bri ($87.27 \pm 1.21\%$) y células progenitoras $\alpha 6$ -integrinabri/CD71dim ($1.16 \pm 0.08\%$).

Además, en esta misma línea celular expresaron establemente la proteína E2 de HPV16 y realizaron análisis de citometría de flujo para detectar las mismas subpoblaciones observadas en las células HaCaT silvestres. Los análisis mostraron cambios evidentes en la abundancia relativa de las tres subpoblaciones que constituyen a esta línea celular cuando se expresó E2 de HPV16. Se observó un incremento claro en las células diferenciadas

tempranas ($\alpha 6$ -integrinadim) pasando de un $8.16 \pm 0.52\%$ a $54 \pm 1.34\%$, mientras que la subpoblación de células progenitoras ($\alpha 6$ -integrinabri/CD71bri) disminuyó de $1.16 \pm 0.08\%$ a $0.55 \pm 0.06\%$ (**Figura 8**), sugiriendo que la expresión de E2 estimula la diferenciación temprana en la línea celular HaCaT. Para confirmar lo observado por citometría de flujo se analizaron los niveles relativos de citoqueratina 14 y citoqueratina 10, en la línea HaCaT-E2 se encontrándose un nivel considerablemente bajo de citoqueratina 14 y más del doble de expresión de citoqueratina 10, comparado con la línea HaCaT-wt, lo que reforzó el resultado obtenido por citometría de flujo (Domínguez-Catzín, y otros, 2017).

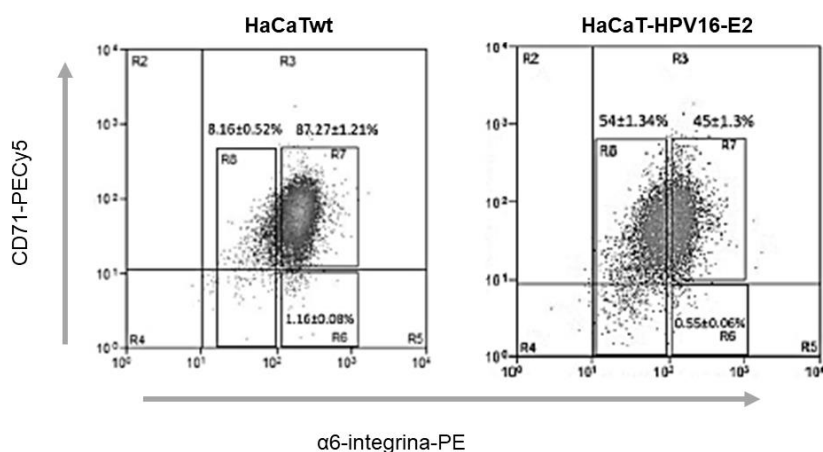


Figura 8. La expresión de E2 de HPV16 modifica el perfil de las subpoblaciones $\alpha 6$ -integrin-CD71 en la línea celular HaCaT. Las gráficas muestran el análisis representativo de citometría de flujo para la subpoblaciones $\alpha 6$ -integrin-CD71 en las células HaCaT que expresan E2. Tomada de Domínguez-Catzín, y cols., 2017.

Los antecedentes mencionados demuestran que la expresión de E2 afecta procesos celulares importantes como la proliferación y la muerte. Estos efectos son mediados principalmente por su interacción con p53 y posiblemente por su interacción con TAF1, ya que estas proteínas celulares regulan la expresión de varios genes que modulan el ciclo celular y la apoptosis; estas interacciones pueden tener consecuencias en la actividad de promotores particulares relacionados con estos procesos. Por otra parte, en el trabajo realizado por

Ramírez-Salazar y cols. (2011) se buscó identificar de una manera sistemática los procesos biológicos y genes celulares que son regulados por la proteína E2 de HPV16. Utilizando la línea celular C-33A, se estudiaron los cambios en los niveles de expresión de 10,000 transcritos humanos cuando E2 de HPV16 se expresa. El análisis de los datos obtenidos indicó que E2 de HPV16 activa la expresión de 581 genes e inhibe a 1048 genes. Este resultado sugiere que E2 tiene preferiblemente un efecto negativo en la expresión de genes celulares.

Con relación a las vías más afectadas por la expresión de E2, se encontró que la vía de WNT se encuentra en primer lugar, ya que 28 genes asociados con esta vía fueron reprimidos y 15 activados. De manera interesante, esta vía tiene un punto de convergencia de genes involucrados en la regulación de procesos celulares, que incluyen apoptosis, proliferación celular, y diferenciación.

Aunque no se descarta la posibilidad de que E2 regule la expresión de ciertos genes mediante interacción directa con sus promotores, el efecto global sugiere que estos cambios pueden ser consecuencia de la interacción de E2 con factores de transcripción celulares que tengan la capacidad de regular a un gran número de genes (Ramírez-Salazar, y otros, 2011).

Hasta ahora se desconoce el mecanismo preciso mediante el cual E2 puede regular la expresión de genes celulares, pudiendo deberse en parte a su unión con promotores específicos, así como a su interacción con factores de transcripción, coactivadores o correpresores. Por otro lado, en el trabajo realizado por Evans y cols. (2019) se sugiere a la metilación del DNA como otro mecanismo por el cual E2 puede modificar la expresión de genes. En este trabajo se realiza secuenciación de RNA, para detectar a los genes regulados por la proteína E2 en queratinocitos orales inmortalizados con la enzima telomerasa transcriptasa inversa (del inglés TERT), encontrando 167 genes

activados y 395 genes reprimidos en las células que expresaron E2. En dos de los genes reprimidos (IFIT1 y MX1) se analizó el efecto del fármaco 5-aza-2-deoxicitidina (que revierte la metilación del DNA) sobre su expresión. Cuando se dio el tratamiento con este fármaco, los niveles de mRNA de IFIT1 y MX1 mostraron un incremento en presencia de E2, sugiriendo que puede promover la metilación de ciertos genes (Evans, y otros, 2019); sin embargo, los autores destacan que puede haber otros mecanismos que lleven a la represión transcripcional, esto puede incluir la regulación epigenética en otros niveles, como puede ser la modificación o la remodelación de la cromatina.

7. JUSTIFICACIÓN

Como se ha mencionado la proteína E2 de papilomavirus se encuentra muy conservada dentro de los diferentes genotipos de estos virus, posiblemente debido a su gran importancia durante el ciclo viral, ya que las funciones que realiza pueden afectar directamente a las proteínas o genes virales. La expresión de esta proteína en diferentes tipos celulares afecta procesos complejos que incluyen la diferenciación, afectando también el perfil de expresión génica de las mismas.

Se sabe que E2 interactúa con proteínas celulares involucradas en varias categorías funcionales, destacando aquellas interacciones con proteínas que regulan la expresión génica, como factores de transcripción, remodeladores de cromatina y modificadores de histonas. Estas interacciones sugieren que E2 podría actuar también sobre procesos de regulación epigenética, lo que podría explicar cómo es que su expresión modifica de manera global la expresión génica en la célula. Por ello proponemos analizar el efecto que la expresión de E2 de HPV16 tiene sobre la función de la maquinaria epigenética. Entender esto nos permitiría conocer a mayor profundidad las funciones que E2 realiza y cómo se relacionan éstas con el ciclo viral.

9. HIPÓTESIS

La proteína E2 de HPV16 regula proteínas de la maquinaria epigenética modificando sus niveles de expresión y/o actividad biológica, afectando así el perfil de expresión génica celular.

10. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto que E2 de HPV16 tiene sobre la expresión y actividad de proteínas de la maquinaria epigenética, así como analizar el estado de algunas modificaciones epigenéticas en genes regulados por la proteína E2.

11. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar los niveles de expresión de genes involucrados en la regulación epigenética.
2. Analizar los niveles de expresión de proteínas que participan en la regulación epigenética.
3. Examinar el estado de las marcas de histonas H3K4me3 y H3K27me en los genes p16 y JunB.

13. METODOLOGÍA

9.1 Cultivo celular

Durante la realización del proyecto se utilizaron las líneas celulares, HaCaT-LacZ, HaCaT-E216 (clonas derivadas de HaCaT wt después de transducción lentiviral) y HEK293-T. La línea celular HaCaT-LacZ contiene un segmento de 250 pb del gen LacZ del operón Lac de *Escherichia coli*. La línea HaCaT-E216 por otro lado contiene el gen E2 de HPV16. Ambas cuentan con un cassette de resistencia a puromicina. Todas las líneas se cultivaron en placas con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino 10%, L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina y estreptomina 100 µl/ml. Además, se adicionó puromicina 0.35 µg/ml para la selección de las células. Las líneas celulares se mantuvieron en incubadora en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C.

9.2 Actividad biológica de E2

Los ensayos para medir la actividad biológica de E2 se realizaron de manera rutinaria cada cinco pasajes para confirmar la expresión y la funcionalidad de la proteína en la línea celular HaCaT-E216. Para ello se transfectó el vector pGL4.10-LCR-18 que contiene el gen reportero de luciferasa (*luc2*) regulado por la región larga de control del HPV tipo 18; esta región se caracteriza por tener sitios de unión de E2, por lo que al unirse E2 a estos sitios se espera observar la expresión del transcrito y detectar niveles de la proteína reportera luciferasa de luciérnaga.

Se sembraron células de las líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E216 en placas de 6 pozos (**Figura 9**) con 2 ml de medio DMEM suplementado; se incubaron 24 h a 37°C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda.

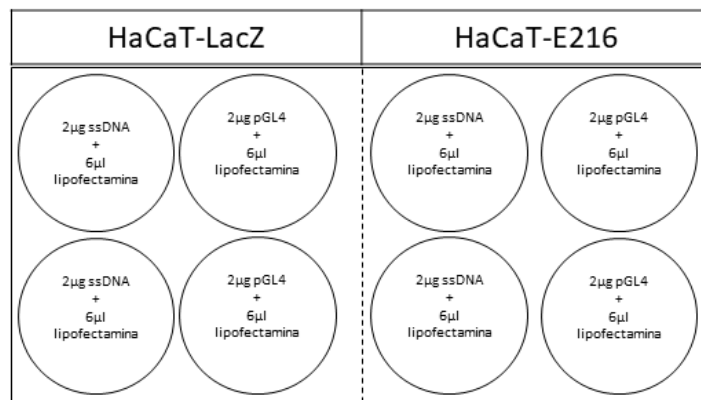


Figura 9. Protocolo de células sembradas para ensayo de actividad biológica

Después de 24 h, se lavaron las células con PBS 1X dos veces, se adicionó 1 ml de medio OptiMEM y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda. Se preparó la mezcla para transfectar etiquetando dos tubos con A y B: en el tubo A se mezclaron 20 μ l de DNA total (100 ng/ μ l) y 80 μ l de OptiMEM dejando incubar 5 min a temperatura ambiente, en el tubo B se colocaron 6 μ l de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 94 μ l de OptiMEM, se mezcló el contenido de ambos tubos y se incubó 45 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, se retiró el OptiMEM de cada pozo y se adicionaron 900 μ l de OptiMEM y 200 μ l de la mezcla de transfección; se dejó a las células 5 h a 37°C, 5% CO₂ y atmósfera húmeda con la mezcla y se retiró al pasar este tiempo para agregar 2ml de medio DMEM suplementado y se dejaron 48 h incubando a 37°C, 5% CO₂ y atmósfera húmeda.

Pasado este tiempo, se lavaron las monocapas celulares dos veces con PBS 1X, se adicionó 1 ml de PBS 1X y se cosecharon con un fragmento de hule (gendarme); se transfirieron a un tubo de 1.5 ml y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 1 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 200 μ l de Reporter Lysis 5X Buffer (Promega), se colocaron los tubos en hielo seco durante 5 min y a temperatura ambiente 5 min en dos ocasiones. Se

centrifugó a 13, 000 rpm durante 1 min, tomando el sobrenadante y desechando la pastilla.

En una placa de 96 pozos para luminómetro se colocaron 50 μ l de Reactivo de Ensayo de Luciferasa II (LAR II, Promega) por cada muestra y se agregaron 70 μ l de lisado proteico y se realizó la medición de actividad de luciferasa en el equipo Fluoroskan Ascent FL (Labsystems).

9.3 Extracción de RNA y análisis de expresión

Se purificó el RNA total de las líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E216 usando el kit Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research) para lo cual se siguieron las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el RNA se sintetizó cDNA utilizando 2 μ g de RNA, se preparó la reacción adicionando 1 μ l Oligo-dT (500 μ g/ml, Promega) se incubó durante 5 min a 70°C, posteriormente se incubó a 4° durante 5 min, se adicionaron 6 μ l de buffer M-MLV RT (5X, Promega), 5 μ l de dNTPs (25 mM), 0.6 μ l de RNAsin (40 u/ μ l), 1 μ l de enzima transcriptasa reversa M-MLV (1u/ μ l, Promega), se ajustó el volumen a 30 μ l con agua desionizada estéril y se incubó a 42°C durante 1.5 h.

Para evaluar la expresión de los genes se realizó PCR en tiempo real (qPCR). Se prepararon reacciones de la siguiente manera: 1.5 μ l de cDNA, 7.5 μ l de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Thermo Scientific), 0.2 μ l de oligonucleótido *forward* 10 μ M, 0.2 μ l de oligonucleótido *reverse* y se ajustó el volumen a 15 μ l con agua desionizada estéril. Las reacciones se realizaron en el equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El perfil térmico utilizado fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización a 95 °C 15 min, 40 ciclos de amplificación de 15 s a 95°C y 60 s a 60°C y una fase última donde se realiza un análisis de las curvas de disociación. Para la cuantificación relativa de expresión de los genes se utilizó el método comparativo $\Delta\Delta C_T$. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para los análisis de expresión

Gen blanco	Secuencia
β -2-microglobulina (control endógeno)	Fw 5' ACCCCCACTTGAAAAAGATGAGTA 3' Rv 5' ATGATGCTGCTTACATGTCTCGA 3'
TBP (control endógeno)	Fw 5' CGGCTGTTTAACTTCGCTTCC 3' Rv 5' TGGGTTATCTTCACACGCCAAG 3'
DNMT1	Fw 5' AGGCGGCTCAAAGATTTGGAA 3' Rv 5' GCAGAAATTCGTGCAAGAGATTC 3'
DNMT3A	Fw 5' TGCTTTCTGGAGTGTGCGT 3' Rv 5' TCTTCCTTAATGGCTGCCTG 3'
DNMT3B	Fw 5' GTGTGTAGCTTAGCAGACTGG 3' Rv 5' GGCAAGTTCTCCGAGGTCTCTG 3'
TET2	Fw 5' AAGCAAGATCCCAAGGAAGTT 3' Rv 5' GCAATGAGACTCCAGTTTC 3'
EZH2	Fw 5' TTGTTGGCGGAAGCGTGAAAATC 3' Rv 5' TCCCTAGTCCCGCGCAATGAGC 3'
EED	Fw 5' GTGTGCGATGGTTAGGCG 3' Rv 5' GTCACATTAGATTCACTGGGTTT 3'
SUZ12	Fw 5' GCATTGCCCTTGGTGTACTC 3' Rv 5' TGGTCCGTTGCGACTAAAA 3'
SETD1A	Fw 5' AGGTGTACCGCTATGATGGA 3' Rv 5' GCACGTTGTTCAATCAGCCTT 3'
HDAC1	Fw 5' GCTCCACATCAGTCCTTCC 3' Rv 5' GGTCGTCTTCGTCTCATC 3'
KAT2A	Fw 5' TGCAAGGCCAATGAAACCTG 3' Rv 5' AGCAGTCGGTTTATCTCATC 3'
p16	Fw 5' ATGGAGCCTTCGGCTGACT 3' Rv 5' CATCATCATGACCTGGATCG 3'

9.4 Western blot

Se obtuvieron lisados celulares totales de células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216 usando buffer RIPA Bolen modificado (MOPS-NaOH 20 mM pH 7.0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Nonidet P-40 1%, Deoxicolato de sodio 1%, SDS 1%) y cóctel de inhibidores de proteasas 1X (Roche Diagnostics). Las proteínas (30-100 μ g) fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 8% (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se usaron anticuerpos monoclonales específicos anti-EZH2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-137255), anti-GCN5 (Santa Cruz Biotechnology, sc-365321), anti-DNMT3B (Santa Cruz Biotechnology, sc-81252), anti-Lamina A/C (Santa Cruz Biotechnology, sc-517580) y anti- β -actina peroxidasa (Sigma-Aldrich, A3854) para la inmunodetección. Además, se

utilizó el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa anti-ratón IgG (H+L) AffiniPure (Jackson ImmunoResearch Laboratories). La detección quimioluminiscente se hizo con el sustrato SuperSignal West Pico (Thermo Scientific) y la cuantificación de las proteínas se realizó con el software Image J.

Para el caso de la detección de la proteína DNMT3B se obtuvieron lisados nucleares, para ello se colectaron 4×10^6 células de las líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E216, se lavaron con PBS 1X en dos ocasiones y se transfirieron a un tubo cónico de 1.5 ml, se centrifugaron a 3500 rpm durante 4 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 400 μ l de buffer A por cada 1×10^6 células (HEPES pH 7.9 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM), se incubó 15 min en hielo para permitir que las células se hincharan, se agregaron 25 μ l de Nonidet P-40 10% y se agitó en vórtex durante 10 s. Se centrifugó a 1200 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla que correspondía a la fracción nuclear se resuspendió en 50 μ l (por cada 1×10^6 células) de buffer de lisis (Tris-HCl pH 8.0 50 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, PMSF 1 mM, Complete 1X) y se lisaron los núcleos siguiendo 8 ciclos de incubación en hielo por 2 min y 10 s de agitación vigorosa en vórtex; finalmente se centrifugó durante a 12000 rpm durante 5 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -70°C hasta su uso. El procedimiento se realizó de la misma manera que con los lisados totales.

9.5 Inmunoprecipitación de la cromatina

Para este ensayo se utilizaron células de las líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E216. Un día antes de inmunoprecipitar se sembraron 3 cajas p60 con 1.2×10^6 células por cada línea celular, cada caja se procesó por separado para posteriormente inmunoprecipitar con un anticuerpo diferente cada una (anti-H3, anti-H3K4me3 y anti-H3K27) (**Figura 10**).

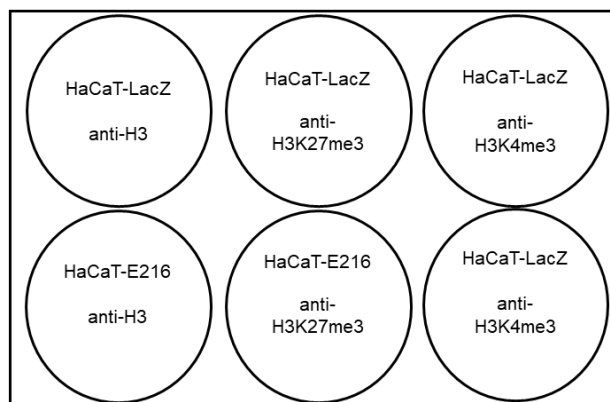


Figura 10. Protocolo de células sembradas para ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina

Después de 24 h de sembrar las células se retiró el medio de cultivo por aspiración y se lavó en dos ocasiones con PBS 1X. Se entrecruzó el DNA con las proteínas añadiendo 3 ml de medio DMEM sin suero y formaldehído a una concentración final de 1%; se incubó a 37 °C durante 13 minutos y se retiró el medio para lavar dos veces con PBS 1X frío con cóctel de inhibidores de proteasas 1X (Roche Diagnostics). Se despegó la monocapa con un gendarme y se transfirieron las células a un tubo cónico de 1.5 ml. Se centrifugó a 2000 rpm a 4°C por 4 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 300 µl de SDS lysis buffer (SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.1) con cóctel de inhibidores de proteasas 1X (Roche Diagnostics), se incubó 10 min en hielo y se sonicó la muestra para fragmentar el DNA genómico usando el sonicador Bioruptor Pico (Diagenode, Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales, Unidad de Genómica, Proteómica y metabolómica, CINVESTAV) con un programa de 10 ciclos de 30 s de sonicado y 30 s de pausa a 4°C.

Una vez sonicada la muestra se centrifugó 10 min a 13000 rpm a 4°C, se transfirió el sobrenadante a un tubo cónico de 2 ml, se ajustó el volumen a 2 ml con *ChIP dilution buffer* (SDS 0.01%, Tritón X-100 1.1%, EDTA 1.2 mM, Tris-HCl 16.7 mM pH 8.1, NaCl 167 mM), se tomaron 100 µl de este volumen

y se almacenó a -20°C hasta su procesamiento con las demás muestra para utilizarlo como el *Input* de la muestra. Se realizó un paso de preaclorado con $30\ \mu\text{l}$ de Proteína A-Agarosa (Santa Cruz Biotechnology) y se incubó durante 1 h en agitación a 4°C . Se centrifugó a 2000 rpm durante 2 min, se tomó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo. A cada tubo se le añadió un anticuerpo para inmunoprecipitar: $3\ \mu\text{l}$ anti-H3 (Abcam), $3\ \mu\text{l}$ anti-H3K4me3 y $4\ \mu\text{l}$ anti-H3K27me3 (Cell Signaling Technology).

Después de la incubación se agregaron $25\ \mu\text{l}$ de Proteína A-perlas magnéticas y se incubó a 4°C en agitación durante 1 h para coleccionar el complejo anticuerpo/histona. Se precipitaron los inmunocomplejos colocando los tubos en un soporte magnético, se removió el sobrenadante y se hicieron lavados de 5 minutos en agitación a 4°C con las siguientes soluciones:

- *Low Salt Immune Complex Wash Buffer* (SDS 0.1%, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl pH 8.1, NaCl 150 mM): 1 lavado.
- *High Sal Immune Complex Wash Buffer* (SDS 0.1%, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8.1, NaCl 500 mM): 1 lavado.
- *LiCl Immune Complex Wash Buffer* (LiCl 0.25, Nonidet P-40 1%, ácido deoxicólico 1%, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.1): 1 lavado.
- Buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.1, EDTA 1 mM): 2 lavados.

Entre cada lavado se precipitó el inmunocomplejo colocándolo en el soporte magnético y se descartó el sobrenadante. Una vez terminados los lavados, se resuspendió la muestra en $250\ \mu\text{l}$ de *Elution Buffer* (SDS 1%, NaHCO_3 0.1M), se mezcló con vórtex y se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 15 min, se colocó el tubo en el soporte magnético y el sobrenadante se transfirió a un tubo cónico de 1.5 ml; se repitió la elusión una vez más, teniendo un volumen final de $500\ \mu\text{l}$ de inmunoprecipitado. Tanto a las muestras inmunoprecipitadas como a las *input* guardadas previamente se les agregaron

25 μ l de NaCl 5M y se incubó a 65°C durante 4 horas con la finalidad de separar el DNA de las proteínas. Después de las 4 h se agregaron 10 μ l de EDTA 0.5M, 20 μ l de Tris-HCl 1M pH 6.5, 2 μ l de proteinasa K 10 mg/ml y se incubó 1 h a 45°C.

Se recuperó el DNA mediante extracción con fenol-cloroformo. Para ello se agregó un volumen de fenol saturado pH 8.0, se mezcló y centrifugó 10 min a 13000 rpm a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo cónico de 1.5 ml y se agregó 1 volumen de cloroformo-álcool isoamílico 24:1, se mezcló y se centrifugó 10 min a 13000 rpm a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo cónico de 1.5 ml y se agregaron 100 μ l de NaCl 5M y 1 ml de isopropanol y se incubó durante 12 h a -20°C. Posteriormente se centrifugó 45 min a 13000 rpm a 4°C, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 750 μ l de etanol 70% se centrifugó 15 min a 13000 rpm a 4°C. Se decantó el etanol y se dejó secar la pastilla para posteriormente suspenderla en 50 μ l de agua desionizada estéril.

Para determinar la unión de las proteínas H3, H3K4me3 y H3K27me3 al DNA se utilizó qPCR usando oligonucleótidos para las regiones cercanas al sitio de inicio de la transcripción de los genes p16 y JunB.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para analizar el porcentaje de unión de H3, H3K4me3 y H3K27me3.

Gen blanco	Secuencia
p16	Fw 5' CTCGGAGTTAATAGCACCTC 3' Rv 5' GCCAGCCAGTCAGCCGAA 3'
JunB	Fw 5' TGTTTACAAGGACACGCGCT 3' Rv 5' ATAGCTTTCCTGGCGTCGTT 3'

Las reacciones se prepararon de la siguiente manera: 5 μ l de DNA, 7.5 μ l de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Thermo Scientific), 0.2 μ l de oligonucleótido *forward*, 0.2 μ l de oligonucleótido *reverse* y se ajustó el volumen a 15 μ l con agua desionizada estéril. Las reacciones se realizaron el equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El perfil

térmico utilizado fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización a 95 °C 15 min, 45 ciclos de amplificación de 15 s a 95°C y 60 s a 60°C y una fase última donde se realiza un análisis de las curvas de disociación.

9.6 Análisis de metilación del DNA

Se purificó DNA genómico de las líneas HaCaT-LacZ, HaCaT-E216 y HEK293T utilizando el kit QIAamp DNA Mini and Blood Mini (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para el análisis de metilación del DNA se convirtieron con bisulfito 2 µg de DNA genómico, para ello se utilizó el kit EZ DNA Methylation-Direct (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez tratado el DNA con bisulfito se amplificó por PCR punto final una región CpG del gen p16, los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes: Fw 5' TTGTAGAGGGTAGAAAGAAAATAG 3', Rv 5' ACATCCATTTTATTTCAAAAATAAT 3'. La reacción se preparó de la siguiente manera: 4 µl de DNA genómico tratado con bisulfito, 5 µl de buffer GoTaq Flexi Buffer, 1.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de dNTPs 25 mM, 1 µl de oligonucleótido forward 10 µM, 1 µl de oligonucleótido reverse 10 µM, 0.2 µl de GoTaq DNA Polimerasa 0.05u/µl (Promega). Y el perfil térmico utilizado fue el siguiente: 1 ciclo inicial de 15 min a 95°C, 45 ciclos de amplificación con 45 s a 95°C, 60 s a 56°C y 45 s a 72°C, 1 ciclo final de extensión de 10 min a 72°C. Una vez terminada la reacción, se hizo una electroforesis en gel de agarosa 1.5% en buffer TAE (Tris-base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM pH 8.3) para visualizar el producto de PCR, se purificó el producto a partir de la banda observada en el gel de agarosa para ello se utilizó el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El producto de PCR se ligó en el plásmido pGEM-T Easy (Promega) y se clonó en bacterias competentes *Escherichia coli* JM109 (Promega) mediante un protocolo de choque térmico. Para ello se tomaron 7.5 µl de plásmido ligado y

se mezclaron con 20 µl de bacterias competentes, se mantuvo a las bacterias en hielo durante 30 min, posteriormente se incubaron a 42°C durante 90 s y se incubaron en hielo 2 min. A continuación, se les adicionó 300 µl de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, 10 mM MgCl₂, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) y se incubaron a 37°C en agitación durante 1 h. Al pasar la hora de incubación se sembraron las bacterias en placas de Petri con medio LB semisólido (agar 15 g/L, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L) con ampicilina 100 µg/ml y X-gal 20 µg/ml para la selección de las colonias transformadas, una vez que se sembraron las bacterias se incubaron las placas a 37°C durante 18 h.

Después de 18 h se seleccionaron 7 colonias color blanco para probar si el plásmido contenía el fragmento de interés, se picaron y se inoculó un cultivo de 5 ml de medio LB con ampicilina 100 µg/ml para hacer realizar una mini preparación de plásmido. Este cultivo se incubó a 37°C en agitación durante 18h, después de 18 h se centrifugaron las bacterias y se desechó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 300 µl de buffer P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM y RNasa A 100 µg/ml) y se le adicionó 100 µg de Lisozima; se incubó 2 min a 70°C y posteriormente se transfirió a hielo 5 min. A continuación, se le agregaron 300 µl de Buffer P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%) y se mezcló por inversión, se incubó 5 min a temperatura ambiente, se agregaron 300 µl de buffer P3, se homogenizó por inversión y se incubó en hielo durante 20 min; al finalizar se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 45 min, se recuperó el sobrenadante y la pastilla se desechó.

Al sobrenadante recuperado se le adicionó un volumen de fenol saturado pH 8.0 y se centrifugó 10 min a 13000 rpm a 4°C, se recuperó la fase acuosa en un tubo cónico de 1.5 ml y se le adicionó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, una vez más se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 10 min, se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo cónico de 1.5 ml, se le

agregó ½ volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto; se incubó a -20 °C durante 12 h para precipitar el plásmido. Posteriormente se centrifugó 40 min a 13000 rpm a 4°C, se decantó el etanol absoluto y se lavó con etanol 70%, se centrifugó 10 min a 13000 rpm a 4°C; se decantó el etanol y se dejó secar la pastilla para después suspenderla en 50 µl de agua desionizada estéril.

Una vez obtenido el plásmido se realizó una restricción enzimática con EcoRI (Thermo Scientific), la reacción se preparó de la siguiente manera: 1 µl de buffer EcoRI 10X, 0.5 µl de enzima EcoRI, 1 µg de DNA y se ajustó el volumen a 10 µl con agua desionizada estéril, la reacción se incubó a 37°C durante 3 h; al finalizar se inactivó a la enzima incubando a 65°C durante 20 min. Para observar el tamaño del fragmento cortado se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5% en buffer TAE, esperando ver dos bandas, una que correspondiera con el plásmido linealizado (3015 pb) y otra que correspondiera al fragmento clonado (550 pb). Las clonas que fueron positivas se secuenciaron utilizando los servicios de Macrogen Inc. Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia de referencia convertida *in silico* usando la herramienta en línea QUMA (Kumaki, Oda, & Okano, 2008).

15. RESULTADOS

10.1 La proteína E2 reprime la expresión de componentes de la maquinaria epigenética

Con la finalidad de conocer si E2 participa en conjunto con la maquinaria epigenética para regular la expresión de genes celulares, se utilizó la línea celular HaCaT proveniente de queratinocitos humanos de piel de adulto inmortalizados espontáneamente, caracterizada por su capacidad para diferenciar *in vitro* y por carecer secuencias de papilomavirus integradas en su genoma (Boukamp, y otros, 1988). Previamente en nuestro grupo de trabajo se obtuvieron a partir de estas células, dos líneas transducidas con lentivirus que incorporaron un transgen particular y con las cuales se trabajó en este estudio. La primera contiene el gen E2 de HPV16 (HaCaT-E216) y la segunda contiene un fragmento del gen LacZ; esta última se utilizó como control en todos los ensayos.

Se seleccionaron genes de la maquinaria epigenética asociados con dos mecanismos de regulación epigenética: la modificación postraduccional de histonas y la metilación del DNA.

En cuanto a la modificación postraduccional de histonas se analizó a nivel de mRNA la expresión de genes relacionados con la metilación de la histona H3: EZH2, EED, SUZ12 y SETD1A.

Los genes EZH2, EED, SUZ12 como se mencionó anteriormente codifican para proteínas que forman parte del núcleo proteico del complejo PRC2, encargado principalmente de trimetilar a la histona H3 en la lisina 27 (H3K27me3), modificación asociada con sitios de la cromatina donde la transcripción se encuentra reprimida.

Mediante análisis de RT-qPCR se determinaron los niveles de mRNA estos genes (**Figura 11**), observando que solamente EZH2 presentó un cambio en su expresión en la línea HaCaT-E216, ya que el nivel de mRNA de este gen disminuyó 23% comparado con el de la línea celular HaCaT-LacZ. Debido a que EZH2 es la proteína con actividad catalítica de metiltransferasa de histonas, su disminución a nivel de mensajero sugiere que su actividad puede estar disminuida en la línea HaCaT-E216.

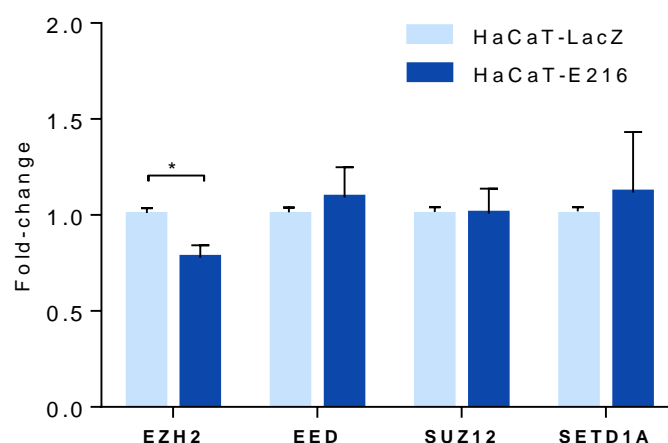


Figura 11. Análisis RT-qPCR para la expresión de EZH2, EED, SUZ12, y SETD1A en células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216. El valor de *fold-change* es calculado con el método $\Delta\Delta C_T$ utilizando como control endógeno β -2-microglobulina para el caso de EZH2, EED y SUZ12 y para el caso de SETD1A se utilizó TBP. Los resultados son representativos de tres ensayos independientes expresados como la media \pm SD, * significancia $p < 0.05$.

Para confirmar si los cambios en los niveles de mRNA se veían reflejados en los niveles de proteína EZH2, se realizó un Western blot de lisados provenientes de ambas líneas celulares. En la **Figura 12** se puede observar que sorprendentemente el nivel de proteína disminuyó ~35% en la línea HaCaT-E216, sugiriendo que además de la regulación dada a nivel de transcripción, esta proteína podría estar siendo regulada a nivel postranscripcional, ya sea mediante la inhibición de la traducción o postraduccional, mediante la disminución de la vida media de la proteína.

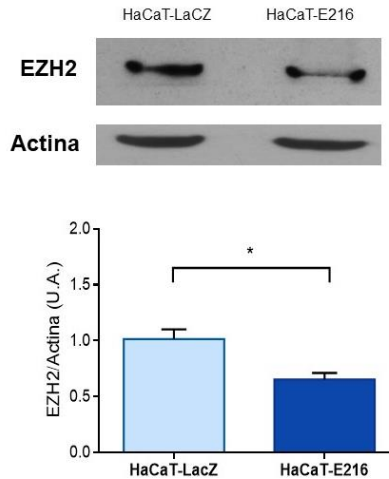


Figura 12. Análisis de Western blot de la proteína EZH2 en las líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E2. Se muestra una imagen representativa del nivel de proteína en ambas líneas celulares. Se muestra la gráfica con valores numéricos que corresponde a la relación de proteína en HaCaT-E216 con respecto a HaCaT-LacZ de tres ensayos independientes expresado como la media \pm SD; se utilizó como control endógeno actina. * significancia $p < 0.05$.

Adicionalmente, se analizó la expresión de dos genes relacionados con acetilación de histonas, HDAC1 y KAT2A, que codifican para proteínas que realizan funciones antagónicas en la célula, HDAC1 es una deacetilasa de histona asociada con complejos proteicos que promueven la represión de genes, mientras KAT2A es una acetilasa de histonas que forma parte de complejos como SAGA y ATAC, que promueven la activación transcripcional de genes. Los análisis de RT-qPCR mostraron una disminución en la expresión de la acetilasa de histonas KAT2A en un 23% (**Figura 13a**). Para confirmar si los cambios en los niveles de mRNA se veían reflejados en los niveles de proteína, se realizó un Western blot de lisados provenientes de ambas líneas celulares (**Figura 13b**). En este caso, el nivel de proteína disminuyó alrededor de 27% una proporción similar a lo observado en el mRNA, lo que podría indicar que dada la disminución de mRNA la cantidad de proteína que puede traducirse es menor y en este caso la actividad sobre sus blancos podría estar de la misma manera reducida.

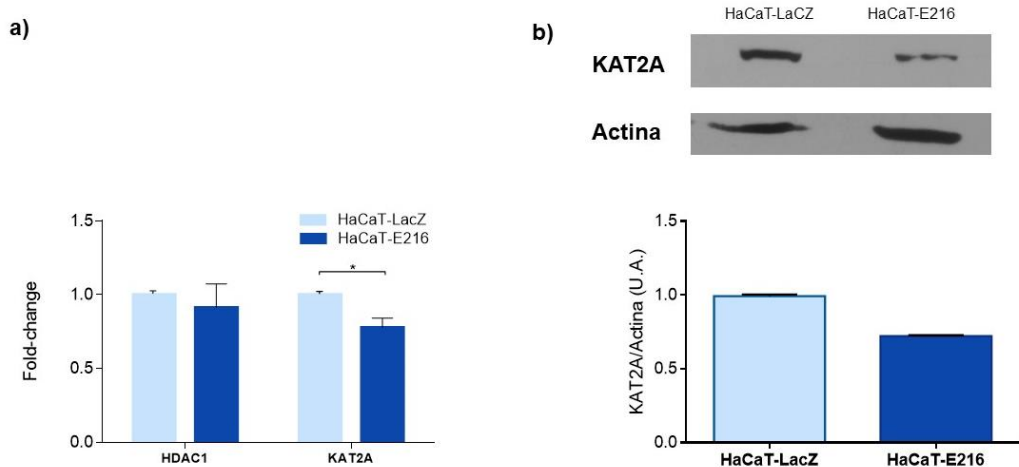


Figura 13. Análisis de la expresión de HDAC y KAT2A en células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216. (a) El análisis de RT-qPCR muestra el *fold-change* calculado con el método $\Delta\Delta C_T$ utilizando como control endógeno β -2-microglobulina para el caso de HDAC1 y para el caso de KAT2A se utilizó TBP. (b) El análisis de Western blot muestra imagen representativa de la expresión de la proteína KAT2A y la gráfica con valores numéricos que corresponde a la relación de proteína en HaCaT-E216 con respecto a HaCaT-LacZ, obtenida de dos ensayos independientes expresado como la media \pm SD; se utilizó como control endógeno actina. Los resultados de RT-qPCR son representativos de tres ensayos independientes expresados como la media \pm SD, * significancia $p < 0.05$.

En cuanto a los genes asociados con la metilación del DNA, se analizó la expresión de las metiltransferasas de DNA mejor descritas en la actualidad, DNMT1, DNMT3A y DNMT3B, que como se mencionó antes participan ya sea en el mantenimiento de las marcas de metilación durante la replicación del DNA o en la adición de marcas *de novo*; el efecto de estas marcas es la represión de genes. Además, se analizó la expresión de TET2 que codifica para una dioxigenasa que cataliza la conversión de 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina, modificación importante en la desmetilación del DNA.

El análisis de RT-qPCR (**Figura 14**) mostró que la expresión de DNMT1, DNMT3A y TET2 se mantuvo similar en las líneas HaCaT-LacZ y HaCaT-E216, mientras que la expresión de DNMT3B se redujo alrededor de un 20% en la línea celular HaCaT-E216. Para confirmar si los cambios en los niveles de mRNA se veían reflejados en los niveles de proteína EZH2, se realizó un Western blot de lisados provenientes de ambas líneas celulares. Los ensayos

mostraron que el nivel de proteína DNMT3B es semejante en las líneas HaCaT-LacZ y HaCaT-E216, por lo que se podría pensar que la inhibición transcripcional de DNMT3B en células que expresan E2 es compensada a nivel postranscripcional para permitir que los niveles de proteína no se modifiquen.

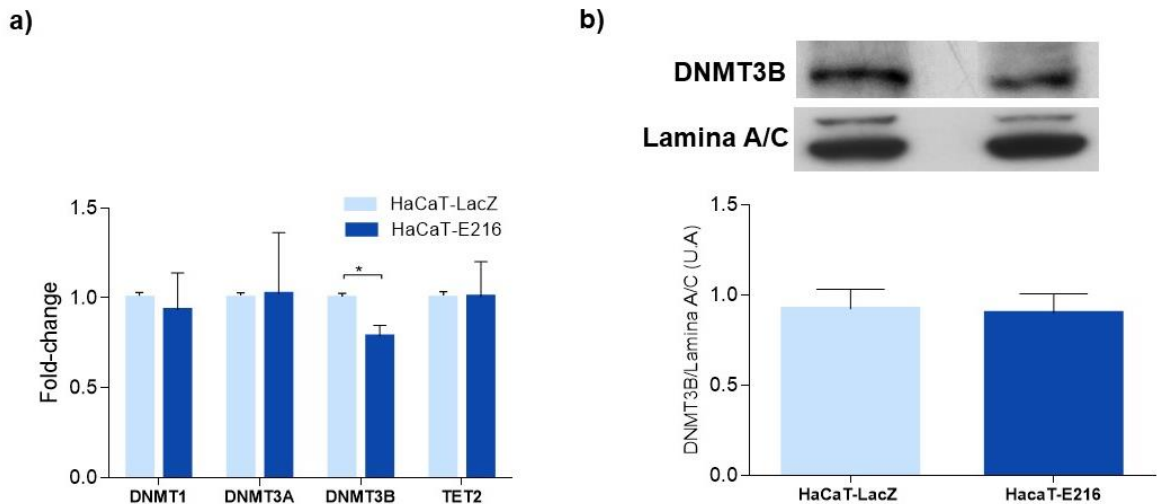


Figura 14. Análisis de la expresión de DNMT3A, DNMT3B y TET2 en células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216. (a) El valor de *fold-change* es calculado con el método $\Delta\Delta C_T$ utilizando como control endógeno β -2-microglobulina para el caso de DNMT1 y para el caso de DNMT3A, DNMT3B y TET2 se utilizó TBP. (b) El análisis de Western blot muestra imagen representativa de la expresión de la proteína DNMT3B y la gráfica con valores numéricos que corresponde a la relación de proteína en HaCaT-E216 con respecto a HaCaT-LacZ de dos ensayos independientes expresado como la media \pm SD, se utilizó como control endógeno lamina A/C. Los resultados de RT-qPCR son representativos de tres ensayos independientes expresados como la media \pm SD, * significancia $p < 0.05$.

10.2 Efecto de la expresión de E2 sobre la abundancia de las modificaciones H3K4me3 y H3K27me3

Con la finalidad de conocer si la regulación transcripcional de genes celulares dada por E2 está relacionada con la alteración de modificaciones epigenéticas, evaluamos la presencia de marcas de metilación en histonas en regiones

cercanas al sitio de inicio de la transcripción de los genes JunB y p16, en los cuales previamente se observó variación en la expresión en la línea celular HaCaT-E216. Por un lado, JunB se encuentra reprimido (Gallareta Cervera, 2018), mientras que la expresión de p16 aumenta en la línea celular HaCaT-E216.

Se evaluó la abundancia de las marcas en la histona H3: H3K4me3 y H3K27me3, mediante inmunoprecipitación de la cromatina. Una vez que se obtuvo el DNA unido a las histonas con estas modificaciones, se realizó RT-qPCR con la finalidad de conocer los porcentajes de unión de éstas a los sitios de inicio de transcripción de los genes previamente mencionados.

La marca H3K4me3 está descrita como una marca de gran importancia asociada a regiones transcripcionalmente activas de la cromatina, mientras que la marca H3K27me3 se relaciona con sitios donde la transcripción de la cromatina se encuentra reprimida. Por ello, la abundancia de estas marcas es un indicador del estado transcripcional de los genes.

En la **Figura 15** podemos observar los porcentajes de unión de las marcas H3K4me3 y H3K27me al sitio de inicio de la transcripción de JunB. Con respecto a la marca H3K4me3 observamos una disminución en las células E2, mostrando 78% de unión comparadas con el control HaCaT-LacZ de 100%. En cuanto a la marca H3K27me3, encontramos un aumento en las células HaCaT-E216 en un $340 \pm 120\%$. Estos resultados indican que la marca H3K4me3 asociada con regiones transcripcionalmente activas se encuentra disminuida, aunque este cambio no sea estadísticamente significativo, y que la marca H3K27me3 asociada a regiones con la transcripción reprimida se encuentra aumentada, es decir, que el estado esperado de la transcripción del gen JunB es reprimido. Estos resultados concuerdan con los análisis en donde se observó la represión de este en células HaCaT que expresan E2, indicando que efectivamente esta proteína viral podría estar regulando la transcripción

de algunos genes como JunB a través de la alteración de marcas de metilación en histonas.

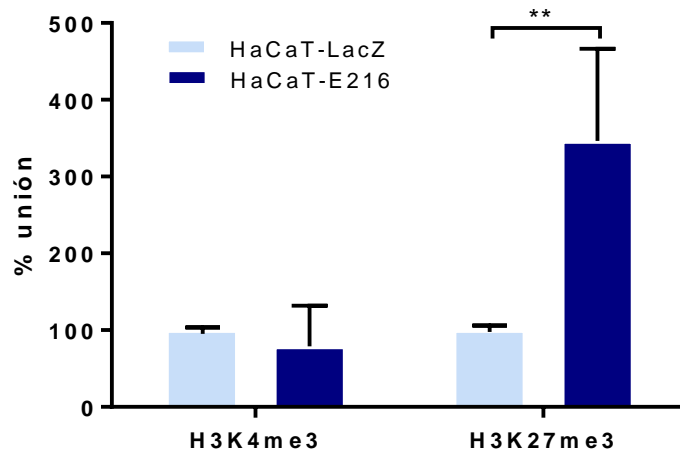


Figura 15. Análisis del porcentaje de unión de H3K4me3 y H3K27me7 mediante ChIP al sitio de inicio de transcripción del gen JunB en las células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216. Los valores de porcentaje de unión son calculados por el método de *fold-enrichment* y posteriormente se muestra como el porcentaje con respecto a HaCaT-LacZ de la unión de cada marca. Los resultados son representativos de cuatro ensayos independientes expresados como la media \pm SD. **significancia $p < 0.005$

En cuanto al gen p16 (**Figura 16**) observamos en el análisis de RT-qPCR una disminución del porcentaje de la marca H3K4me3 (42%) en las células HaCaT-E216, comparado con el porcentaje de las células HaCaT-LacZ, mientras que el porcentaje de la marca H3K27me3 fue similar en ambas líneas celulares. Estos resultados sugieren que el estado transcripcional de p16 podría ser reprimido en las células HaCaT-E216, debido a la disminución de la marca H3K4me3, sin embargo, el análisis de su expresión a nivel de mensajero mostró lo opuesto. Estos resultados sugieren que la modificación en el nivel

de expresión de p16 causado por E2, no está relacionado con la abundancia de las marcas H3K4me3 y H3K27me3 en el gen.

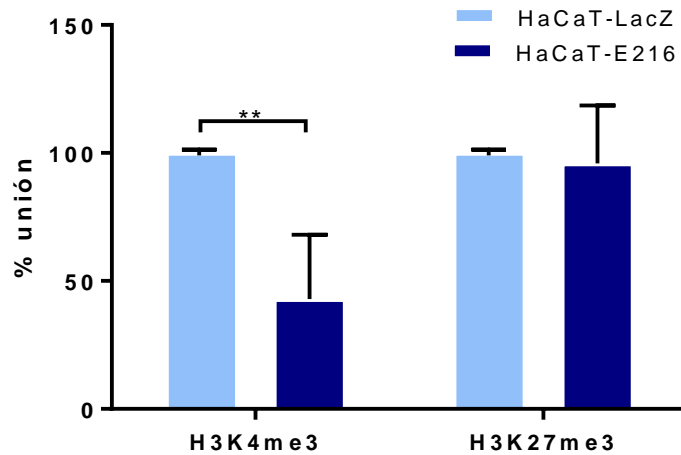


Figura 16. Análisis del porcentaje de unión de H3K4me3 y H3K27me7 mediante ChIP al sitio de inicio de la transcripción del gen p16 en las células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216. Los valores de porcentaje de unión son calculados por el método de *fold-enrichment* y posteriormente se muestra como el porcentaje de unión de cada marca con respecto a HaCaT-LacZ. Los resultados son representativos de cuatro ensayos independientes expresados como la media \pm SD. **significancia $p < 0.005$

10.3 Efecto de la expresión de E2 sobre la metilación de islas CpG presentes en el gen p16

Debido a que no encontramos cambios en las modificaciones de histonas que pudieran explicar el incremento en los niveles de mRNA de p16 en las células que expresan E2, decidimos analizar el estado de marcas de metilación en sitios CpG cercanos al sitio de inicio de la transcripción de este gen y así poder conocer si a pesar de no haber una regulación clara en la modificación de histonas, la metilación del DNA pudiera tener relación con su estado transcripcional.

Para ello se utilizó la herramienta en línea MethPrimer (Li & Dahiya, 2002) en la cual se buscó si en la secuencia “corriente arriba” del inicio de la transcripción del gen CDKN2A (que codifica para la proteína p16) se localizaban islas CpG putativas (**Figura 17**). Esta herramienta arrojó como posibles islas CpG a una región de 550 pb localizada a 5000 pb del inicio de la transcripción por lo que se decidió hacer el análisis de la metilación en esta región con DNA genómico de células HaCaT-LacZ, HaCaT-E216 y HEK293T.

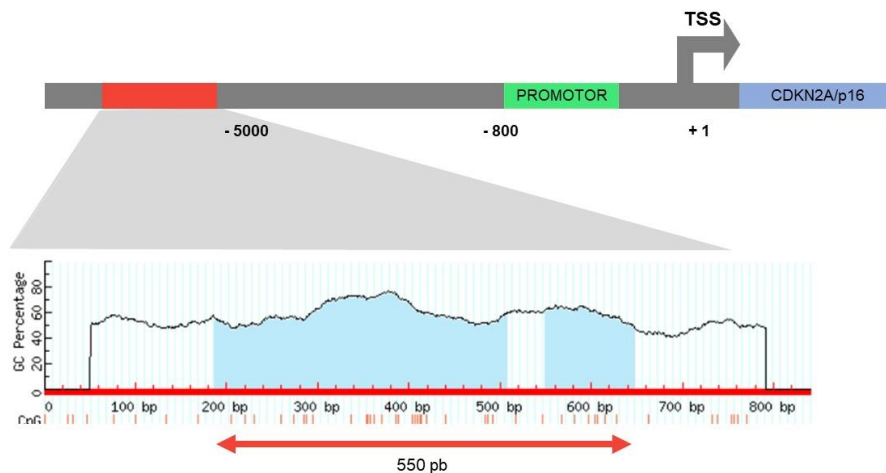


Figura 17. Predicción de isla CpG en región cercana al sitio de inicio de la transcripción de CDKN2A. Utilizando la herramienta Meth Primer se buscaron islas CpG cercanas al sitio de inicio de transcripción de CDKN2A, esta herramienta nos arrojó como posibles islas CpG (región sombreada en azul en la gráfica) una región de 550 pb que amplificó con un par de oligonucleótidos que flaqueaba la región.

En la región de 550 pb seleccionada se localizaron 37 sitios CpG que para facilitar su análisis se dividieron en 3 regiones, la región a, b y c (**Figura 18**). Los resultados observados en la línea celular HEK293T fueron inesperados pues, aunque esta línea se utilizó debido a que p16 se expresa fuertemente en ella, lo que se observa en la **Figura 18** es que, en las 3 regiones analizadas, 36 de los 37 sitios CpG presentan una metilación del 100%. Esto quiere decir que las 5 clonas que se secuenciaron presentaban estos sitios metilados y ya que la hipermetilación del DNA está relacionada más bien con represión de la

expresión, podríamos pensar que la metilación en estos sitios no ejerce un efecto decisivo sobre la expresión de p16 en esta línea celular.

En las células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216, por otro lado, se observaron más variaciones en la metilación de algunos sitios. En la región a (**Figura 18a**) podemos observar que los sitios CpG localizados en la posición -5557 y -5527 presentaron un porcentaje de metilación de 66.7% y 83.3% respectivamente en las células HaCaT-LacZ, mientras que en las células HaCaT-E216 los 9 sitios presenta el 100% de metilación.

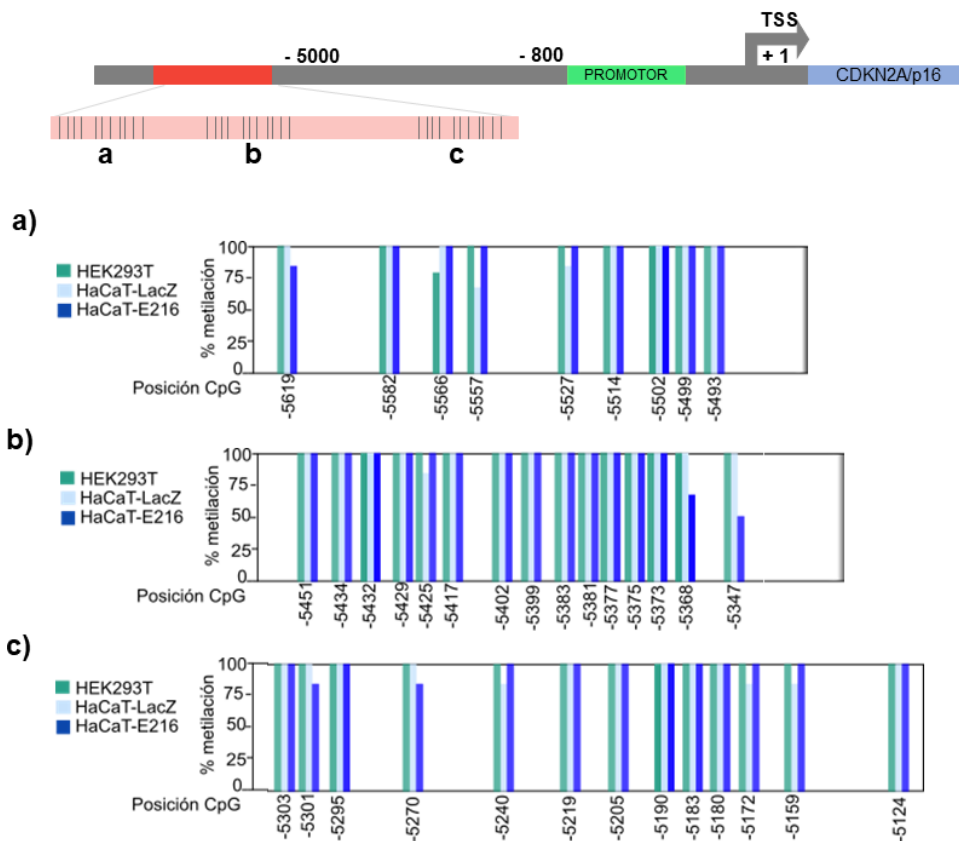


Figura 18. Análisis de metilación en sitios CpG cercanos al sitio de inicio de la transcripción de CDKN2A. El esquema muestra la región de 550 pb de bases que se analizó, así como la ubicación de los sitios CpG dentro de ésta. La región de 550 pb cuenta con 37 sitios CpG y se dividió en tres regiones: **(a)** la primera región cuenta con 9 sitios CpG localizados desde el nucleótido -5519 al -5493, **(b)** la segunda región cuenta con 15 sitios CpG localizados del nucleótido -5451 al -5347 y **(c)** la tercera región cuenta con 13 sitios CpG que

van del nucleótido -5303 al -5124. Las gráficas representan el porcentaje de metilación de 5 clonas secuenciadas.

En la región b (**Figura 18b**) podemos observar que en las células HaCaT-LacZ, 14 de los 15 sitios CpG presentan el 100% de la metilación, a excepción del sitio -5425 que presenta un porcentaje de metilación del 83.3%. Por otro lado, las células HaCaT-E2 presentan una disminución en el porcentaje de metilación en dos sitios CpG contiguos, el sitio -5368 y -5347, los cuales presentan un porcentaje de metilación de 66.7% y 50% respectivamente.

Finalmente, en la región c (**Figura 18c**) podemos observar que la línea HaCaT-LacZ presenta 100% de metilación en 10 sitios CpG, y un 83.3% en los restantes sitios de metilación (en los nucleótidos -5240, -5172 y 5159). Por otro lado, en la línea HaCaT-E216 se presenta 100% de metilación en 11 sitios, mientras que los otros dos presentan un 83.3% (posición – 5301 y -5270).

Como se ha descrito, las variaciones en los porcentajes de metilación no fueron tan marcadas en los sitios CpG analizados, ya que se habría esperado una disminución clara en la metilación del DNA proveniente de las líneas HEK293T y HaCaT-E216, en las que la expresión de p16 es más alta. Sin embargo, los sitios en donde el porcentaje de metilación fue menor de 100% fueron distintos en cada línea celular, pudiendo ser posible que estos cambios sutiles en cada línea estén relacionados con la regulación fina de la transcripción.

17. DISCUSIÓN

11.1 Regulación de la expresión de componentes de la maquinaria epigenética

Como ya se mencionó con anterioridad, la proteína E2 es de gran relevancia durante el ciclo de vida de los papilomavirus, destacando entre todas las funciones que es capaz de realizar, su capacidad de regular la transcripción de un gran número de genes celulares, sin que hasta el momento se conozca por completo como es capaz de hacerlo.

En el presente trabajo se buscó determinar si E2 es capaz de regular la transcripción de genes a través de la modificación de la maquinaria epigenética. Para este fin se analizó la expresión de genes relacionados con la modificación de histonas y la metilación del DNA, encontrando que el efecto general sobre los genes analizados fue la represión tanto a nivel transcripcional como de proteína. Tres de los genes analizados presentaron una disminución estadísticamente significativa en los niveles de transcrito en las células HaCaT-E2 y cuando se analizó el nivel de proteína se presentaron tres fenómenos distintos. La proteína EZH2 presentó una disminución del 23% (**Figura 11**) en su nivel de transcrito mientras que la disminución en el nivel de proteína fue de 35% (**Figura 12**). En el caso de KAT2A, el nivel de transcrito disminuyó 23% y la proteína disminuyó en un nivel similar (**Figura 13**), para el caso de DNMT3B se observó una disminución del transcrito de 20%, sin embargo, el nivel de proteína se mantuvo similar al observado en la línea control HaCaT-LacZ (**Figura 14**).

Estos resultados muestran que además de la regulación transcripcional realizada por E2, esta proteína puede estar participando también en mecanismos regulación postranscripcional. Precisamente entre las proteínas que interactúan con E2, se han descrito algunas asociadas al procesamiento de RNA como SRPK1/SRPK2 (del inglés *serine/arginine-rich protein specific*

kinase), EFTUD2 (del inglés *elongation factor Tu GTP-binding domain containing protein*), EIF4A3 (del inglés *eukaryotic initiation factor 4A-III*) y algunos factores de *splicing* (Jang, Anderson, van Doorslaer, & McBride, 2015); proteínas relacionadas con la vía de ubiquitinación, como CDC20 y FZR1, dos subunidades del complejo ubiquitin ligasa APC/C (del inglés *Anaphase Promoting Complex*); y proteínas relacionadas con el transporte intracelular de proteínas como AP3D1 y KIF20A (Muller & Demeret, 2012). Por todo ello, no es sorprendente que la regulación de la expresión génica por E2 sea más compleja que el simple encendido o apagado de genes.

Sería interesante conocer el mecanismo mediante el cual E2 puede regular la expresión de estos genes. En la actualidad se han descrito dos mecanismos posibles: la unión de E2 a una secuencia específica en el DNA (sitios E2BS), como los que se encuentran en la región LCR del genoma de papilomavirus y que permiten la regulación de la transcripción de genes virales permitiendo la unión de factores de transcripción o estorbando a los mismos (Grm, Massimi, Gammoh, & Banks, 2005); aunque esta opción podría ser descartada ya que Vösa y cols. (2012) buscaron en el genoma humano secuencias que se asemejaran a la secuencia consenso reconocida por E2 (ACCGN₄CGGT) y reportaron que la mayoría de los sitios E2BS putativos se localizan en regiones repetitivas de DNA o tienen secuencias espaciadoras ricas en G/C y de los sitios encontrados cercanos a regiones codificantes ninguna corresponde con alguno de los componentes de la maquinaria epigenética aquí estudiados (Vösa, Sudakov, Remm, Ustav, & Kurg, 2012).

El segundo mecanismo podría ser mediante la interacción que E2 tiene con factores de la maquinaria basal de transcripción (como TAF, TBP) o regulatorios (como SP1, HOXC9, C/EBP) (Muller & Demeret, 2012) que podrían modular la formación de complejos de preiniciación en promotores

específicos (Ptashne & Gann, 1997), como podría ser el caso de los genes analizados en este estudio.

Es importante resaltar que ninguno de los genes que se analizaron presentó un aumento en sus niveles de mRNA, aunque E2 muestra una tendencia mayoritaria hacia la represión de genes, también un gran número de genes son regulados positivamente (Ramírez-Salazar, y otros, 2011). Se ha reportado la regulación positiva de genes de la maquinaria epigenética dada por proteínas virales, como la sobreexpresión de la desmetilasa KDM6B causada por la proteína LMP1 del virus de Epstein Barr en linfocitos; en este virus la proteína LMP1 se considera como transformante ya que modifica el programa transcripcional de las células B e interrumpe su proceso de diferenciación normal (Anderton, y otros, 2011). Al igual que LMP1, la proteína E2 tiene la capacidad de regular la transcripción de un gran número de genes celulares y podría esperarse que algún otro componente de la maquinaria epigenética pudiera estar sobreexpresado, por lo sería de gran interés evaluarlos de manera global.

11.2 Efecto biológico de la represión de componentes de la maquinaria epigenética

Anteriormente se mencionó que la proteína EZH2 es la unidad catalítica del complejo PRC2, llevando a cabo la trimetilación de la lisina 27 en la histona H3; esta marca ha sido ampliamente estudiada y se sabe que los sitios de la cromatina asociados con histonas que la poseen se encuentran reprimidos. Por ello, sería importante conocer cuál es el efecto de la disminución de esta en las células que expresan E2 ya que, si existiera una relación directa entre la cantidad de proteína y la actividad de esta, podríamos esperar una disminución en la marca H3K27me3 en todo el genoma; sin embargo, con los resultados obtenidos en los ensayos de ChIP (**Figura 15 y 16**) podríamos pensar que la regulación es más compleja.

La proteína EZH2 requiere de las proteínas EED y SUZ12 para poder realizar su función de metiltransferasa, la expresión de estos dos genes fue evaluada mediante RT-qPCR y no se observó un cambio significativo en su expresión, por lo que podría pensarse que la disponibilidad de EED y SUZ12 puede permitir que el complejo siga funcionando, aunque la cantidad de la proteína EZH2 sea menor. Además, existen diferentes factores que pueden modular el reclutamiento y la actividad catalítica del complejo PRC2, como la presencia de islas CpG en promotores donde el complejo es reclutado, la interacción con RNAs no codificantes que pueden guiar al complejo a *loci* específicos y los mismos productos del complejo, es decir, la marca H3K27me3, o la presencia de marcas como H3K4me3 (Laugesen, Westergaard Højfeldt, & Helin, 2019). Adicionalmente, existe un homólogo de EZH2, EZH1 que también es capaz de interactuar con EED y SUZ12, así como de catalizar la mono-, di- y trimetilación en H3K27 (Shen, y otros, 2008), por ello podría pensarse que todo lo antes mencionado permite compensar la actividad de EZH2.

La acetiltransferasa de histonas KAT2A como se mencionó forma parte del complejo SAGA y ATAC, que en conjunto con la proteína PCAF se encarga de acetilar histonas H3. En específico, se ha relacionado a estas dos proteínas con la acetilación en H3K9, y esta modificación se relaciona con la activación transcripcional. La represión transcripcional de KAT2A en las células HaCaT-E216, por lo tanto, se ajusta con el efecto prominente de silenciamiento génico por E2. Aunque como se discutió anteriormente, una menor cantidad de proteína no tiene que representar necesariamente una actividad menor, en este estudio no se realizó ningún análisis del estado de las marcas de acetilación en H3K9 por lo que no podemos saber el efecto con certeza si también existe una reducción general de esta marca en el genoma de las células HaCaT-E2. Considerando que en los complejos SAGA y ATAC, las proteínas KAT2A y PCAF existen de manera mutuamente excluyente y que la pérdida combinada de ambas proteínas en ratón lleva a defectos en el

desarrollo más severos que los presentados cuando se muta únicamente alguna de las dos, se ha sugerido una redundancia parcial en la actividad de KAT2A y PCAF, por lo que la represión de KAT2A podría no representar una disminución directamente proporcional de la marca H3K9ac (Jin, y otros, 2011).

11.3 Modificación en la abundancia de las marcas en histonas H3K4me3 y H3K27me3

De los resultados obtenidos en los ensayos de ChIP podemos resaltar que la trimetilación en H3K4 se redujo en las regiones cercanas al inicio de la transcripción en los dos genes analizados en las células HaCaT-E2. Esta modificación es realizada por el complejo SET1A/B, donde la proteína SETD1A, es central para la colocación de esta marca; a pesar de tener un homólogo (SETD1B) se considera que estas proteínas no son redundantes (Howe, Fischl, Murray, & Mellor, 2016). El análisis de RT-qPCR mostró que SETD1A no presenta cambios significativos en su expresión cuando E2 está en la célula por lo que la disminución de esta marca más bien puede deberse a alteraciones en la actividad del complejo SET1A/B.

Una situación similar se observa con la trimetilación en H3K27, que como se mencionó anteriormente, en JunB se observa incrementada mientras que en p16 el nivel se mantiene similar en las células HaCaT-E216 con respecto a las células HaCaT-LacZ, a pesar de la disminución en la expresión de la proteína catalítica EZH2.

Estos resultados dan un indicio de que E2 podría estar regulando a través de modificaciones epigenéticas la expresión de genes celulares y que estas modificaciones son permitidas por la alteración de la actividad de la maquinaria epigenética, más que por la regulación transcripcional de los componentes de esta.

11.4 Efecto biológico de la alteración de las modificaciones en histonas H3K4me3 y H3K27me3 en el gen JunB

El complejo transcripcional AP-1 (del inglés *activator protein-1*) consta de una colección de factores de transcripción diméricos bZip. Sus componentes mejor estudiados son los miembros de la familia Fos y la familia Jun (c-Jun, JunB y JunD), los cuales tienen la capacidad de unirse al DNA. Los dímeros AP-1 actúan tanto positiva como negativamente sobre la transcripción dependiendo de su composición, sus modificaciones postraduccionales, el gen blanco, el contexto celular y las señales ambientales. AP-1 regula muchos procesos celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, apoptosis y respuesta a estrés. Ezhkova y cols. (2009) proponen a los componentes del complejo AP-1 como iniciadores del proceso de diferenciación epidérmica (Ezhkova, y otros, 2009) y como se mencionó en los antecedentes, se ha observado que la expresión de la proteína E2 en células de la capa basal del epitelio promueve la diferenciación temprana (Domínguez-Catzín, y otros, 2017), por lo que sería esperado encontrar un aumento en la expresión de JunB en las células HaCaT-E216; sin embargo, observamos una fuerte represión transcripcional. Aunque JunB es mejor conocido por ser inhibidor de la división celular, por inducir senescencia y como supresor de tumores, existe evidencia creciente de su actividad en la promoción de la división celular, pues en células que se encuentran ciclando, sus niveles aumentan durante el progreso de la fase G1 a la fase S y disminuyen en la fase G2/M (Piechaczyk & Farràs, 2008). Esto sugiere que la acción de JunB en un ambiente donde se expresa E2 se relaciona principalmente con la promoción de la división celular y debido a la inducción de la diferenciación temprana causada por E2, se reprimen genes que promueven que las células permanezcan en un estado indiferenciado.

11.5 Regulación epigenética de p16

p16 es un gen supresor de tumores conocido por diferentes nombres; INK4a (del inglés *inhibitor of cyclin-dependent kinase 4a*) o p16^{INK4} y CDKN2A (del inglés *cyclin dependent kinases inhibitor 2A*). El gen p16 codifica proteínas involucradas en la regulación de dos vías fundamentales del ciclo celular, la vía p53 y la vía RB1.

p16 regula negativamente la vía pRB-E2F durante el ciclo celular. En la fase G0 y principios de G1, pRB está hipofosforilada y se agrega con los factores de transcripción E2F, previniendo que los factores E2F interactúen con los promotores de genes involucrados en proliferación. Cuando la célula prolifera, pRB sufre un incremento en la fosforilación por CDK4 y CDK6 en el final de la fase G1, dirigiendo la progresión a la fase S. La unión de p16 a CDK4 y CDK6 resulta en hipofosforilación de pRB y esto provoca el arresto de la proliferación celular en el límite G1/S (Ezhkova, y otros, 2009).

La expresión de p16 en las células HaCaT-E216, concuerda con el reporte de que el locus *Ink4A-Ink4B* promueve la diferenciación epidérmica, pues E2 puede promover diferenciación temprana en células del epitelio. El reporte donde se sugiere al locus como uno de los reguladores de diferenciación epidérmica precisamente revela la importancia de la proteína EZH2 como mediadora de la represión a nivel de cromatina en las células basales embrionarias y se muestra que su expresión disminuye conforme avanza la edad y las células se comprometen a la diferenciación temprana. En ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, muestran que la marca H3K27me3 se encuentra en genes epidérmicos que se activan tardíamente durante la diferenciación y la pérdida de la represión mediada por PcG reduce la proliferación de las células epidérmicas a través la sobreexpresión del locus *Ink4A-Ink4B* y establece la tasa de diferenciación (Ezhkova, y otros, 2009).

Por ello, debido al efecto que tiene E2 en la diferenciación temprana de células basales del epitelio, podría haberse esperado una tendencia similar a lo reportado por Ezhkova y cols. (2009) en la abundancia de la marca H3K27me3, sin embargo, no observamos disminución en esta marca y tampoco un aumento en la marca H3K4me3, al menos en los sitios que amplificamos por RT-qPCR, por lo que podría ser posible que en otras regiones (como el cuerpo del gen) pudiera haber una abundancia distinta de las marcas H3K27me3 y H3K4me3 que concuerde más con el estado transcripcional de p16 en las células HaCaT-E2.

A pesar de no observar diferencias en las modificaciones en histonas, decidimos analizar la metilación del DNA, encontrando dos regiones en donde sitios CpG contiguos presentaron una disminución del porcentaje de metilación. En la línea celular HaCaT-LacZ en los sitios -5557 y -5527 se observó un porcentaje de metilación de 66.7% y 83.3% respectivamente. En la línea HaCaT-E2 se encontró disminución en el porcentaje de metilación en dos sitios CpG contiguos, el sitio -5368 y -5347, los cuales presentan un porcentaje de metilación de 66.7% y 50% respectivamente. Con la finalidad de conocer si estos cambios pudieran estar asociados con un efecto en la regulación transcripcional de p16 se hizo una búsqueda para evaluar la presencia de regiones regulatorias, como *enhancers* (debido a la distancia del sitio de inicio de la transcripción) sin que pudiéramos encontrar alguna evidencia de que existieran elementos regulatorios en esa zona. Este resultado sumado a lo observado en la metilación de los sitios evaluados en la línea celular HEK293, en la cual se observó hipermetilación en 36 de los 37 sitios nos indica que la isla CpG evaluada en este estudio no dirige la expresión de p16 al menos en las líneas celulares usadas en este trabajo.

Se ha reportado que el locus *Ink4A-Ink4B* y especialmente el promotor de CDKN2A contiene regiones ricas en CpG (Li, y otros, 2016) que se encuentran

metiladas en células de humano joven, cuando p16 no se expresa (Foster, Barrett, & Galloway, 1998). Merlo y cols. (1995) reportaron por primera vez patrones de metilación similares en sitios CpG localizados en el primer exón y en el extremo no traducible del gen p16 (una región de 379 pb) en tejidos provenientes de diferentes tipos de cáncer, asociando estos patrones de metilación con el bloqueo de su actividad transcripcional (Merlo, y otros, 1995). A partir de este reporte se ha observado metilación en el promotor de este gen en otros tipos de cáncer, como el gástrico (Alves, Ferrasi, Lima, & Rabenhorst, 2011), el cervical (Banzai, y otros, 2014) y el de mama (Celebiler-Cavusoglu, y otros, 2010), entre otros, lo cual nos indica que la regulación mediada por metilación de DNA en este gen es de gran importancia y que su evaluación realizada en nuestro trabajo, debe extenderse hacia su región promotora

19. CONCLUSIONES

Se observó que la proteína E2 reprime transcripcionalmente a los genes EZH2, KAT2A y DNMT3B que forman parte de la maquinaria epigenética en la línea celular HaCaT. Además, de la represión transcripcional se mostró que E2 puede regular los niveles de proteínas, de manera independiente a la regulación transcripcional, pues en EZH2 se observó un porcentaje de represión mayor al observado en el transcrito y en DNMT3B se mantuvo el nivel de proteína similar a la línea control HaCaT-LacZ a pesar de la represión transcripcional.

La expresión de E2 altera la abundancia de la trimetilación en H3K4 y en H3K27 en los sitios de inicio de la transcripción de JunB y p16. Y para el caso de JunB las alteraciones en la abundancia de estas marcas se relacionan con el estado transcripcional del gen.

La represión de genes causada por E2 no se relaciona directamente con la actividad de las proteínas de la maquinaria epigenética, pues la disminución de los niveles de proteína EZH2 no correspondió con la abundancia de la marca H3K27me3 producto de la actividad de esta enzima. Sin embargo, a pesar de no encontrar una diferencia en la expresión del gen SETD1A, sí observamos disminución en la abundancia de la marca producto de la actividad de esta enzima, H3K4me3.

Las metilación en las islas CpG localizadas a 5000 pb del inicio de la transcripción del gen p16 no ejercen un efecto en la expresión del gen.

20. PERSPECTIVAS

- Realizar un análisis más amplio de la expresión de componentes de la maquinaria epigenética, por ejemplo, componentes del complejo PRC1, proteínas desmetilasas de histonas e incluso los componentes que realizan funciones homólogas a los genes ya evaluados.
- Utilizar fármacos que repriman la actividad de las proteínas evaluadas, como la metiltransferasa de histonas EZH2, la acetilasa de histonas KAT2A y la DNMT3B para conocer si la represión de éstas realmente afecta las funciones que realizan.
- Evaluar la metilación en islas CpG más cercanas al sitio de inicio de la transcripción del gen p16.
- Buscar islas CpG en el sitio cercano al inicio de la transcripción del gen JunB para analizar si también existe una regulación mediante la metilación del DNA en este gen.

21. BIBLIOGRAFÍA

- Alves, M. K., Ferrasi, A. C., Lima, V. P., & Rabenhorst, S. H. (2011). Inactivation of COX-2, HMLH1 and CDKN2A gene by promoter methylation in gastric cancer: relationship with histological subtype, tumor location and Helicobacter pylori genotype. *Pathobiology*, 78(5), 266-276.
- Anderton, J. A., Bosé, S., Vockerodt, M., Vrzalikova, K., Wei, W., Kuo, M., . . . Woodman, C. B. (2011). The H3K27me3 demethylase, Kdm6B, is induced by Epstein-Barr virus and over-expressed in Hodgkin's Lymphoma. *Oncogene*, 30, 2037-2043.
- Banzai, C., Nishino, K., Quan, J., Yoshihara, K., Sekine, M., Yahata, T., . . . Niigata, G. C. (2014). Promoter methylation of DAPK1, FHIT, MGMT, and CDKN2A genes in cervical carcinoma. *International Journal of Clinical Oncology*, 19(1), 127-132.
- Boukamp, P., Petrussevska, R., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, 106, 761-771.
- Burns, J., Walker, H., Schmitz, C., & Maitland, N. (2010). Phenotypic effects of HPV-16 E2 protein expression in human keratinocytes. *Virology*, 401, 314-321.
- Celebiler-Cavusoglu, C., Sevinc, A. I., Saydam, S., Canda, T., Baskan, Z., Kilic, Y., & Sakizli, M. (2010). Promoter methylation and expression changes of CDH1 and P16 genes in invasive breast cancer and adjacent normal breast tissue. *Neoplasma*, 57(5), 465-472.

- Centeno, F., Ramírez-Salazar, E., García-Villa, E., Gariglio, P., & Garrido, E. (2008). TAF1 interacts with and modulates human papillomavirus 16 E2-dependent transcriptional regulation. *Intervirology*, *51*, 137-143.
- Chédin, F. (2011). The DNMT3 family of mammalian de novo DNA methyltransferases. *Progress in Molecular Biology and Translational Sciences*, *101*, 255-285.
- Demeret, C., Garcia-Carranca, A., & Thierry, F. (2003). Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein. *Oncogene*, *22*, 168-175.
- Desaintes, C., Goyat, S., Garbay, S., Yaniv, M., & Thierry, F. (1999). Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells. *Oncogene*, *18*, 4538-4545.
- Domínguez-Catzín, V., Reveles-Espinoza, A. M., Sánchez-Ramos, J., Cruz-Cadena, R., Lemus-Hernández, D., & Garrido, E. (2017). HHPV16-E2 protein modifies self-renewal and differentiation rate in progenitor cells of human immortalized keratinocytes. *Virology Journal*, *14*(65), 1-13.
- Dong, G., Broker, T., & Chow, L. (1994). Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *Journal of virology*, *68*(2), 1115-1127.
- Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., & Murakami, I. (2016). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*, *25*, 2-23. doi:10.1002/rmv.1822
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses.

- Eurell, J. A. (2004). *Veterinary Histology*. UT, EUA: Teton NewMedia.
- Evans, M. R., James, C. D., Bristol, M. L., J., N. T., Wang, X., Kaur, N., . . . Morgan, I. M. (2019). Human Papillomavirus 16 E2 regulate keratinocyte gene expression relevant to cancer and the viral life cycle. *Journal of Virology*, 93(4), e01941-18.
- Ezhkova, E., Pasolli, A., Parker, J., Stokes, N., Su, I., Hannon, G., . . . Fuchs, E. (2009). Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. *Cell*, 136, 1122-1135.
- Foster, S. A., Barrett, M., & Galloway, D. A. (1998). Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation. *Molecular and Cellular Biology*, 18(4), 1793-1801.
- Gallareta Cervera, E. (2018). *Análisis del efecto de E2-VPH16 sobre la expresión de genes bivalentes en células troncales epiteliales*. Tesis de maestría, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Ciudad de México.
- Galloway, D. A., & Laimins, L. A. (2015). Human papillomaviruses: shared and distinct pathways for pathogenesis. *Current Opinion in Virology*, 14, 87-92. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2015.09.001>
- Graham, S. (2016). Human papillomavirus E2 protein: linking replication, transcription, and RNA processing. *Journal of virology*, 90(19), 8384-8388.

- Grm, H., Massimi, P., Gammoh, N., & Banks, L. (2005). Crosstalk between the human papillomavirus E2 transcriptional activator and the E6 oncoprotein. *Oncogene*, *24*, 5149-5164.
- Handy, D., Castro, R., & Loscalzo, J. (2011). Epigenetic modificaciones: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation*, *111*(23), 2145-2156.
- Harikumar, A., & Meshorer, E. (2015). Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells. *EMBO reports*, *16*, 1609-1619.
- Howe, F. S., Fischl, H., Murray, S. C., & Mellor, J. (2016). Is H3K4me3 instructive for transcription activation? *Bioessays*, *39*(1), 1-12.
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, *33*, 245-254.
- Jang, M., Anderson, D., van Doorslaer, K., & McBride, A. (2015). A proteomic approach to discover and compare interacting partners of papillomavirus E2 proteins from diverse phylogenetic groups. *Proteomics*, *15*, 2038-20500.
- Jin, Q., Yu, L. R., Wang, L., Zhang, Z., Kasper, L. H., Lee, J. E., . . . Ge, K. (2011). Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *The EMBO Journal*, *30*(2), 249-262.
- Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A., & Sakai, H. (2012). Productive lifecycle of human papillomavirus that depends upon squamous epithelial differentiation. *Frontiers in Microbiology*, *3*, 1-2.

- Kanwal, R., Gupta, K., & Gupta, S. (2015). Cancer epigenetics: an introduction. En M. Verma, *Cancer Epigenetics. Risk Assessment, Diagnosis, Treatment, and Prognosis* (págs. 3 - 23). New York: Human Press.
- Kumaki, Y., Oda, M., & Okano, M. (2008). QUMA: quantification tool for methylation analysis. *Nucleic Acids Research*, *36*, W170-W175.
- Laugesen, A., Westergaard Højfeldt, J., & Helin, K. (2019). Molecular mechanism directing PRC2 recruitment and H3K27 methylation. *Molecular Cell*, *74*, 8-18.
- Li, L. C., & Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, *18*(11), 1427-1431.
- Li, L., Li, C., Mao, H. D., Chan, W. Y., P., M., Luo, B., . . . Tao, Q. (2016). Epigenetic inactivation of the CpG demethylase TET1 as a DNA methylation feedback loop in human cancers. *Scientific Reports*, *6*, 26591.
- McBride, A. (2013). The Papillomavirus E2 proteins. *Virology*, *445*, 57-79.
- McBride, A. A., Romanczuk, H., & Howley, P. M. (1991). The papillomavirus E2 regulatory proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *266*(28), 18411-18414.
- Merlo, A., Herman, J. G., Mao, L., Lee, D. J., Gabrielson, E., Burger, P. C., . . . Sidransky, D. (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancer. *Nature Medicine*, *1*(7), 686-692.

- Muller, M., & Demeret, C. (2012). The HPV E2-host protein-protein interactions: a complex hijacking of the cellular network. *The Open Virology Journal*, 6, 173-189.
- Muller, M., Jacob, Y., Jones, L., Weiss, A., Brino, L., Chantier, T., . . . Demeret, C. (2012). Large scale genotype comparison of human papillomavirus E2-host interaction networks provides new insights for E2 molecular functions. *PLoS pathogens*, 8(6), e1002761.
- Pasquariello, N., Oddi, S., Malaponti, M., & Maccarrone, M. (2009). Regulation of gene transcription and keratinocyte differentiation by anandamide. *Vitamin and hormone*, 81, 441-467.
- Piechaczyk, M., & Farràs, R. (2008). Regulation and function of JunB in cell proliferation. *Biochemical Society Transactions*, 36, 864-867.
- Ptashne, M., & Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature*, 386, 569-577.
- Ramírez-Salazar, E., Centeno, F., Nieto, K., Valencia-Hernández, A., Salcedo, M., & Garrido, E. (2011). HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. *Virology Journal*, 8, 247-256.
- Rivera, R., & Bennett, L. (2010). Epigenetics in humans: an overview. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, 17, 493-499.
- Sanchez-Perez, A., Soriano, S., Clarke, A., & Gaston, K. (1997). Disruption of the human papillomavirus type 16 E2 gene protects cervical carcinoma cells from E2F-induced apoptosis. *Journal of General Virology*, 78, 3009-3018.

- Schuettengruber, B., Bourbon, H. M., Di Croce, L., & Cavalli, G. (2017). Genome regulation by Polycomb and Trithorax: 70 years and counting. *Cell*, 171, 34-57.
- Shen, X., Liu, Y., Hsu, Y. J., Fujiwara, Y., Kim, J., Mao, X., . . . Orkin, S. H. (2008). EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Molecular Cell*, 32, 491-502.
- Smith, J., Haberstroh, F., White, E., Livingston, D., DeCaprio, J., & Howley, P. (2014). SMCX and components of the TIP60 complex contribute to E2 regulation of the HPV E6/E7. *Virology*, 468, 311-321.
- Spriggs, C., & Laimins, L. A. (2017). Human Papillomavirus and the DNA damage response: exploiting host repair pathways for viral replication. *Viruses*, 9(232), 1-14.
- Terhune, S., Moorman, N., Cristea, I., Savaryn, J., Cuevas-Bennett, C., Rout, M., & Shenk, T. (2010). Human cytomegalovirus UL29/28 protein interacts with components of the NuRD complex which promote accumulation of immediate-early RNA. *PLoS pathogens*, 6(6), 1-15.
- Vösa, L., Sudakov, A., Remm, M., Ustav, M., & Kurg, R. (2012). Identification and analysis of papillomavirus E2 protein binding sites in the human genome. *Journal of Virology*, 86(1), 348-357.
- Walker, D., Brown, B. B., Tidy, J., & Smallwood, R. (2003). A study of the morphological parameters of cervical squamous epithelium. *Physiological measurement*, 24, 121-135.