



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“ANÁLISIS DEL EFECTO DE E2-VPH16 SOBRE LA
EXPRESIÓN DE GENES BIVALENTES EN CÉLULAS
TRONCALES EPITELIALES”**

T E S I S

Que presenta

QFB ESTEFANIA GALLARETA CERVERA

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

Septiembre, 2018

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Investigación en Biología Molecular y Celular del Cáncer (Lab. No. 1) del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección del Dr. José Efraín Garrido Guerrero y con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), mediante los fondos del proyecto CB256514.

Durante el desarrollo de este trabajo, la autora fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de registro 609367, por lo que manifiesta su sincero agradecimiento a esta Institución por el apoyo económico que le permitió realizar los estudios de Maestría.

Agradezco al M. en C. Víctor Hugo Rosales García, responsable de la Unidad de Citometría de los Laboratorios Nacionales de Servicios Experimentales (LaNSE) del CINVESTAV-IPN, por el apoyo y la asesoría técnica prestada para la realización de los experimentos de Citometría de Flujo, reportados en el presente trabajo.

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.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Efraín Garrido Guerrero, por abrirme las puertas de su laboratorio, por todo su apoyo, consejos, pláticas y por confiar en mí. Gracias por siempre estar pendiente y contribuir tanto en mi formación académica como personal.

Al Dr. Glustein Pozo Molina, por su participación y gran asesoría en el transcurso de este proyecto, por ayudar a mi formación y por su amistad.

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega, por su apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Biól. Pedro Chávez Olmos, por compartir sus conocimientos conmigo, tanto técnicos como de cultura general y por toda su ayuda durante mi estancia en el laboratorio.

A Bianca Hernández Martínez, por su apoyo con el material y limpieza del laboratorio, por sus pláticas y enseñanzas de la cultura mexicana, y por siempre sacarme una sonrisa.

Al M. en C. Víctor Hugo Rosales García y a la Unidad de Citometría de Flujo, por permitirme utilizar los equipos de la unidad y la asesoría del uso de estos, que sin ella no hubiera podido realizarse este trabajo así como por el tiempo invertido, las pláticas y su amistad.

A la Dra. Dulce María Delgadillo Álvarez y la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica, por las facilidades otorgadas y su asesoría en el uso de equipos de esta unidad.

Al Dr. Jairo Villanueva Toledo, por tomarse el tiempo de enseñarme a utilizar el separador de células, por transmitirme sus conocimientos y estar siempre pendiente.

A mis compañeros del laboratorio 1 de GyBM, Alicia, Edgar, Janet, Karen y Saida, porque de alguna forma siempre me apoyaron en mi estancia en el laboratorio y contribuyeron a mi formación, gracias por las pláticas y la convivencia.

A mis amigas de la maestría, Andrea, Brenda y Karina por hacer mis días en los cursos mucho más sencillos, por las largas horas de pláticas y por estar ahí siempre que las he necesitado. Y a mis amigos del CINVESTAV, Adrián, Diego y Nacho, porque sin todos ellos todo este proceso hubiera sido mucho más difícil. Gracias por ser mis amigos.

A mis amigos Adriana, Ricardo y Aldair, gracias por siempre hacerme sentir en casa, por cada plática y cada risa, y por todas las aventuras vividas en estos dos años.

A mi tía Elide, por ser mi segunda madre mientras estuve en la ciudad de México, por cuidarme y preocuparse por mí, muchas gracias.

A David, porque fuiste y eres mi más grande apoyo. Porque la distancia física entre dos personas no tiene nada que ver con la soledad.

A mis hermanos Tomás y Guillermo, por ser un ejemplo de perseverancia y por siempre apoyarme en todos mis planes.

Y por último y más importante, a mis padres, sin su apoyo nunca hubiera logrado ser lo que soy. Esto es por y para ustedes.

RESUMEN

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus de ADN que infecta la capa basal del epitelio escamoso estratificado, donde uno de sus blancos podrían ser las células troncales. E2 es uno de los genes virales expresados en la capa basal, y participa en las etapas tempranas de la infección. Sus principales funciones se relacionan con la regulación transcripcional, la iniciación de la replicación y la partición del genoma viral, a través de su interacción con múltiples proteínas celulares, la mayoría relacionadas con el proceso de transcripción. E2 interactúa con la proteína TAF1, parte del complejo de preiniciación de la transcripción y a su vez, este factor interactúa con otras proteínas de la maquinaria transcripcional, permitiéndole reconocer marcas de la cromatina, como H3K27me3, en conjunto con H3K4me3 forma la cromatina bivalente, altamente representada en células troncales embrionarias y de adulto, marcando genes cuya transcripción es muy baja, pero están listos para expresarse o silenciarse definitivamente. En este trabajo se analizó el efecto de la expresión de E2 del VPH16 sobre un grupo de genes con promotores bivalentes en células troncales embrionarias y cuya expresión es dependiente de TAF1 y modulada por E2. Se utilizó la línea celular HaCaT-E216 en la que el gen E2 de VPH16 ha sido transducido por infección lentiviral. Se separó células por citometría de flujo, posterior a su inmunotinción con anticuerpos anti α integrina y anti CD71, recuperándose la subpoblación α integrina^{bri}CD71^{dim}, determinándose en esta, en el resto de la población (PT-BD) y en la población total, el perfil de expresión de los genes seleccionados. El análisis de los niveles del ARNm reveló que E2 podría ocasionar una salida de la troncalidad de estas células, indicando la estimulación de la diferenciación y causando además un daño en la estructura celular. Estos cambios son ocasionados probablemente por interacciones con la maquinaria epigenética celular, ya que la evaluación de los niveles de H3K4me3 (marca de activación) en la población total, indicó que E2 provocó una disminución en la abundancia relativa de esta, y por lo tanto, un apagado de la expresión génica, correlacionando con los datos obtenidos por la medición de los niveles de expresión de los genes en la población total celular, sugiriendo que E2 de VPH16 ocasiona un apagamiento generalizado de grupos importantes de genes.

SUMMARY

Human papilloma virus (HPV) is a DNA virus that infects the basal layer of the stratified squamous epithelium, where one of the targets could be the stem cells. E2 is one of the viral genes that is expressed in the basal layer, and its proteic product participates in the early stages of infection. The main functions of this protein are related to transcriptional regulation, initiation of replication and the partition of the viral genome, activities that are performed through its interaction with multiple cell proteins, a number of this related to the transcription process. E2 interacts with TAF1 protein belonging to the pre-initiation complex of transcription and, in turn, this factor interacts with other proteins of the transcriptional machinery, which allows the recognition of chromatin tags, such as H3K27me3. This mark, in conjunction with H3K4me3, forms the bivalent chromatin, highly represented in embryonic and adult stem cells, marking genes whose transcription is very low, but can be rapidly express or silenced definitively. That is why in the present work the effects of E2 VPH16 expression were measured on a group of genes that have bivalent promoters in embryonic stem cells and whose expression is dependent on TAF1 and modulated by E2. For this purpose, the HaCaT-E216 cell line has been used in which the E2 gene of HPV16 has been transduced by lentiviral infection. The separation of cells was carried out by flow cytometry, after immunostaining with antibodies against $\alpha 6$ -integrin and anti CD71, and the subpopulation $\alpha 6$ -integrin^{bri}CD71^{dim} was recovered, being determined in this, as well as in the rest of the population (PT-BD) and in the total population, the expression profile of the selected genes. The analysis of the levels of transcripts revealed that E2 could cause an exit of stemness of these cells, since this expression profile indicates the stimulation of the differentiation, causing also a damage in the cellular structure. These changes are occasioned probably due to interactions with the cellular epigenetic machinery, since the evaluation of the levels of H3K4me3 (activation mark) in the total population indicates that E2 caused a decrease in the abundance of this mark, and therefore, a shutdown of gene expression, which correlates with the data obtained for the measurement of the expression levels of genes in the total cellular population, suggesting that E2 of HPV16 causes a generalized decrease of expression in important groups of genes.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. El epitelio	1
1.2. Marcadores de las subpoblaciones de la capa basal del epitelio	2
1.3. Generalidades de los Papilomavirus	3
1.4. Estructura y función de la proteína E2	6
1.5. Efectos de E2 sobre la maquinaria celular	7
1.6. Iniciación de la transcripción y TAF1	9
1.7. Promotores bivalentes e islas CpG	13
2. Antecedentes	15
3. Justificación	23
4. Hipótesis	25
5. Objetivos	25
5.1. Objetivo general	25
5.2. Objetivos específicos	25
6. Modelo de estudio	26
7. Estrategia experimental	27
8. Materiales y métodos	28
8.1. Cultivos celulares	28
8.2. Ensayo de actividad biológica de la proteína E2 (Transfección de LCR-Luc y ensayo de luciferasa)	28
8.3. Tinción con anticuerpos anti- $\alpha 6$ -integrina acoplado a Pacific Blue y anti-CD71 acoplado a APC/Cy7, y separación celular por citometría de flujo	31
8.4. Extracción de RNA a partir de células separadas	32
8.5. Reacción de RT PCR y RT-PCR en tiempo real	33
8.6. Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	34
8.7. Oligonucleótidos	37
9. Resultados	40
9.1. Selección de promotores y genes a analizar	40

9.2. Expresión de $\alpha 6$ -integrina y CD71 en células HaCaT-LacZ y subsecuente separación de células $\alpha 6$ -integrina ^{bri} /CD71 ^{dim}	42
9.3. Confirmación de la expresión de E2 en la línea celular HaCaT-E216	44
9.4. Expresión de $\alpha 6$ -integrina y CD71 en células HaCaT-E216	46
9.5. Comparación de niveles de expresión de genes de interés entre la Población Total de células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216	47
9.6. Comparación de niveles de expresión de genes de interés entre las subpoblaciones PT-BD y BriDim de células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216	48
9.7. Análisis de los genes seleccionados de acuerdo a su función	52
9.8. Inmunoprecipitación de la cromatina con α H3K9me3 y α H3 en la Población Total de células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216	58
10. Discusión	63
10.1. E2 apaga de forma general los genes en la Población Total	63
10.2. E2 tiene efectos diferenciales sobre la expresión génica en cada subpoblación celular componente del cultivo de células HaCaT	64
10.3. Efectos de E2 con base en la función de los genes analizados	65
10.3.1. Ciclo celular	66
10.3.2. Oncogenes	70
10.3.3. Genes con baja expresión en células HaCaT-LacZ	74
10.4. E2 modifica la abundancia de la marca de la cromatina H3K4me3	77
10.5. E2 interactúa con la maquinaria epigenética de células progenitoras	80
11. Conclusiones	84
12. Perspectivas	85
13. Referencias	86

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El epitelio

La epidermis es un tejido estratificado, de rápida renovación en el cual las células terminalmente diferenciadas se pierden continuamente de la superficie y son reemplazadas por proliferación en la capa basal adyacente a la membrana basal. Se cree que la regeneración celular se lleva a cabo por una jerarquía de células proliferativas dentro de la capa basal consistiendo de células troncales y células transitoriamente amplificadas (TA). En etapas tempranas de la diferenciación epidermal, las células basales se despegan de la membrana basal y migran a las capas suprabasales, en las que pasan por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos específicos de cada etapa que involucra cambios en la síntesis de las queratinas K1 y K10 (específicas de diferenciación). Entonces, las propiedades adhesivas de los queratinocitos basales están ligadas a su proliferación y diferenciación (Kaur, P. 2000).

Las células epidermales se adhieren a la membrana basal mediante moléculas de adhesión conocidas como integrinas, que comprenden una súper-familia de receptores heterodiméricos que consisten de una subunidad α y una β . En la piel humana normal, la expresión de estas moléculas de adhesión celular está restringida a la capa basal de la epidermis siendo $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, y $\alpha_6\beta_4$ las integrinas predominantes. Estas median primariamente la adhesión célula-matriz extracelular, aunque algunas integrinas tienen un papel importante en la adhesión intercelular. La integrina $\alpha_6\beta_4$ es expresada exclusivamente en la superficie basal de los queratinocitos en estructuras de adhesión especializadas denominadas hemidesmosomas y se une a la laminina-5 en la membrana basal (Kaur, P. 2000; Li, A. 1998).

Las células troncales epiteliales *in vivo* son definidas como una subpoblación menor de células basales, que se encuentran generalmente en reposo (quiescentes), con el mayor potencial proliferativo durante la vida del individuo y una capacidad individual de auto-renovación. Estas células dan lugar a las células TA, las cuales

son una poza de células basales proliferando activamente con una esperanza de vida limitada, y por lo tanto menor potencial proliferativo, que se diferencian y se pierden rápidamente del tejido (Kaur, P. 2000).

1.2. Marcadores de las subpoblaciones de la capa basal del epitelio

Se ha utilizado a los marcadores de superficie $\alpha 6$ integrina y al receptor de transferrina CD71 para separar células epidermales primarias provenientes de epidermis de prepucio de neonatos. Una expresión alta de la integrina sirve bien como marcador de células basales, permitiendo su separación de células más comprometidas que han iniciado su programa de diferenciación y de células suprabasales. CD71 es altamente expresado en múltiples células proliferando incluyendo los queratinocitos, por lo que es una buena opción para separar células TA de células troncales quiescentes (Kaur, P. 2004; Li, A. 1998).

Se ha logrado distinguir en epidermis humana una pequeña población de queratinocitos basales que expresan altos niveles de $\alpha 6$ integrina y niveles bajos de CD71 ($\alpha 6^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{dim}}$; Fig. 1) y que cumple con tres criterios muy importantes para considerarse células troncales mediante estudios *in vitro*: baja incidencia, quiescencia relativa determinada por análisis de ciclo celular y una gran capacidad proliferativa a largo plazo *in vitro*. En contraste, las células $\alpha 6^{\text{bri}}$ restantes que expresaron niveles altos de CD71 ($\alpha 6^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{bri}}$; Fig, 1) cumplieron el criterio predicho para las células TA: alta incidencia en la capa basal, ciclo celular activo, y un menor potencial proliferativo, relativo a las células $\alpha 6^{\text{bri}}\text{CD71}^{\text{dim}}$. Una tercera población de queratinocitos humanos primarios que expresan niveles bajos de $\alpha 6$ integrina denominada $\alpha 6^{\text{dim}}$ también fue observada consistentemente en preparaciones celulares (Fig. 1); estas células probablemente representen una mezcla de células basales y suprabasales que exhiben un potencial proliferativo limitado *in vitro* y que expresan K10 e involucrina, denominadas células diferenciadas tempranas (Kaur, P. 2004).

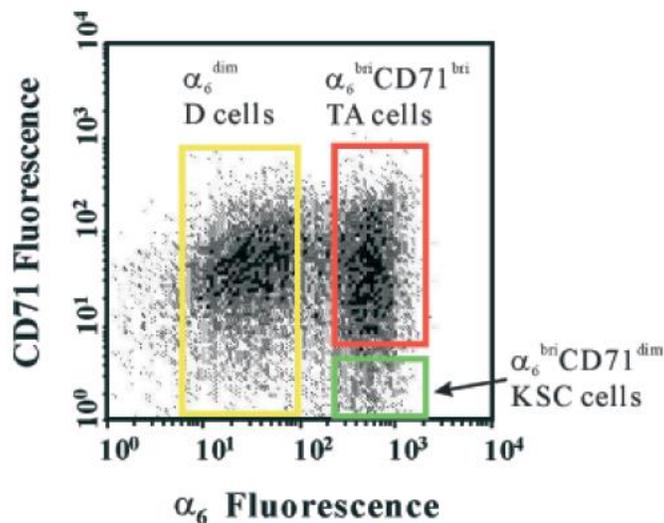


Figura 1. Fenotipo asignado a queratinocitos derivados de un cultivo primario de células epidermales de prepucio de neonato basándose en dos marcadores de superficie celular: α_6 integrina y el receptor de transferrina/CD71. Células troncales de queratinocitos (KSC), células transitoriamente amplificadas (TA) y células diferenciadas tempranas (D) (Kaur, P. 2004).

1.3. Generalidades de los Papilomavirus.

Los papilomavirus (PV) son virus de ADN de doble cadena circular de aproximadamente 8000 pares de bases, no envueltos, de estructura icosaédrica (de 50 a 60 nm de diámetro). Esta familia de virus infecta la superficie de tejidos como la piel o la mucosa, lo cual incluye el tejido de la boca, vías nasales y anogenital de animales vertebrados. En su genoma (Fig. 2) contiene una región regulatoria larga (LCR, *long control region*), que contiene sitios de unión a factores y el origen de replicación, así como dos grupos de ORFs, llamados tempranos (E) y tardíos (L). Los genes "L" codifican para las proteínas estructurales L1 y L2, siendo la primera la proteína estructural primaria de la cápside y la segunda, la proteína menor de la misma (Doorbar, J. 2015; Egawa, N. 2015; Galloway, D. A. 2015; Rogers, A. 2011). Los genes "E" como E1 y E2 codifican para proteínas necesarias para la replicación viral, mientras que el resto de los genes virales codifican para las proteínas tempranas, cuyas funciones principales se describen a continuación:

- E1: Helicasa.
- E2 Coactivador de la replicación viral a través del reclutamiento de E1 al origen de replicación y factor de transcripción de E6 y E7.
- E4: Proteína de fusión de E1^E4 en las etapas tardías del ciclo viral.
- E5: Proteína transmembrana pequeña que interactúa con el receptor de factor de crecimiento epidermal, EGF, y activa vías de señalización mitogénica.
- E6: Conduce la entrada del ciclo celular para permitir la amplificación del genoma en las capas epiteliales superiores. En los PV de alto riesgo se une y degrada a p53, también puede activar la telomerasa y contribuye a la transformación.
- E7: Conduce la entrada del ciclo celular para permitir la amplificación del genoma en las capas epiteliales superiores. En los PV de alto riesgo se une y degrada a retinoblastoma fosforilado (pRb) e induce inestabilidad cromosómica; es necesaria para la transformación celular (Egawa, N. 2015).

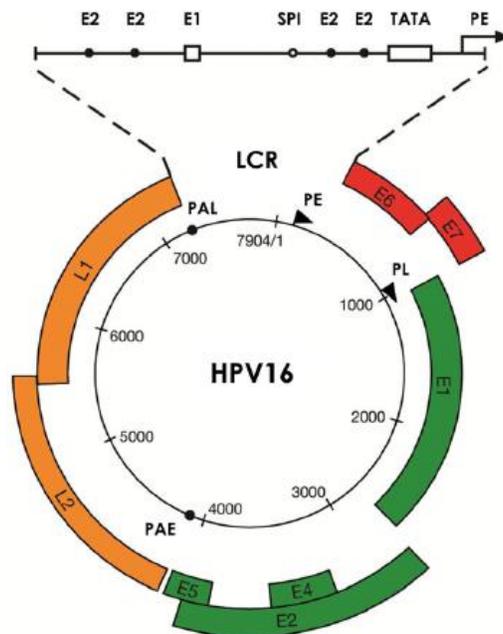


Figura 2. Organización genómica del VPH16. Se especifican en la región larga de control (LCR) sitios de unión a factores de transcripción (SP1, AP1, Oct1) así como para las proteínas virales E1 y E2. Además se especifica el sitio del promotor temprano (PE, también conocido como p97) y el promotor tardío (PL, p670), así como PAE y PAL que indican las posiciones del sitio de poliadenilación temprano y tardío (Doorbar, J. 2012).

La infección por este virus en un epitelio estratificado multicapa, como el ectocervix, requiere la presencia de una micro herida que permita el acceso de los viriones a la lámina basal. Estas células infectadas forman la reserva de la infección y en ellas el genoma viral es mantenido como un episoma de bajo número de copias. Al dividirse, produce células hijas que son empujadas hacia la superficie epitelial. En lesiones causadas por VPH de alto riesgo (como el VPH16), las células en las capas inferiores expresan las proteínas E6 y E7 y son conducidas a través del ciclo celular y estimuladas para dividirse (Fig. 3, núcleos rojos). En la capa media, se eleva la concentración de proteínas necesarias para que suceda la amplificación del genoma. En estas células se expresa E4 y se encuentran típicamente en las fases S ó G2 del ciclo celular (presencia de E4 marcada con verde). En las capas epiteliales superiores, las células abandonan el ciclo celular mientras que en un subconjunto de células E4 positivas, se sintetizan las proteínas virales L2 y L1, permitiendo el empaquetamiento de los genomas virales amplificados. Se piensa que en la zona de transformación cervical y en el endocervix, el VPH podría ser capaz de infectar células columnares epiteliales, células epiteliales de reserva y células de la unión escamo-columnar. La infección en estos tipos celulares puede asociarse con diferentes patrones de progresión de la enfermedad y con el desarrollo de adenocarcinoma (Doorbar, J. 2012).

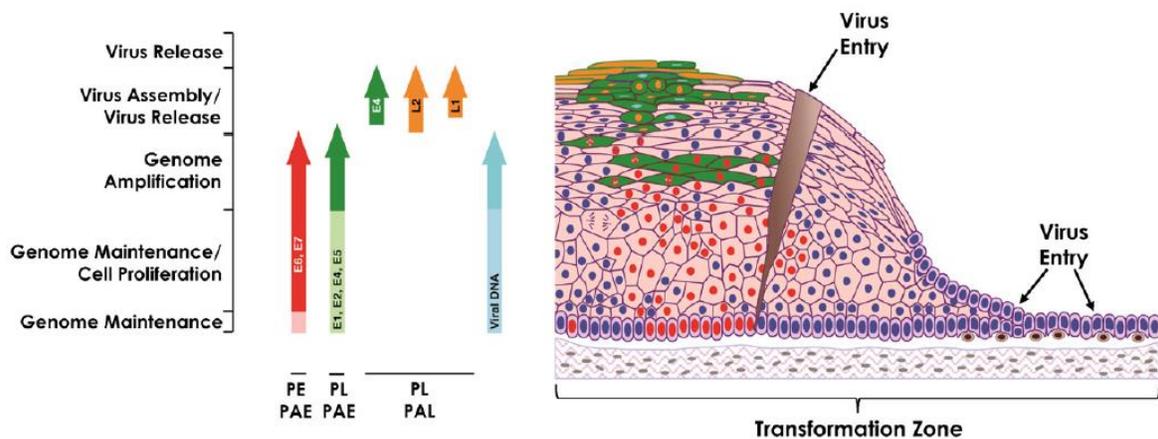


Figura 3. Ciclo de vida del VPH de alto riesgo en el epitelio cervical (Doorbar, J. 2012).

Cabe destacar que en casi todas las lesiones cervicales y tumores de alto grado el ADN viral es integrado en el genoma del huésped. Esta integración ocurre

generalmente en sitios frágiles, y los cambios en la expresión de genes en o cerca del sitio de integración pueden participar en la oncogénesis. Como se mencionó anteriormente, el producto del gen E2 es responsable de reprimir los oncogenes virales E6 y E7, por lo que la disrupción de su marco de lectura en tipos de alto riesgo, es crítico para el desarrollo de la tumorigénesis (Nguyen, H. P. 2014).

1.4. Estructura y función de la proteína E2

La proteína E2 tiene un papel crucial en el ciclo de vida de los PV, ya que sirve como un factor de replicación, regulador de la transcripción y factor de mantenimiento. La proteína completa tiene tres dominios: uno N-terminal de transactivación (TAD), uno de “bisagra” interno, y un dominio de unión al ADN (DBD) localizado en el C-terminal (Fig. 4). Tanto el dominio N-terminal como el C-terminal se encuentran relativamente bien conservados entre PVs. El DBD forma un barril- β dimérico y cada hebra contribuye con medio barril que contacta y moldea el ADN a través de dos α -hélices simétricas. La interfase del dímero tiene un centro hidrofóbico y usa puentes de hidrógeno extensivos entre subunidades para mantener una unión estrecha. La estructura del TAD consiste en tres α -hélices y una región hoja- β antiparalela. La secuencia y longitud de la región bisagra se encuentra pobremente conservada entre PV (Centeno, F. 2008; Rogers, A. 2011).

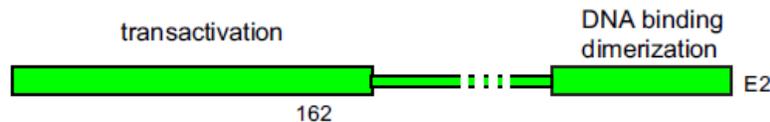


Figura 4. Dominios de transactivación, bisagra y de unión al ADN característicos de la proteína E2 (McBride, A. A. 2013).

E2 como dímero reconoce la secuencia consenso palindrómica de 12 pb, 5'-ACCGNNNNcGGT-3', en la cual los nucleótidos 4 y 9 permiten alguna variabilidad. La secuencia espaciadora de 4 nucleótidos varía por tipo de VPH, y se piensa que es crítica para determinar la afinidad de unión de E2, y potencialmente en la regulación génica. El homodímero E2 se une al ADN por las hélices alfa de cada

monómero haciendo contacto con dos surcos mayores sucesivos en el sitio blanco (Centeno, F. 2008; Rogers, A. 2011).

Cuatro sitios de unión de E2 a la LCR están conservados en la mayoría de los PV. Cada uno es regulado diferencialmente por una afinidad de unión variable para la proteína E2, lo que resulta en una variación en la replicación y efectos transcripcionales durante el ciclo de vida viral, probablemente debidos a estas diferencias en la afinidad de unión de E2, a la ligera variación de la secuencia así como a la metilación en estos sitios de unión. Esta proteína actúa como un activador cuando se une al sitio de unión distal de E2 pero reprime la transcripción cuando se une al sitio de unión proximal a la caja TATA del promotor E6/E7, interfiriendo con factores celulares necesarios para la activación transcripcional. Esta activación transcripcional por E2 involucra interacciones con otras proteínas como el factor de transcripción SP1, coactivadores CBP/p300 y AMF-1, y elementos de la maquinaria transcripcional basal como la proteína de unión a TATA (TBP) y el factor de transcripción IIB (TFIIB) (Centeno, F. 2008; Rogers, A. 2011).

Otro papel importante de E2 es su participación como factor de replicación auxiliar, ya que en el origen de replicación del ADN, E2 interactúa y carga a la proteína E1 del VPH, la helicasa de replicación, reclutando entonces la maquinaria de replicación del ADN celular (Domínguez-Catzín, V. 2017; McBride, A. A. 2013).

1.5. Efectos de E2 sobre la maquinaria celular

Como otras proteínas virales, E2 ejerce sus funciones al tener como blanco distintos factores celulares. La mayoría de las actividades asociadas con E2 han sido asociadas directamente a su interacción con factores celulares del huésped, ya sea para la expresión, segregación, y replicación del genoma viral o para proveer condiciones celulares adecuadas para ello. Estas interacciones se han detectado con todos los 3 dominios de E2, aunque la mayoría competen al TAD. En 2012, Muller y Demeret construyeron un interactoma de E2 basado en reportes bibliográficos (Fig. 5), en el cual obtuvieron cuatro familias funcionales principales de factores con los que interactúa E2: regulación de la transcripción, procesamiento

de RNA, apoptosis y regulación del ciclo celular; esto proporciona una idea del rango de funciones de E2 a partir de la interacción con el huésped.

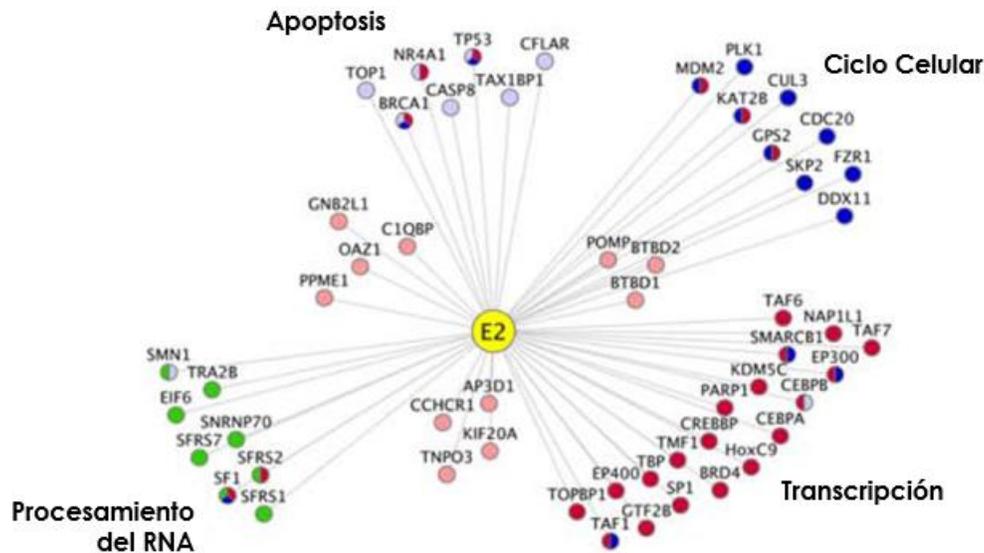


Figura 5. Representación de las cuatro principales familias funcionales blanco de E2. Las proteínas celulares compartidas por diferentes categorías son multicolor (Muller, M. 2012).

La familia funcional con mayor representación en este interactoma es la de transcripción. En esta, una de las proteínas incluidas es la proteína adaptadora de la cromatina Brd4, ya que E2 interactúa con ella estabilizando su asociación con la cromatina, permitiendo su unión con los cromosomas mitóticos y el paso del genoma viral a través de la división celular, teniendo entonces un papel crucial en la segregación de genomas virales episomales (Domínguez-Catzín, V. 2017; McBride, A. A. 2013).

La expresión de E2 también tiene un impacto en el perfil de transcripción celular, afectando la expresión de genes involucrados en procesos clave como proliferación, diferenciación, apoptosis y senescencia. Además, se ha demostrado que E2 induce predominantemente una regulación a la baja de la expresión génica. Estos cambios se producen probablemente por interacción con proteínas celulares como Sp1, ya que E2 pudiera desestabilizar interacciones proteína-proteína entre Sp1 y coactivadores, resultando en una regulación negativa de la función de

transactivación de Sp1. Sin embargo, E2 unido a un promotor vía Sp1, podría también promover el reclutamiento de coactivadores transcripcionales como p300/CBP y pCAF, llevando en algunos casos a una transactivación de los promotores celulares. En general, la expresión de E2 lleva a las células a un ambiente conveniente para el ciclo replicativo del virus (Domínguez-Catzín, V. 2017; Ramirez-Salazar, E. 2011).

1.6. Iniciación de la transcripción y TAF1

Se piensa que las proteínas con capacidad de activadoras transcripcionales como E2 actúan, al menos en parte, influenciando el ensamblaje y/o estabilidad de complejos de preiniciación de la transcripción. La expresión de miles de genes en células eucariotes es regulada a nivel de transcripción. Esta regulación involucra a grupos de genes empaquetados en cromatina con complejos multiprotéicos que controlan la dinámica de su relajamiento, permitiendo el inicio de la transcripción y la elongación de la misma. La inhabilidad de los factores de transcripción generales (GTFs) para acceder a la cromatina y el ADN envuelto alrededor de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 en subunidades repetitivas llamadas nucleosomas, implican que un requisito para iniciar la transcripción sea la alteración de la estructura de la cromatina. Dos clases generales de complejo/enzima han sido implicados en eventos alteradores de la cromatina: Complejos remodeladores de nucleosomas dependientes de ATP (SWI/SNF, RCS, ACS, CHRAC, NURF y Mi-2/NURD) y enzimas modificadoras de histonas (histona acetiltransferasas (HATs) e histonas deacetilasas (HDACs)). Sus actividades interdependientes preceden y facilitan la unión del factor de transcripción TFIID, el cual está compuesto de TBP (TATA-Binding Protein) y numerosos factores asociados a esta proteína (TAFs). Los TAFs (Fig. 6) contribuyen a la regulación transcripcional en múltiples niveles: como coactivadores que acoplan señales mediadas por activadores a la maquinaria basal, como factores que reclutan factores de selectividad que estabilizan a TFIID en los promotores, aumentando o reprimiendo las interacciones TBP:caja TATA, y en el caso de TAF1 como una enzima capaz de modificar proteínas vecinas y

potencialmente modular sus actividades (Albright, S. R. 2000; Carrillo, E. 2004; Wassarman, D. A. 2001).

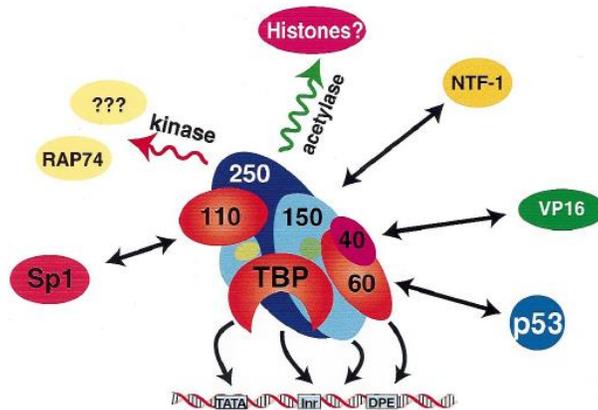


Figura 6. Funciones de los TAFs. Pueden servir como factores de reconocimiento de promotores al unirse a las secuencias Inr y DPE y en conjunto con las interacciones caja TATA:TBP, puede orientar al ADN al TFIID (flechas de una dirección). Ciertos TAFs son también blancos de activadores que son capaces de unirse a dominios de activación *in vitro* (flechas de doble dirección). Adicionalmente TAF1 (TAF_{II}250) tiene dos actividades enzimáticas, una cinasa y una acetilasa, que pueden modificar proteínas (flechas sinuosas). La composición de subunidades mostrada es el TFIID de *Drosophila* (Albright, S. R. 2000).

TFIID y TFIIB son los únicos componentes del complejo de preiniciación (PIC) que pueden unirse específicamente a promotores en el ADN. Se piensa que la función de TFIID comprende distintas actividades como el reconocimiento dependiente de activadores de los elementos de la secuencia promotora en el ADN, la generación de un ambiente de cromatina favorable para el ensamblaje del PIC y la iniciación de la transcripción, y modificaciones estructurales de GTFs para facilitar el ensamblaje del PIC y la iniciación de la transcripción; TAF1 contribuye a cada una de estas actividades (Carrillo, E. 2004; Wassarman, D. A. 2001).

TAF1 (TAF_{II}250, Fig. 7), la cual se ha demostrado que interactúa directamente con E2, es el componente de mayor peso molecular en TFIID y posee una variedad de actividades que probablemente contribuyan a los pasos iniciales de la transcripción por la ARN polimerasa II. Algunas de estas incluyen actuar como andamio para el

ensamblaje de otros TAFs y TBP en TFIID, la unión de activadores (como Tat de VIH, E1A de adenovirus, JUN, Rb, el proto-oncogen MDM2 y la ciclina D) para reclutar a TFIID en promotores particulares, y la regulación de la unión de TBP al ADN. TAF1 también tiene la capacidad de unirse a elementos iniciadores del núcleo (core) del promotor y residuos de lisina acetilados en histonas. Otra característica de TAF1 es que posee actividad cinasa, activador/conjugador de ubiquitina y acetilasa que modifican tanto a histonas como a factores generales de la transcripción (GTFs). Una vez reclutada al promotor, TAF1 puede participar en el ensamblaje del PIC al unirse a la subunidad RAP74 (TFIIF α) de TFIIF. Existe un amplio soporte experimental para el entendimiento del mecanismo por el cual los activadores transcripcionales modifican las actividades de TAF1 para promover la formación o estabilidad del PIC en el promotor. La interacción competitiva entre algunos activadores y TAF1 podría controlar la unión de TFIID a los promotores, ya que el N-terminal de TAF1 se une a la superficie de unión al ADN de TBP e inhibe las interacciones TBP-ADN. Sin embargo, los activadores ácidos JUN y TFIIA compiten con TAF1 por la unión con TBP, entonces alterando las propiedades de unión de TFIID al ADN. Además, algunos represores inhiben las actividades enzimáticas de TAF1 (como Tat y RB) que podrían promover el ensamblaje del PIC al modificar las estructuras de los GTFs y la cromatina. Así mismo, TAF1 se une a histonas con múltiples acetilaciones a través de 2 bromodominios en tándem localizados en la región C-terminal de la proteína, específicamente se une la histona H4 acetilada en las lisinas 5 y 12. Entonces, los bromodominios podrían dirigir a TFIID a promotores en la eucromatina (Carrillo, E. 2004; Centeno, F. 2008; Wassarman, D. A. 2001).

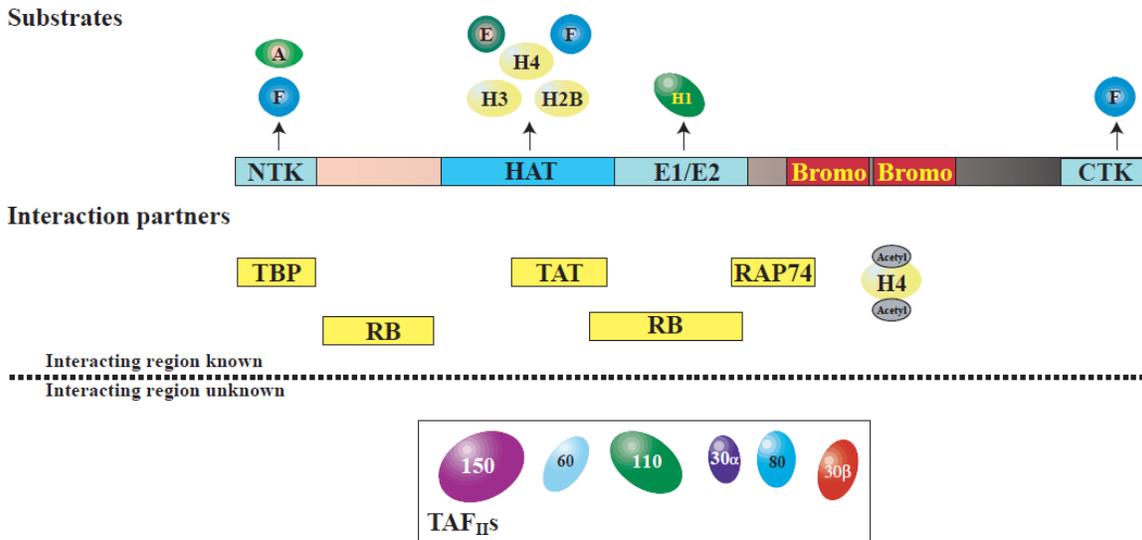


Figura 7. Diagrama esquemático de TAF1 (TAF_{II}250). Localización de los dominios enzimáticos (Dominio cinasa N-terminal (NTK), dominio cinasa C-terminar (CTK), dominio histona acetiltransferasa (HAT), y un dominio conjugador/activador de ubiquitina (E1/E2)) y bromodominios (Bromo) son indicados dentro de la proteína lineal. Los sustratos de las actividades enzimáticas están indicados por encima de la proteína TAF1, las proteínas con las que interactúan se indican por debajo de la proteína. Los sustratos y las proteínas con las que interactúa se abrevian de la siguiente manera: TFIIA (A), TFIIE (E), TFIIF (F), proteína de unión a TATA (TBP), proteína retinoblastoma (RB), Tat de VIH (TAT) y TFIIF α (RAP74) (Wassarman, D. A. 2001).

Recientemente se ha reportado que TAF1 forma un complejo con TAF7 (TAF1/7) el cual contiene una región estructural que forma un “bolsillo” en su superficie, que reconoce una marca inhibitoria de la cromatina, la lisina 27 trimetilada en la histona H3 (H3K27me3), específicamente mediante los residuos aromáticos encontrados en este. Se ha propuesto que el reconocimiento de H3K27me3 por TAF1/7 podría ayudar a inducir un arresto transcripcional temporal, el cual puede ser revertido por una fosforilación en la serina 28 de la histona H3 (pH3S28) para inducir la iniciación de la transcripción. Así mismo, se sugiere que el complejo TAF1/7 podría tener un papel en el reconocimiento de la cromatina bivalente en células troncales embrionarias, aunado al dominio PHD de TAF3 que reconoce la marca activadora H3K4me3 (Bhattacharya, S. 2014).

1.7. Promotores bivalentes e islas CpG

El desarrollo apropiado de los organismos superiores es un proceso altamente regulado en el que las vías epigenéticas son determinantes. Específicamente, una hipermetilación aberrante del ADN en islas CpG asociadas a promotores (CGI/promotor) de genes es una característica bien definida de células cancerígenas. El fenotipo metilador de islas CpG ha sido caracterizado por una hipermetilación concomitante de múltiples CGIs y ha sido descrito en diferentes tipos de tumores. Estudios en las bases moleculares de la hipermetilación en CGIs sugieren la existencia de un programa instructivo que se basa en la firma de las CGIs de la cromatina, también en células madre o troncales (Court, F. 2017).

Se ha destacado que genes que se encuentran marcados en células troncales embrionales o de adulto por las proteínas del grupo represivo polycomb y más específicamente por una firma de cromatina considerada bivalente, son propensos a ser metilados aberrantemente en células cancerígenas. CGIs/Promotores con cromatina bivalente están marcados concomitantemente por marcas “activas” H3K4me3 y “represivas” H3K27me3. Se piensa que los dominios de la cromatina bivalente reprimen la transcripción de genes a través de H3K27me3, mientras mantienen a los genes listos para la decisión de destinos alternativos, inducidos por estímulos de desarrollo específicos sobre la diferenciación de células troncales (Court, F. 2017).

Aunque múltiples dominios bivalentes son resueltos en la diferenciación, un grupo de promotores mantiene su estado de bivalencia incluso después de la diferenciación terminal. Entonces, la bivalencia podría no reflejar simplemente un estado transitorio de cromatina flexible durante la diferenciación, sino una condición presente en la mayoría o hasta en todos los tipos celulares. Apoyando esta idea, se han identificado dominios bivalentes en diferentes tipos celulares no troncales, como células T humanas diferenciadas, en donde se encontró que genes expresados débilmente poseen marcas adicionales de acetilación en H3K9 y H3K14 junto con H3K4me3 y H3K27me3 en sus promotores. Consistentemente, se han reportado superposiciones entre firmas de expresión de genes de células troncales

y tumores agresivos. En conjunto, estas observaciones llevan a la hipótesis que, además de mediar el silenciamiento estable de genes supresores de tumores, la mayor consecuencia de la hipermetilación de CGI es mantener aberrantemente a las células cancerosas en un estado similar al de las células troncales (poca capacidad de diferenciación y autorenovación ilimitada) que contribuye a la iniciación del cáncer y su progresión (Court, F. 2017; Harikumar, A. 2015).

Análisis integrativos recientes de todo el genoma, revelaron que la hipermetilación aberrante de CGIs afecta principalmente a genes que ya están representados en el tejido normal, indicando que la mayoría de estos genes no están involucrados en la carcinogénesis. Debido a lo anterior se ha propuesto una hipótesis alternativa en la cual la represión estable provocada por la hipermetilación aberrante del ADN en CGIs/promotores restringe la plasticidad epigenética de las células cancerosas y su habilidad de adaptarse después de cambios ambientales, así como durante la formación de metástasis o el tratamiento, actuando entonces como un mecanismo protector en contra de la progresión del cáncer (Court, F. 2017).

Se ha reportado que una gran cantidad de productos de genes con regiones promotoras bivalentes se encuentran involucrados en procesos de desarrollo y vías de diferenciación celular, mientras que en procesos metabólicos basales, ciclo celular y vías de reparación, se encuentran mayormente asociados genes con promotores que únicamente poseen la marca H3K4me3. Además se ha observado que componentes del Complejo Represor Polycomb 2 (PRC2), que medía la deposición de H3K27me3, están enriquecidos en promotores bivalentes, especialmente EZH2 (92.8%). Un estado sin metilación y transcripcionalmente inactivo en las islas CpG es suficiente para promover el reclutamiento de PRC2. Como resultado, la bivalencia es la firma de CGIs transcripcionalmente inactivos (Court, F. 2017).

2. ANTECEDENTES

Los efectos biológicos de la proteína E2 del VPH en células de mamífero han sido estudiados generalmente utilizando líneas celulares cancerosas, transfectadas transitoriamente. Estudios tempranos en líneas celulares derivadas de carcinoma cervical que poseen el genoma de algún VPH (VPH positivas), indicaron que una sobre-expresión transitoria de E2 induce apoptosis en ellas debido a la represión de la expresión endógena de los genes E6/E7. Sin embargo, en células negativas para VPH la sobre-expresión de E2 también induce apoptosis, independientemente de la transactivación y mediada por la activación de la caspasa 8. Por otra parte, se ha observado que la expresión sostenida de E2 en células VPH positivas, induce un arresto prolongado del crecimiento e induce senescencia irreversible, probablemente como una vía predeterminada para células que abandonan el ciclo celular, ya que la mayoría de estas células son incapaces de diferenciarse terminalmente, como es el caso de las células HeLa (Burns J. E. 2010; Domínguez-Catzín, V. 2017).

Entonces, los efectos observados de E2 sobre los procesos de apoptosis y senescencia podrían estar relacionados con su papel en diferenciación, ya que es bien conocido que un paso crítico para comenzar este proceso, es el arresto en el ciclo celular seguido de la expresión de genes involucrados en la diferenciación temprana. Si estos genes no se expresan correctamente, las células podrían mantener un estado de senescencia irreversible y progresar a apoptosis o inmortalización (Domínguez-Catzín, V. 2017).

En células HaCaT (queratinocitos inmortalizados espontáneamente) transducidas con construcciones de E2, en las que se detectaron niveles bajos de esta proteína, se ha obtenido evidencia de una morfología diferenciada, incluyendo células elongadas y colonias multicapa. A la par se ha reportado un aumento en marcadores de diferenciación epidermal como involucrina, filagrina y citoqueratinas 1 y 10, así como aumento de marcadores de senescencia. En el contexto del ciclo de vida del virus, esto no es inesperado, ya que aunque el virus requiere que la célula se

mantenga dentro del ciclo celular para establecer una infección y amplificar su genoma, también necesita que la célula hospedera vuelva a entrar a procesos de diferenciación para que se complete el ciclo viral, y así por último ensamblar las partículas virales. Por lo tanto la expresión de E2 puede no sólo influenciar la expresión de E6 y E7 afectando el crecimiento celular, sino también estimular la diferenciación, lo cual parece ser un efecto directo de E2 sobre la expresión génica celular. Cabe destacar que una diferenciación normal terminal de queratinocitos no involucra senescencia, sin embargo, las células HaCaT en un cultivo en monocapa no pueden diferenciarse por completo, por lo que puede esperarse la senescencia bajo estas condiciones (Burns J. E. 2010).

Nuestro grupo de trabajo demostró la presencia de una subpoblación de células con características de troncales en la línea celular HaCaT. Este hallazgo se logró mediante un procedimiento que incluyó la inmunodetección simultánea de los marcadores $\alpha 6$ -integrina y CD71, y la separación de subpoblaciones por citometría de flujo (Fig 8. panel a). Esta estrategia permitió identificar la presencia de tres subpoblaciones con diferentes inmunofenotipos: $\alpha 6$ -integrina^{dim} ($8.16 \pm 0.52\%$), que corresponde a las células diferenciadas tempranas; $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{bri} ($87.27 \pm 1.21\%$), correspondiente a las células transitoriamente amplificadas (TA) y $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} como una subpoblación menor ($1.16 \pm 0.08\%$), correspondiente aparentemente a células troncales. Para corroborar estos resultados se realizaron ensayos en los que se evaluó la capacidad de estas subpoblaciones separadas mediante citometría (“sort”) después de la tinción y resembradas en placas, para auto-renovarse regenerando los inmunofenotipos normales en cultivo, su habilidad de enriquecimiento y la morfología de colonias en ensayos clonogénicos que permite distinguir tres tipos: holoclonas, meroclonas y paraclonas, que reflejan su grado de diferenciación y capacidad de proliferación.

La subpoblación $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} restauró el inmunofenotipo de la población celular total, y después de 2 rondas de “sort” y resembrado, la población incrementó de $2.8 \pm 0.54\%$ a $3.9 \pm 0.33\%$ (Fig. 8, pánenes a y b). La resiembra de las subpoblaciones no- $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} ($\alpha 6$ -integrina^{dim} y $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{bri})

generó únicamente células no- $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim}. En un ensayo clonogénico, el porcentaje de holoclonas derivadas de la subpoblación $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} (potencialmente troncales o “stem-like”) después del “sort” y resiembra fue considerablemente mayor que en aquellos con morfología de paraclona en ambos ensayos de enriquecimiento ($62 \pm 2\%$ vs $38 \pm 3.5\%$ y $68 \pm 5.5\%$ vs $32 \pm 3.5\%$) (Fig. 8, panel c), mientras que la morfología observada después de resementar la subpoblación no- $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} fue principalmente de paraclonas (2% vs $98 \pm 1\%$ y 0% vs 100%). Finalmente, la evaluación de los niveles de ARNm de tres de los más importantes factores de troncalidad (*SOX2*, *NANOG* y *OCT4*) en las diferentes subpoblaciones aisladas por “sort” (Fig. 8, panel d y e) indicó que estos genes son expresados en altos niveles en la subpoblación $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim}, pero no en la no- $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim}. Estos resultados demostraron que la línea celular HaCaT contiene una subpoblación de células progenitoras (Domínguez-Catzín, V. 2017).

Posteriormente se evaluaron los efectos de la expresión de la proteína viral E2 en el fenotipo $\alpha 6$ -integrina/CD71 en la línea celular HaCaT transducida con E2-VP16, por medio de citometría de flujo. Este análisis evidenció cambios en la abundancia relativa de las tres subpoblaciones que constituyen la línea celular cuando E2-VP16 es expresado. Se observó un claro aumento en las células diferenciadas tempranas ($\alpha 6$ -integrina^{dim}) pasando de $8.16 \pm 0.52\%$ a $54 \pm 1.34\%$, mientras que la subpoblación “stem-like” ($\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim}) disminuyó de $1.16 \pm 0.08\%$ a $0.55 \pm 0.06\%$, sugiriendo que la expresión de este gen viral estimula la diferenciación temprana de la línea celular HaCaT (Fig. 9). Esto sugiere que la proteína viral tiene un efecto similar que agentes inductores de la diferenciación reportados previamente. Este comportamiento podría deberse tanto a una regulación transcripcional directa en vías particulares, así como a mecanismos indirectos a nivel epigenético, en regiones que regulan la decisión del destino de la célula a mantenimiento de la troncalidad o hacia diferenciación (Domínguez-Catzín, V. 2017).

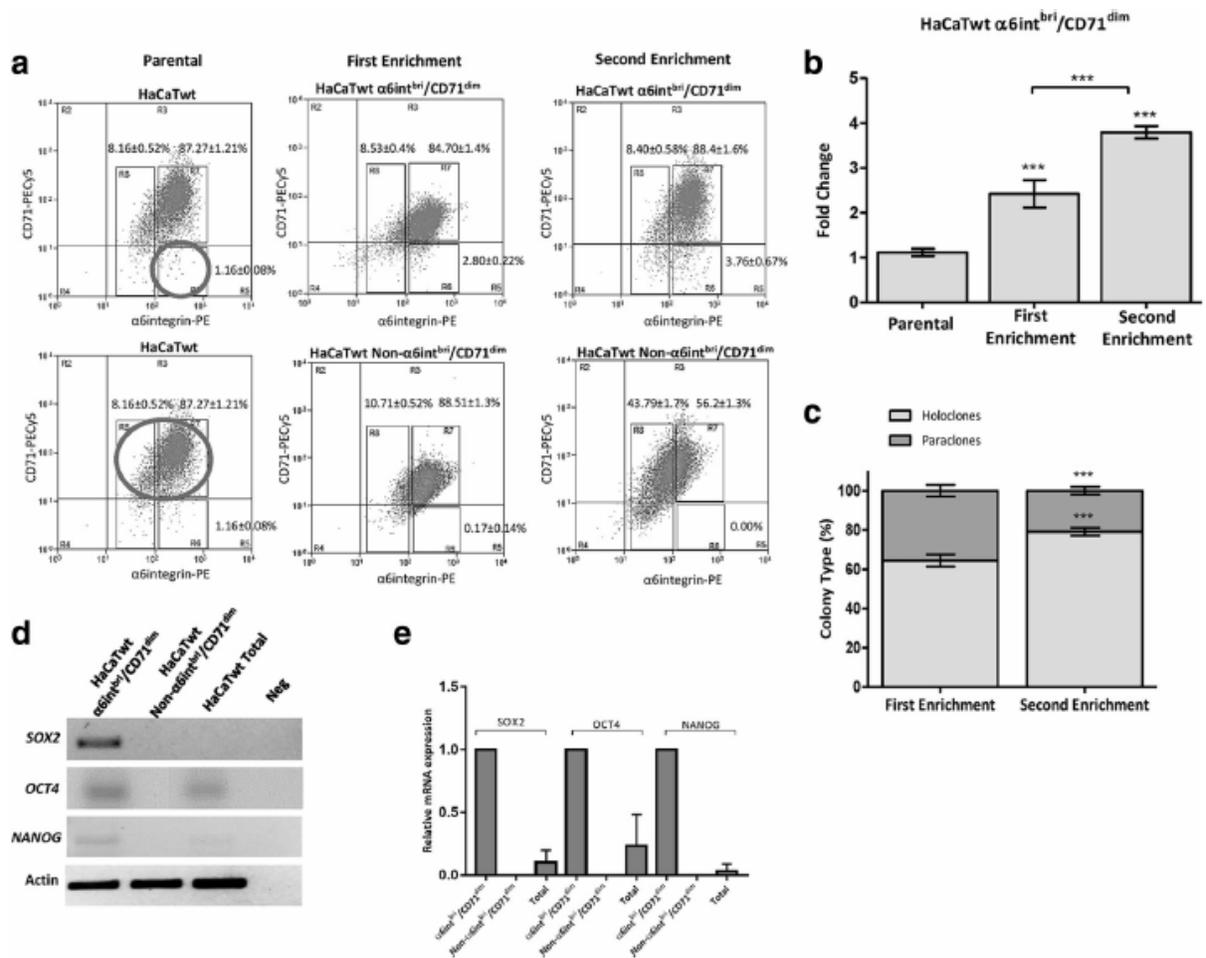


Figura 8. La línea celular HaCaT posee una subpoblación de células “troncales”. **a)** Análisis de citometría de flujo para la expresión de $\alpha 6$ -integrina y CD71 en células HaCaT exhibiendo tres fenotipos distintos: $\alpha 6$ -integrina^{dim} (R8), $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{bri} (R7) y $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} (R6). Los paneles superiores corresponden a ensayos de enriquecimiento por “sort” y resembrado únicamente de células de la subpoblación $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim}, mientras que los paneles inferiores de las subpoblaciones $\alpha 6$ -integrina^{dim} y $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{bri}. **b)** Gráfica de barras de dos rondas de enriquecimiento de la subpoblación $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} en el ensayo de auto-renovación. **c)** Gráfica de barras de los ensayos de clonogenicidad de la subpoblación $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} sembrados después de una ronda de enriquecimiento. **d)** Análisis RT-PCR para la expresión de marcadores de células troncales (SOX2, OCT4 y NANOG) en la subpoblaciones $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim}, no- $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} y población total de la línea celular HaCaT. **e)** Análisis RT-qPCR para la expresión de SOX2, OCT4 y NANOG en células HaCaT silvestres totales, después de clasificarlas en las subpoblaciones $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} y no- $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} (Domínguez-Catzín, V. 2017).

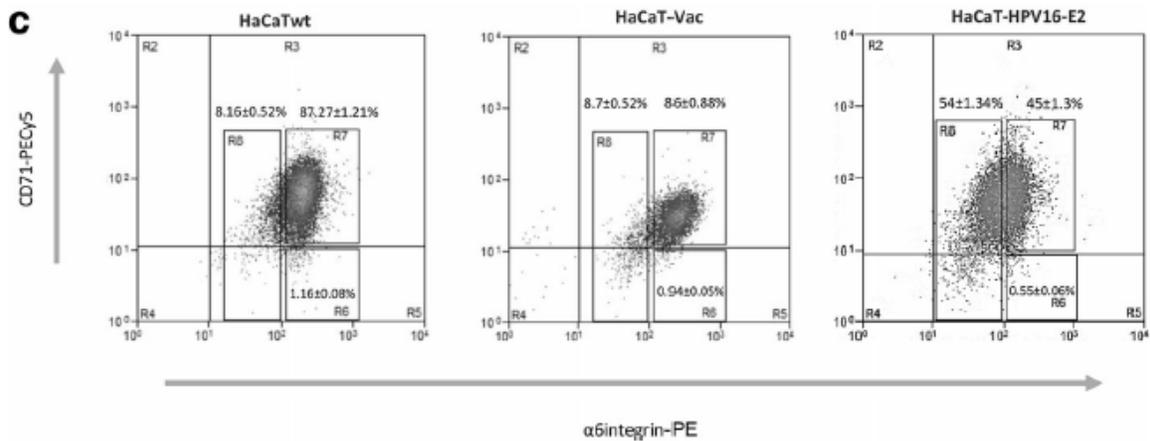


Figura 9. La expresión de E2 de VPH16 modifica el perfil de las subpoblaciones $\alpha 6$ -integrina/CD71 en la línea celular HaCaT. Análisis de citometría de flujo representativo para el perfil de subpoblaciones de $\alpha 6$ -integrina/CD71 en células HaCaT-VPH16-E2. La subpoblación R6 disminuye casi un 50% mientras que la R8 aumenta al menos 5 veces en estas células (Domínguez-Catzín, V. 2017).

Por otra parte en nuestro grupo de trabajo se ha demostrado la interacción *in vitro* de E2-VPH16 y TAF1 por medio de ensayos de unión *in vitro* (captura), tipo “pull-down” modificado. En la Fig. 10b se observa como la proteína E2-HPV16 interactúa directamente con TAF1, específicamente por medio del dominio NTK. Esto sugiere que la región amino terminal de TAF1 (donde se localiza el dominio amino-cinasa) es responsable de la interacción directa con E2 *in vitro*, mientras que la región carboxilo aparentemente no está involucrada en esta interacción. Esta región que contiene el dominio amino-cinasa es requerida para la interacción con otros componentes de la maquinaria de transcripción basal, incluyendo TBP y la interacción y fosforilación de $II\alpha\beta$ (subunidad de TFIIA) y RAP74 (componente mayoritario de TFIIIF). Posteriormente se identificó que el dominio de E2-VPH16 con el que sucede la mayor interacción con TAF1 es el dominio de unión a ADN, aunque también en menor grado se observó su interacción con proteínas mutantes de E2 que contienen únicamente el TAD; sin embargo, la proteína recombinante que contiene únicamente la región bisagra no mostró interacción (Fig. 10d). Esto indica que tanto la región amino, como la carboxilo de la proteína E2-VPH16, con actividad biológica importante, están involucradas en la unión a la región amino terminal de

TAF1, lo que como consecuencia podría modular la actividad transcripcional de E2. El dominio TAD de E2 ha sido implicado en interacciones con varios cofactores celulares de transcripción como CBP/p300 y P/CAF, los cuales están generalmente ligados a la función activadora transcripcional de E2. Sin embargo, esta región también ha sido involucrada en la interacción con Brd4, inhibiendo la activación de la transcripción mediada por E2 (Centeno, F. 2008).

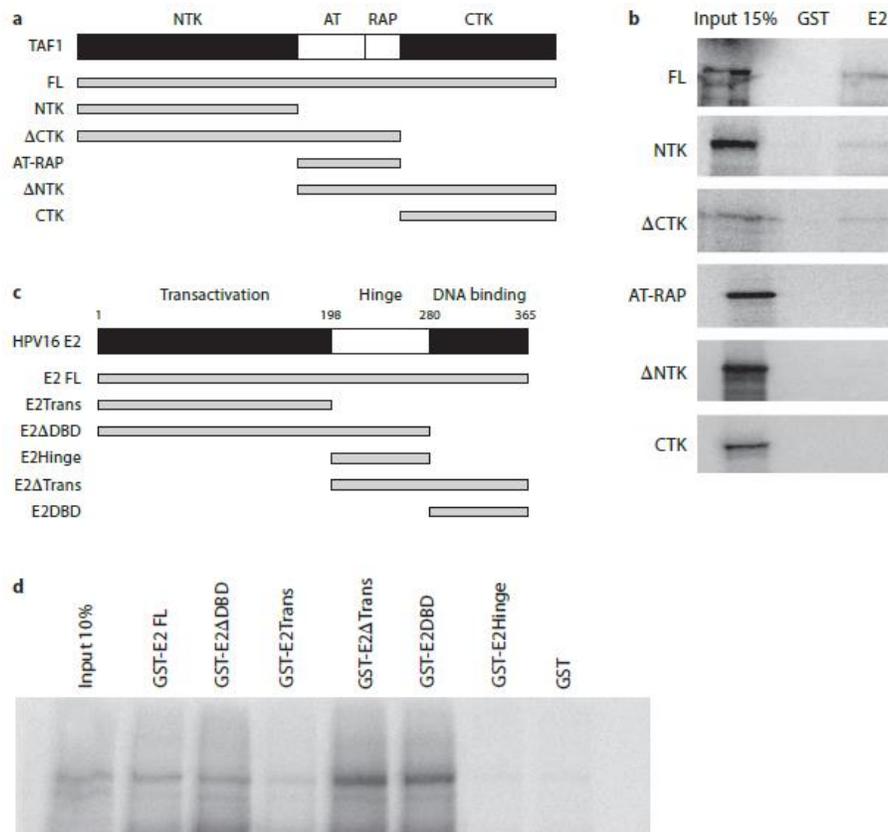


Figura 10. Evidencia de la interacción directa de E2-VP16 con TAF1 *in vitro*. **a)** Representación esquemática de TAF1 de longitud completa y las mutantes de delección usadas en los ensayos de captura ó “pull-down” modificado, para mapear los dominios que interactúan con E2. NTK= Dominio cinasa amino-terminal; CTK= Dominio cinasa carboxilo-terminal; AT= Dominio acetyl-transferasa; RAP= Dominio de unión a Rap74. Todas las proteínas fueron marcadas con ³⁵S en un sistema acoplado transcripción-traducción. **b)** Interacción directa de NTK de TAF1 con E2-HPV16. **c)** Representación esquemática de la proteína E2-HPV16 y las construcciones GST-E2 deletadas utilizadas para los ensayos de unión *in vitro*. **d)** Mapeo de los dominios de E2 que interactúan con TAF1 *in vitro* (Centeno, F. 2008).

Para analizar la significancia funcional de la interacción E2-TAF1 y el papel de TAF1 en las funciones de regulador de la transcripción de genes virales de E2, se evaluaron dos diferentes escenarios con promotores artificiales regulando un gen reportero de luciferasa “río abajo”: un promotor artificial de respuesta mínima a E2 en el que cuatro sitios de unión a E2 (E2BS) fueron colocados a más de 50 pb “corriente arriba” de la caja TATA y la secuencia iniciadora TdT (sin otros sitios de unión para factores de transcripción en el promotor, Fig. 11a, pTi4XE2-Luc), y un promotor natural de VPH (LCR-HPV18) donde los sitios de unión de E2 están localizados tres bases corriente arriba de la caja TATA (Fig. 11c, p18URR-Luc). Se observó que la actividad transcripcional del promotor responsivo a E2 pTi4XE2-Luc aumentó cuando se cotransfectó pcDNA3-TAF1, sugiriendo que la interacción TAF1-E2 observada *in vitro* podría tener también un efecto funcional en la regulación de la actividad de transactivación de E2 (Fig. 11b); probablemente al reclutar componentes de la maquinaria basal transcripcional al promotor y entonces activando la transcripción. Por otra parte, la represión transcripcional inducida por E2 de la construcción p18URR-Luc también fue modificada por la sobre-expresión de TAF1, resultando en el alivio de la represión inducida por E2 (Fig. 11d). La interacción entre estas proteínas podría participar en la modulación de las propiedades transregulatorias de E2, con consecuencias biológicas muy importantes. Además, esta interacción podría jugar un papel importante en el reclutamiento de TFIID y en la formación y estabilización del PIC, donde E2 podría contactar adicionalmente a TFIIB (Centeno, F. 2008).

Aunque los primeros efectos observados de la expresión de E2 fueron relacionados con apoptosis y senescencia celular, estudios más recientes han demostrado que E2 es capaz de manipular el destino celular con una tendencia a la diferenciación de las células. Por lo tanto, es interesante conocer el efecto que tendría la expresión de esta proteína específicamente en la subpoblación de células progenitoras de queratinocitos y si este efecto se encuentra relacionada con la demostrada interacción con la proteína TAF1 y la maquinaria de transcripción celular, así como con las marcas de la cromatina de los genes bivalentes.

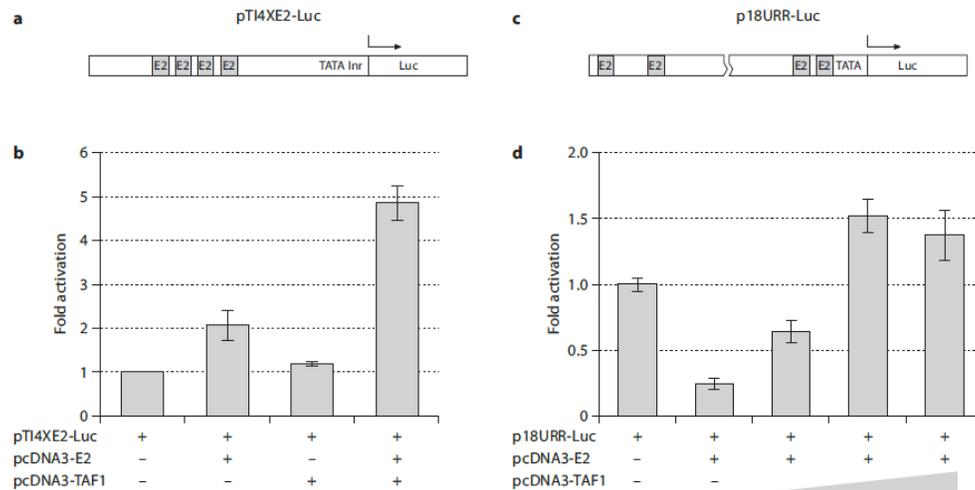


Figura 11. TAF1 modula la actividad transcripcional de E2. **a)** Representación esquemática del promotor de respuesta mínima de E2 en pTi4XE2Luc. Esta construcción fue generada posicionando cuatro sitios de unión de E2 corriente arriba de la caja TATA y del Inr del vector pTiLuc. **b)** TAF1 coopera con E2 para activar la transcripción E2-dependiente. **c)** Representación esquemática de la LCR de VPH18 en el vector p18URR donde la posición de los sitios de unión de E2 es indicada. Los sitios de unión de E2 localizados cerca de la caja TATA son responsables de la represión mediada por E2. **d)** La sobre-expresión de TAF1 alivia la represión mediada por E2 de la LCR de VPH18 (Centeno, F. 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

Con base en los antecedentes presentados anteriormente es evidente que el papel de la proteína E2 no se encuentra restringido a la regulación de la expresión de los oncogenes virales E6 y E7, sino que interactúa funcionalmente con la maquinaria celular, involucrándose en procesos como ciclo celular, apoptosis, proliferación y diferenciación. Esto podría ser consecuencia de su interacción física con diversas proteínas celulares, como TAF1, lo cual generaría un cambio en el entorno celular que provocaría un ambiente favorable para la replicación del virus. Los datos obtenidos a través del estudio de los efectos de la expresión de E2 en un ambiente en el que el resto del genoma del VPH está ausente, han demostrado la capacidad de E2 para manipular el destino celular con una importante tendencia a la diferenciación. Esto, aunado a la demostrada interacción *in vitro* de E2-VPH16 con TAF1, sugiere que una posible vía para que esta regulación suceda, pudiera ser mediante el uso de este factor de transcripción celular, al modificar la unión de este a promotores de genes particulares a través de sus marcas en la cromatina, y cambiando los niveles de expresión de sus transcritos.

Pudiera suponerse que la expresión de los genes virales en cada una de las subpoblaciones de las células epiteliales es distinta, por lo que al ser las células progenitoras epiteliales un potencial punto de infección del VPH y contar con una mayor abundancia de genes con promotores en estado bivalente, se vuelve muy atractivo e interesante conocer cuál es la repercusión de la expresión de E2 en esta subpoblación.

Es por ello que en este trabajo se analizaron los cambios a nivel transcripcional causados por la proteína E2 del VPH16 en un ambiente carente del resto del genoma del virus, en las diferentes subpoblaciones presentes en la línea celular HaCaT, analizando también si la presencia de E2 en este ambiente celular, provoca cambios en las marcas epigenéticas de la cromatina, específicamente en la H3K4me3.

El conocer con mayor detalle la dinámica que se establece entre la expresión de E2 y la célula epitelial, podría permitirnos entender mejor el papel de este gen en el ciclo viral, así como su relación con los pasos iniciales del desarrollo de la patología relacionada con este virus, teniendo como consecuencia la visualización de potenciales herramientas terapéuticas contra su infección.

4. HIPÓTESIS

La expresión de E2 de VPH16 en células troncales de la línea celular HaCaT modifica la actividad transcripcional de ciertos promotores bivalentes debido a cambios en las marcas epigenéticas de la cromatina.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General:

Conocer el efecto que tiene la expresión de E2 del VPH16 sobre la actividad transcripcional de genes con promotores bivalentes en células troncales de la línea celular HaCaT.

5.2. Objetivos Específicos:

-Comprobar la expresión del gen E2 de VPH16 en la línea celular HaCaT-E2-VPH16.

-Realizar la separación de células troncales epiteliales de las líneas celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E2-VPH16, a partir de la tinción con $\alpha 6$ -integrina/CD71.

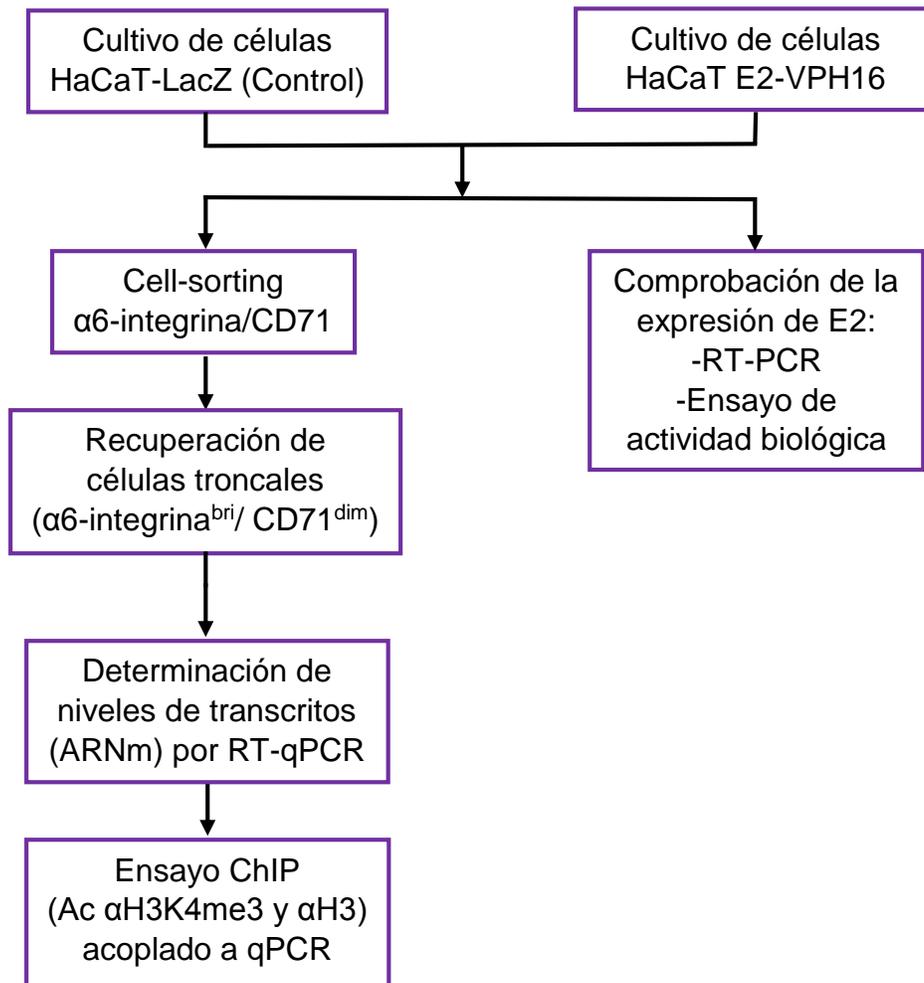
-Determinar el nivel de expresión del RNAm de los genes con promotores bivalentes por RT-qPCR.

-Determinar la presencia de la marcas de la cromatina H3K4me3 en genes cuya expresión sea modificada por E2 en población total, por medio de ChIP y qPCR.

6. MODELO DE ESTUDIO

Células HaCaT: Línea celular de queratinocitos inmoratizados espontáneamente transformados proveniente de queratinocitos humanos adultos. VPH negativa, p53 mutada (posee dos mutaciones: H179Y y R282W en alelos separados), competente a diferenciación (Boukamp, P., 1988). En este trabajo se utilizaron 2 líneas creadas por transducción lentiviral a partir de células HaCaT en nuestro grupo de investigación: HaCaT-LacZ y HaCaT-E216.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Cultivos celulares

Para la realización de este trabajo se utilizaron dos líneas celulares, HaCaT-LacZ y HaCaT-E216. Ambas líneas celulares provienen de queratinocitos inmoratizados espontáneamente transformados derivados de queratinocitos humanos adultos. Ambas contienen un transgén distinto; la primera de ellas contiene un segmento de 250 pb del gen *lac Z* perteneciente al operón *lac* de *E. coli*, mientras que la línea HaCaT-E216 contiene el gen que codifica para la proteína E2 del VPH tipo 16.

Ambas se cultivaron en medio DMEM (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 4 mM de L-Glutamina, 1 mM de piruvato, Penicilina y Estreptomina 100 μ L/mL. Además, se agregó al medio 0.35 μ g/mL de Puromicina por al menos 5 días, ya que el transgén de ambas líneas celulares está acoplado a un gen que codifica para la resistencia a este antibiótico. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

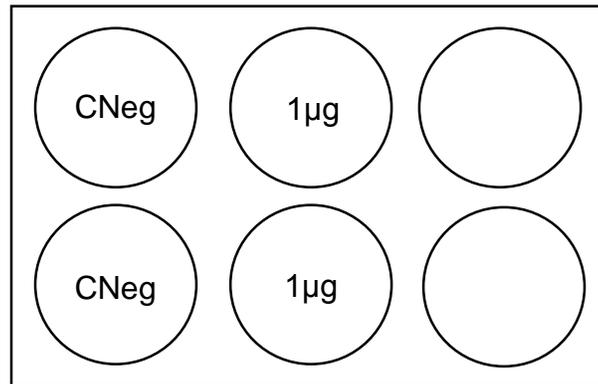
8.2. Ensayo de actividad biológica de la proteína E2 (Transfección de LCR y ensayo de luciferasa)

Para estos ensayos de transfección se utilizó un vector pGL4.10 el cual contiene el gen reportero de luciferasa (*luc2*) al que se le clonó la región larga de control (LCR) del VPH tipo 18, generando la construcción pGL4.10LCR18. Se utilizó esta región debido a que presenta sitios de unión de la proteína E2, y cuando es introducido a una línea celular que expresa este gen viral, la proteína se unirá y promoverá la transcripción del gen reportero, generándose la proteína luciferasa que es por sus propiedades luminiscentes es fácilmente medible.

Para realizar el ensayo de transfección, se requirió cierta cantidad de ADN plasmídico, por lo que se sembraron bacterias DH5a previamente transformadas con esta construcción. La extracción de plásmido se llevó a cabo empleando la metodología de lisis alcalina. Una de las colonias bacterianas fue inoculada en un

tubo de ensayo conteniendo 5 mL de medio LB con 100 ng/mL de ampicilina y se incuban durante 14 hrs a 37°C. Luego el cultivo se centrifugó por 10 minutos a 2500 rpm a temperatura ambiente en una microcentrífuga con un rotor de 11 cm de diámetro, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de bacterias en 300 µL de Buffer P1 (TrisHCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, RNAsa A 100 µg/mL) transfiriéndolo a un tubo cónico de microcentrífuga de 1.5 mL. Se añadió 300 µL de Buffer P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%), se agitó suavemente por inversión y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 300 µL de Buffer P3 (Acetato de Potasio 1 M pH 5.5) con el fin de neutralizar el pH alcalino de la mezcla, se agitó suavemente por inversión del tubo y se incubó 20 minutos en hielo. Los tubos se centrifugaron 30 minutos a 12500 rpm a 4°C, y se recuperó el sobrenadante en un tubo para microcentrífuga nuevo. Se agregó 1 volumen (800 µL) de sPEG y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, para después centrifugar a 13000 rpm durante 3 minutos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 200 µL de agua bidestilada. Después se prosiguió a realizar la extracción fenólica añadiendo 200 µL de fenol pH 8, agitando vigorosamente y centrifugando 5 minutos a 13000 rpm a 4°C. Una vez separada la fase acuosa (superior) de la orgánica (inferior), esta se transfiere a un tubo cónico de microcentrífuga de 1.5 mL. Posteriormente, se añadieron 200 µL de una mezcla de Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C. Nuevamente se transfirió la fase acuosa a un tubo de 1.5 mL y se añadió la mitad del volumen de acetato de amonio 5 M (100 µL) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto (750 µL) para precipitar los ácidos nucleicos. Se centrifugaron 45 minutos a 13000 rpm a 4°C, al finalizar se decantó el sobrenadante y se añadieron 500 µL de etanol al 70% para retirar sales de la pastilla de ADN. Se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm a 4°C, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. El ADN se diluyó en agua destilada y se determinó la concentración de ADN empleando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). El ADN plasmídico se purificó utilizando el estuche comercial para extracción de plásmido a gran escala “QIAGEN: Plasmid Maxi Kit”, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para la transfección, se comenzó sembrando 2.0×10^5 células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216 en 4 pozos de 2 cajas de 6 pozos en 3 mL de medio suplementado (DMEM + 10% SFB) incubándose por 24 horas a 37°C , 5% CO_2 y 90% humedad. Cada caja se marcó de la siguiente manera:



Al día siguiente se eliminó el medio de las células y se lavó 2 veces con 1 mL de PBS, se agregó 1.5 mL de medio Opti-MEM por caja y se regresó a la incubadora. Se rotularon 2 tubos de 1.5 mL como tubo A (A1 y A2) y otros dos como tubo B (B1 y B2), utilizándose los tubos “1” para las células HaCaT-LacZ y los tubos “2” para las HaCaT_E216. En el tubo A se colocó el volumen correspondiente a $1\mu\text{g}$ del plásmido LCR-Luc y se ajustó a un volumen final de $100\mu\text{L}$ con Opti-MEM, dejando incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. En ambos tubos B se mezclan $2.75\mu\text{L}$ de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con $97.25\mu\text{L}$ de Opti-MEM. Se mezcló el contenido del tubo A de 3-5 veces con pipeteo y se transfirió al tubo B (A1 con B1 y A2 con B2) evitando la formación de burbujas, incubándose por 45 minutos más a temperatura ambiente. Se retiró el Opti-MEM de las células y se agregó $900\mu\text{L}$ de Opti-MEM nuevo por las paredes de la caja. Se homogenizó y agregó por goteo por toda la caja la mezcla de transfección ($200\mu\text{L}$). A los controles se les agregaron $200\mu\text{L}$ de Opti-MEM. Se incubó por 5 horas a 37°C , 5% CO_2 y 90% de humedad. Finalmente se aspiró el medio y se colocaron 3 mL de medio suplementado para continuar la incubación por 48 hrs a 37°C , 5% CO_2 y 90% de humedad.

Para el ensayo de luciferasa se comenzó retirando el medio de las células y se lavó la monocapa con 1 mL de PBS. Después de retirarlo, se agregaron $250\mu\text{L}$ de buffer de lisis pasiva (PLB 5X, Promega) y para cosechar las células se raspó la superficie

de la caja con un fragmento de hule (gendarme), raspando el lisado hacia el borde inferior de la caja. Este lisado acumulado se pipeteó a un tubo de 1.5 mL y se homogenizó en este. Se lavó el gendarme con PBS y se procedió a realizar el mismo procedimiento en los demás pozos de la caja. El lisado fue sometido a 2 ciclos de congelamiento-deshielo, colocándose 5 min en un baño de hielo seco con etanol absoluto para pasar inmediatamente a 37°C en un termoblock. Después se centrifugó a máxima velocidad en microcentrífuga por 1 min, se recuperó el sobrenadante y este se almacenó a -70°C hasta su procesamiento.

En una placa para Luminómetro de 96 pozos se dispensaron 100 µL del Reactivo de Ensayo de Luciferasa II (LAR II, Promega) en el número adecuado de pozos para realizar los ensayos deseados y a estos se les transfirieron 75 µL del lisado protéico de cada transfección; se mezcló por pipeteo 2-3 veces para finalmente realizar la medición de la actividad de luciferasa en el equipo Fluoroskan Ascent FL de Labsystems.

8.3. Tinción con anticuerpos anti- α 6-integrina acoplado a Pacific Blue y anti-D71 acoplado a APC/Cy7, y separación celular por citometría de flujo

Los cultivos celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E216 se lavaron 2 veces con PBS, se tripsinizaron y centrifugaron para después resuspender en 1 mL de DMEM y realizar el conteo de células por medio de una tinción de azul de tripano. Las células se lavaron con PBS y centrifugaron para resuspender la pastilla celular en 1 mL de solución de bloqueo (PBS con 2% de albúmina de suero bovino y 2% de suero fetal bovino) por cada millón de células. Después de incubar por 15 min se lavó con PBS para después centrifugar y resuspender en 100 µL de solución de marcaje (PBS con 1% de albúmina de suero bovino) por cada millón de células. Se colocaron 100 µL de esta suspensión celular en un tubo de 1.5 mL (equivalente a 1 millón de células por tubo) y luego se procesaron para tinción sencilla o doble con los anticuerpos Pacific Blue anti-humano/ratón CD49f o α 6-integrina (dilución 1:100, BioLegend®) y/o APC/Cy7 anti-humano CD71 (dilución 1:500, BioLegend®) por 45 min a 4°C utilizando un tubo de células sin teñir como control. Las células fueron lavadas 2

veces con 1mL de PBS+ (PBS con 1% de Hepes 1M pH 7.4 y 2% de suero fetal bovino) a 4°C con centrifugaciones a 3500 rpm por 5 min a 4°C en una microcentrífuga con un rotor de 11 cm de radio entre cada lavado, siendo resuspendidas finalmente en 600 µL de PBS+. La separación celular fue realizada en el citómetro de flujo MoFlo XDP (Beckman Coulter) en el que se recuperaron las poblaciones $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} y No $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} (una mezcla de las poblaciones $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{bri} y $\alpha 6$ -integrina^{dim}), así como una población denominada PT-BD, la cual representa a las células de la población total menos la subpoblación $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim}, todas en PBS+.

8.4. Extracción de RNA a partir de células separadas

La extracción de RNA se realizó utilizando un estuche comercial de extracción de RNA especializado para muestras pequeñas (Direct-zol™ RNA MiniPrep de Zymo Research); la metodología se detalla a continuación.

Esta metodología se realizó a partir de aproximadamente 25,000 células separadas de la población $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} provenientes de los cultivos celulares HaCaT-LacZ y HaCaT-E216, así como de la población No $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} y PT-BD. Estas células se centrifugaron 5 min a 3500 rpm a 4°C y la pastilla celular se resuspendió en 100 µL de TRIzol (al utilizarse un número de células menor o igual que 100000) y se almacenó a -70°C hasta su procesamiento. Una vez que se llevó a temperatura ambiente se le añadió un volumen igual (100 µL) de etanol (95-100%) al lisado y se mezcló. Se transfirió la mezcla a una columna Zymo-Spin™ IIC en un tubo de recolección y se centrifugó a 9500 rpm por 1 min a temperatura ambiente. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de recolección y se descartó el fluido. Se agregaron 400 µL del RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó. Se mezclaron 5 µL de DNasa I (6 U/µL) y 75 µL de DNA Digestion Buffer y se agregó esta mezcla directamente a la matriz de la columna, incubándose a temperatura ambiente por 30 min. Se agregaron a la columna 400 µL de Direct-zol™ RNA PreWash y se centrifugó. Después de descartar el fluido se repitió el paso anterior. Se agregaron a la columna 700 µL del RNA Wash Buffer y se centrifugó a 9500 rpm

por 2 min para asegurar la eliminación completa del buffer de lavado. Se transfirió la columna a un tubo cónico para microcentrífuga de 1.5 mL y se le agregaron 50 μ L de agua libre de DNAsas/RNAsas directamente a la matriz de la columna para eluir el RNA. El RNA se concentró a un volumen de aproximadamente 12 μ L empleando el Concentrator 5301 (Eppendorf) y se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

Este método de extracción se aplicó también para obtener RNA a partir de células de la población total en las que se lavó el cultivo 2 veces con PBS y se le agregó 1 mL de TRIzol a una caja P100, se cosecharon las células con ayuda de un gendarme y se colocaron en un tubo cónico para microcentrífuga de 1.5 mL que se almacenó a -70°C hasta su procesamiento por medio del kit.

8.5. Reacción de RT PCR y RT-PCR en tiempo real

Para sintetizar el cDNA únicamente a partir de ARN mensajero (ARNm) se utiliza un oligonucleótido Oligo(dT), el cual se hibridiza con la cola de poliA del ARNm. En la reacción de RT-PCR se empleó todo el volumen de la muestra de RNA obtenida tras la extracción en el caso de la subpoblación $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} o BriDim (~300ng), mientras que para las demás subpoblaciones se utilizó ~2 μ g, 1 μ L de Oligo(dT) (500 μ g/mL, Promega), 5 μ L de Buffer M-MLV RT(5X, Promega), 5 μ L de una mezcla de dNTPs (25 mM), 0.5 μ L de RNAsin (40 u/ μ L, Promega), 1 μ L de Retrotranscriptasa M-MLV (1u/ μ L, Promega) y se llevó a un volumen final de 25 μ L con agua bidestilada estéril. Durante la reacción de retrotranscripción primero se añadió el Oligo(dT) al volumen de ARN, y se incubó durante 5 min a 70°C , para luego incubarse 10 min a 4°C y añadirle el resto de los componentes a la reacción e incubar a 42°C por 1:30 hrs. El cDNA se almacenó para su uso próximo a -20°C .

Para las reacciones de RT-PCR se utilizó la siguiente mezcla de reacción general: 1 μ L de cDNA, 1.25 mM de una mezcla de dNTPs, 1X de GoTaq Flexi Buffer, 1.25 mM de MgCl_2 , 0.05 u/ μ L de GoTaq DNA Polimerasa, 0.6 μ M de oligonucleótido sentido (Fw) y 0.6 μ M de oligonucleótido antisentido o reverso (Rv). Las condiciones de la reacción de PCR fueron un ciclo a 96°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos

de 96°C por 30 seg, 60°C por 1 min y 72°C por 2 min con un ciclo final de 10 min a 72°C. Para visualizar el producto de esta reacción, este se migró electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE (Tris base 40mM, ácido acético 20mM, EDTA 1mM, pH 8.3).

Las mezclas de reacción para el ensayo de qPCR se realizaron de la siguiente manera: 2 µL de cDNA, 1X Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (ThermoFisher), 0.2 µM del oligonucleótido Fw y 0.2 µM del oligonucleótido Rv, llevándose a un volumen final de 15 µL con agua. Se empleó un termociclador “StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)”. El perfil térmico utilizado en los ensayos consistió en un ciclo de 15 min a 95°C, después una fase de amplificación de 40 ciclos a 95°C por 15 seg y 60°C por 60 seg. Al finalizar el proceso de amplificación se realiza un análisis de curvas de disociación con el fin de evaluar la especificidad de la PCR. El análisis de expresión relativa se realizó utilizando el método de $\Delta\Delta Ct$ (Livak, K. J. & Schmittgen, T. D., 2001).

8.6. Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Este ensayo tiene como objetivo determinar sitios del ADN en los que se encuentre unida una proteína en particular, ya sea esta un componente de la cromatina, o bien un factor de transcripción. Particularmente en este trabajo pretendemos determinar regiones genicas en las que se encuentren más o menos presentes algunas modificaciones de histonas. Para este fin, se empleó un anticuerpo específico anti-Histona H3 (trimetil K4) grado ChIP (ab8580, abcam) y paralelamente un anticuerpo anti-Histona H3 grado ChIP (ab1791, abcam), ambos generados en conejo. Se añadió un control negativo en el cual se realizó la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-IgG. En este protocolo se utilizaron 3 millones de células como material inicial de cada línea celular (HaCaT-LacZ y HaCaT-E216), las cuales se sembraron el día anterior del inicio del ensayo.

Para comenzar se retiró el medio de los cultivos celulares por aspiración y se lavó la monocapa dos veces con PBS 1X. Para generar una asociación permanente de las proteínas unidas al ADN (entrecruzamiento), se añadieron 10 mL de medio D-

MEM sin suero y 270 mL de formaldehído (37%), para tener una concentración final de 1% y se incubó por 13 minutos a 37°C en la incubadora. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró el medio y se lavó dos veces con PBS 1X frío con inhibidores de proteasas (1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF y “Complete protease inhibitor cocktail” 1X (Roche)), se despegó la monocapa con ayuda de un gendarme y se transfirieron las células a un tubo cónico de microcentrifuga de 1.5 mL. Estas se centrifugaron a 2000 rpm por 4 min a 4°C en una microcentrifuga con un rotor de 11 cm de radio, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular en 300 µL de “SDS Lysis Buffer” (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8.1) con inhibidores de proteasas (1 mM de PMSF y “Complete protease inhibitor cocktail”); la suspensión se incubó 10 min en hielo. Las muestras se sonicaron utilizando el sonicador Bioruptor® Pico (Diagenode) con 10 ciclos de 30 seg de sonicado y 30 seg de pausa, a 4°C, permitiendo obtener segmentos de DNA de entre 200 y 600 pb. Después se centrifugaron las muestras por 10 min a 13,000 rpm a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 2 mL, descartando el pellet. Las muestras se llevaron a un volumen de 2 mL con “ChIP Dilution Buffer” (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.1, 167 mM NaCl) con inhibidores de proteasas (1 mM de PMSF y “Complete protease inhibitor cocktail”), se tomaron 200 µL de la muestra y se almacenaron como muestra “Input” (material inicial) a -20°C hasta su procesamiento en paralelo con las demás muestras. El resto de la muestra se utilizó para continuar el proceso de inmunoprecipitación de la cromatina. Para reducir ruido inespecífico se realizó un preaclerado con 30 µL de Proteína A-Agarosa (Santa Cruz, Biotechnology) y se incubó por 30 min a 4°C en agitación. Posteriormente se colocó la muestra en el soporte magnético para precipitar las perlas y el sobrenadante se transfirió a un tubo cónico de microcentrifuga de 1.5 mL. Se añadió el anticuerpo inmunoprecipitante (anti-H3K9me3, anti-H3, o anti-IgG como control negativo) y se incubó toda la noche a 4°C con agitación.

Después de la incubación se agregaron 25 µL de Proteína A-Perlas Magnéticas por una hora a 4°C en agitación para coleccionar el complejo anticuerpo/histona y los inmunocomplejos se precipitaron al colocar los tubos en el soporte magnético. Se

removió el sobrenadante que contiene ADN no unido, inespecífico y se descartó; los inmunocomplejos se lavaron por 5 min a 4°C en agitación de manera secuencial con cada uno de los buffers siguientes:

-“Low Salt Immune Complex Wash Buffer” (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl), 1 lavado.

-“High Salt Immune Complex Wash Buffer” (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 500 mM NaCl), 1 lavado.

-“LiCl Immune Complex Wash Buffer” (0.25 M LiCl, 1% IGEPAL-CA630, 1% ácido deoxicólico (sal de sodio), 1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8.1), 1 lavado.

-“Buffer TE” (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), 2 lavados.

Entre cada lavado se precipitó el complejo colocándolo en el soporte magnético y se descartó el sobrenadante. Una vez terminados los lavados se realizó la liberación de los inmunocomplejos resuspendiendo la muestra en 250 µL de “Elution Buffer” (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃), se mezcló con vortex y se incubó 15 min a temperatura ambiente con agitación. Al finalizar la incubación se colocó la muestra en el soporte magnético y se pasó el sobrenadante a un tubo cónico de microcentrífuga de 1.5 mL y se repitió la elusión obteniéndose al final 500 µL de elusión. A esto se le agregaron 25 µL de NaCl 5 M y se incubó a 65°C por 4 hrs, con lo que se revierte el entrecruzamiento proteína-ADN, realizándose lo anterior también en las muestras “Input”. Una vez transcurrido el tiempo se añadieron 10 µL de EDTA 0.5 M, 20 µL de Tris-HCl, pH 6.5 1 M, y 20 mg/ mL de Proteinasa K, incubando por una hora a 45°C para así digerir las proteínas.

La recuperación del ADN se realizó mediante una extracción con fenol-cloroformo la cual consiste en agregar un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico a las muestras y centrifugar a 13000 rpm por 5 min a 4°C para separar las fases acuosa y orgánica transfiriéndose la fase acuosa (superior) a un tubo de 1.5 mL limpio. Se le agregó un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugó a 13000 rpm por 5 min a 4°C y se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo de 1.5 mL limpio. Se le agregaron 100 µL de NaCl 5 M, 1 mL de isopropanol y

10 µL de glucógeno de *Mytilus edulis* (Sigma-Aldrich) dejando precipitar a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó durante 45 min a 13000 rpm a 4°C, el sobrenadante se decantó y se lavó la pastilla con 500 µL de etanol al 75%. La pastilla se centrifugó nuevamente por 15 minutos a 13000 rpm a 4°C, se decantó y se dejó secar. El ADN inmunoprecipitado se resuspendió en 70 µL de agua bidestilada estéril y se analizó por medio de qPCR, empleando 5 µL del ADN así como la concentración de reactivos descritos anteriormente para esta metodología.

8.7. Oligonucleótidos

Se emplearon diversos juegos de oligonucleótidos para medir el cambio en los niveles de expresión de los genes estudiados, así como para medir en los inmunoprecipitados de los ensayos de ChIP, la presencia de las marcas de la cromatina H3K4me3 y H3K4 en sus promotores (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para RT-qPCR.

Nombre	Secuencia	Tm
RTCCNA1Fw	5' AGA CCC AAA GCA CAC TAC AT 3'	60
RTCCNA1Rv	5' TCC CTC TCA GAA CAG ACA TAC 3'	60
RTp27Fw	5' TAA CTC TGA GGA CAC GCA T 3'	60
RTp27Rv	5' TTC TTC TGT TCT GTT GGC TC3'	60
RTJunBFw	5' CCC CCC TTC CAC TTT TTT T 3'	60
RTJunBRv	5' TGC GTG TTT CTT TTC CAC A 3'	60
RTHRAsFw	5' ACG AAT ACG ACC CCA CTA T3'	60
RTHRAsRv	5' TCA TCC GAG TCC TTC ACC 3'	60
RTEIF5A2Fw	5' TAC CTT TCC CTG CTG ACA G 3'	60
RTEIF5A2Rv	5' ATG CCT GAT GTT TCC GTT TA 3'	60
RTCCND3Fw	5' TAC CCG CCA TCC ATG ATC G 3'	60
RTCCND3Rv	5' AGG CAG TCC ACT TCA GTG C 3'	60
RTRNF125Fw	5' TGA GTG TGA CAC CCT GGT TT 3'	60
RTRNF125Rv	5' CGT TCC GAT CTG TGA TGA GT 3'	60
RTPCOLCE2Fw	5' AAA AGT GTA GAC GGA CGG G 3'	60

RTPCOLCE2Rv	5' TGA TGA TCG AGA CTG TGG C 3'	60
RTPTTG1IPFw	5' GAG TTG TAA CGC TCC ACT GA 3'	60
RTPTTG1IPRv	5' TTC TGA GAA CAA GCA GCT CC 3'	60
RTNCAM2Fw	5' GGG GTT GCT TGT CAG TAG C 3'	60
RTNCAM2Rv	5' TTC AGG TTC ACC AAT CGC TGT 3'	60
RTSLC11A1Fw	5' CTG GAC GAA TCC CAC TCT G 3'	60
RTSLC11A1Rv	5' CGC GCC ACC ACA TAC TCA T 3'	60
RTCAMK2BFw	5' CAG CAG GCA TGG TTT GGT TT 3'	60
RTCAMK2BRv	5' TGT ACA GGA TCA CCC CAC AT 3'	60
RTSox2FW	5' TCA GGA GTT GTC AAG GCA GAG 3'	60
RTSox2Rv	5' AGA GGC AAA CTG GAA TCA GGA 3'	60
RTNanogFw	5' GCA ATG GTG TGA CGC AGA AG 3'	60
RTNanogRv	5' ATT GGA AGG TTC CCA GTC GG 3'	60
RTOct4Fw	5' CTT CGC AAG CCC TCA TTT CAC C 3'	60
RTOct4Rv	5' GGT CCG AGG ATC AAC CCA G 3'	60
E2AAcFwQPCR	5' TGC GGG TGG TCA GGT AAT 3'	60
E2AAcRvQPCR	5' TGG TCG CTG GAT AGT CGT 3'	60
ActinaFw	5' GCG GGA AAT CGT GCG TGA CAT T 3'	60
ActinaRv	5' GAT GGA GTT GAA GGT AGT TTC GTG 3'	60

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para CHIP-qPCR.

Nombre	Secuencia	Tm
ChIPeIF5a2Fw	5' AGC CTC GGG AAT CTG GTA 3'	60
ChIPeIF5a2Rv	5' TCT TTC TCT CGG TCA GCG 3'	60
ChIPCCNA1Fw	5' AAG CGT AGG TGT GTG AGC 3'	60
ChIPCCNA1Rv	5' ACT GTT TCC GTG ACC CGT 3'	60
ChIPp27Fw	5' AGA CTC GCC GTG TCA ATC 3'	60
ChIPp27Rv	5' CCG CTC TCC AAA CCT TGC 3'	60
ChIPJunBFw	5' ACT TCC GTG GCT GAC TAG 3'	60
ChIPJunBRv	5' CTT TCC TGG CGT CGT TTC 3'	60

ChIP2eIF5a2Fw	5' AGA ATG GAT GGG GGA ACA GA 3'	64
ChIP2eIF5a2Rv	5' GTA ACA GAA CCT GGC CAG CA 3'	64
ChIP2CycA1Fw	5' ACA TAG AAA GAT AAC GACG GG 3'	60
ChIP2CycA1Rv	5' GTT ACC TGG AAG ACG AAA TCT 3'	60
ChIP2p27Fw	5' CAG ACT CGG ACG GGC TTT G 3'	62
ChIP2p27Rv	5' CGG AGC CAA AAG ACA CAG AC 3'	62
ChIP2JunBFw	5' GAA GCC TGA CAG GGC TTT TG 3'	60
ChIP2JunBRv	5' TCC ATT TTA GTG CAC ATC CGG 3'	60
ChIPNCAM2Fw	5' AGC GAA AGG TTC TCT CTC CA 3'	60
ChIPNCAM2Rv	5' CTC CCT CTT TGC CCT CTC TTG 3'	60
ChIP2SLC11A1Fw	5' TTC AAT GAC AGG TGA GTA GTG 3'	60
ChIP2SLC11A1Rv	5' TCC ACC CAG TGA GAT TGA GT 3'	60

9. RESULTADOS

9.1. Selección de genes a analizar

Para determinar los genes a analizar en este trabajo se emplearon los siguientes criterios de selección: que contuvieran promotores con reporte de poseer marcas bivalentes; que contuvieran una isla CpG dentro de su secuencia (ya sea en el promotor o en el cuerpo del gen); y que su expresión se haya reportado modulada por TAF1 y modificada por la presencia de E2 de VPH16.

Con este fin, se cotejó la información reportada por varios grupos de trabajo, sobre cada uno de estos criterios. Court y Arnauld en 2017 obtuvieron una lista de 5766 dominios bivalentes de alta confianza presente en el genoma de células troncales embrionarias humanas (hESC), a partir del análisis por ChIP-Seq de cinco líneas de hESC: HUES48, HUES64, HUES6, I3 y H1 que además, especifica la presencia y ubicación o ausencia de islas CpG en estos genes. Por su parte O'Brien y Tjian en 2000 reportaron que a partir de un microarreglo de 6500 genes murinos, alrededor del 18% de estos eran dependientes de la actividad acetil-transferasa de TAF1 y un 6% del dominio amino-terminal cinasa de este factor, mientras que alrededor de 1% dependían de ambos dominios, por lo tanto la lista de genes cuya expresión depende de TAF1 fue tomada de este trabajo. Por último se tomó una lista publicada por nuestro grupo de investigación (Ramírez-Salazar y cols.) en 2011, obtenida del análisis de un microarreglo de expresión que permitió conocer el patrón global de los procesos biológicos regulados por E2-HPV16 en la línea celular C-33A. En este estudio se encontraron 1048 genes regulados a la baja y 581 a la alta. Al entrecruzar los datos de estos trabajos, se obtuvo una lista de 12 genes que cumplen con los criterios mencionados anteriormente y que se presenta en la Tabla 3 (Court, F. 2017; O'Brien, T. 2000; Ramirez-Salazar, E. 2011).

Tabla 3. Genes a analizar en este trabajo.

ID del Gen	Símbolo	Nombre	Cambio	Posición de isla CpG
NM_003914	CCNA1	Cyclin A1	2.9	Promotor
NM_004064	CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	1.39	Promotor
NM_000578	SLC11A1	Solute carrier family 11 member 1	1.39	Cuerpo del gen
NM_001220	CAMK2B	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II beta	1.07	Cuerpo del gen
NM_017831	RNF125	Ring finger protein 125, E3 ubiquitin protein ligase	0.94	Promotor
NM_001760	CCND3	Cyclin D3	0.8	Promotor
NM_006397	JUNB	Transcription factor JUNB	0.38	Promotor
NM_004339	PTTG1IP	Pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	0.28	Promotor
NM_013363	PCOLCE2	Procollagen C-endopeptidase enhancer 2	-0.04	Promotor
NM_005343	HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	-0.22	Promotor
NM_004540	NCAM2	Neural cell 41 adhesion molecule 2	-0.61	Promotor
NM_020390	EIF5A2	Eukaryotic translation initiation factor 5A2	-5.2	Promotor

9.2. Expresión de $\alpha 6$ -integrina y CD71 en células HaCaT-LacZ y subsecuente separación de células $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim}

Con el objetivo de analizar la expresión de los genes mencionados en la tabla anterior, se realizó la separación de las subpoblaciones celulares de la línea celular control (HaCaT-LacZ) que son características de la capa basal del epitelio. Esto se realizó mediante citometría de flujo acoplada a separación de células y primeramente se buscó confirmar la presencia de una subpoblación progenitora por medio de una tinción doble con anticuerpos anti $\alpha 6$ -integrina y anti CD71. Los resultados representativos de este análisis se observan en la Fig. 12. La línea celular HaCaT-LacZ presenta tres subpoblaciones celulares con inmunofenotipos diferentes: una población $\alpha 6$ -integrina^{dim} ($8.44 \pm 0.43\%$, R8) correspondiente a las células diferenciadas tempranas, otra $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{bri} ($89.00 \pm 0.64\%$, R7) siendo células transitoriamente amplificadas y una menor subpoblación de células $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} ($2.5 \pm 0.27\%$, R6) que corresponde a células troncales. Estas proporciones son similares a las reportadas en nuestro grupo de investigación por Domínguez-Catzín en 2017, empleando la misma estrategia de separación.

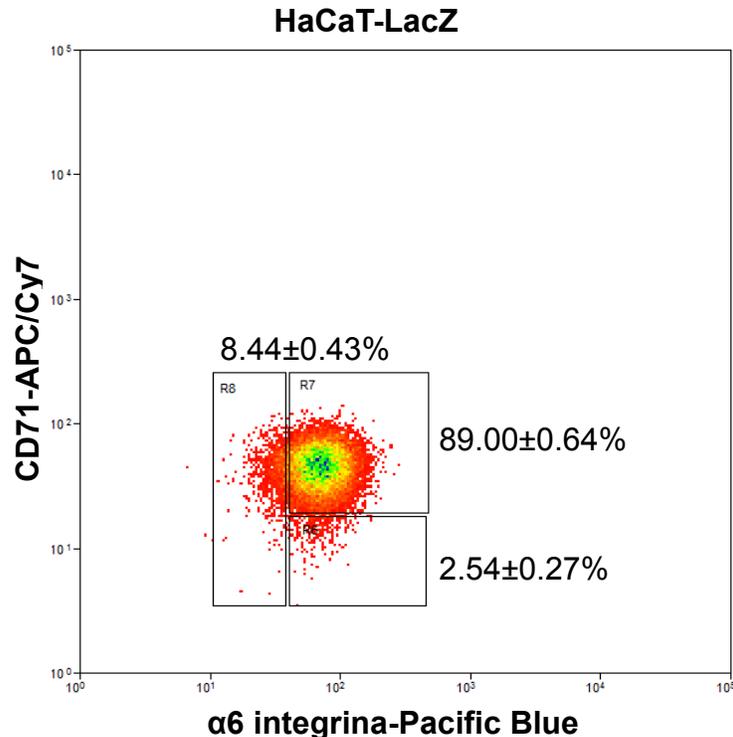


Figura 12. Análisis de citometría de flujo para la expresión de $\alpha 6$ integrina y CD71 en la línea celular HaCaT-LacZ. Se representan 3 subpoblaciones: $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} (R6), $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{bri} (R7) y $\alpha 6$ -integrina^{dim} (R8). La imagen es representativa de 3 experimentos separados.

Para corroborar una selección de la población adecuada así como una correcta separación celular, se realizó el análisis de los niveles de ARNm por RT-qPCR de 3 de los factores de troncalidad más importantes, Sox2, Nanog y Oct4 (Fig. 13). Esto se realizó en las subpoblaciones $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} (BriDim) y No $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} (No BriDim), siendo esta última una muestra representativa de la subpoblación $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{bri}, específicamente de una sección más alejada de la primera, con el objetivo de observar diferencias más marcadas entre las subpoblaciones. En esta figura se observa una mayor expresión relativa de los 3 marcadores de troncalidad analizados en la subpoblación $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} en comparación con las células No $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim}, siendo estadísticamente significativa en 2 de 3 marcadores utilizados, implicando que la primera subpoblación presenta un perfil de expresión más cercano a la troncalidad. Cabe destacar que con respecto a los datos de la expresión de Sox2, al obtenerse en un

ensayo un nivel de expresión alrededor de 6 veces mayor en la población BriDim en comparación con la No BriDim, resultó en una desviación estándar mayor que afectó importantemente la significancia estadística, a pesar de observarse una evidente mayor expresión de este gen en las células BriDim. Los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado y por lo tanto confirman una correcta separación de la subpoblación progenitora.

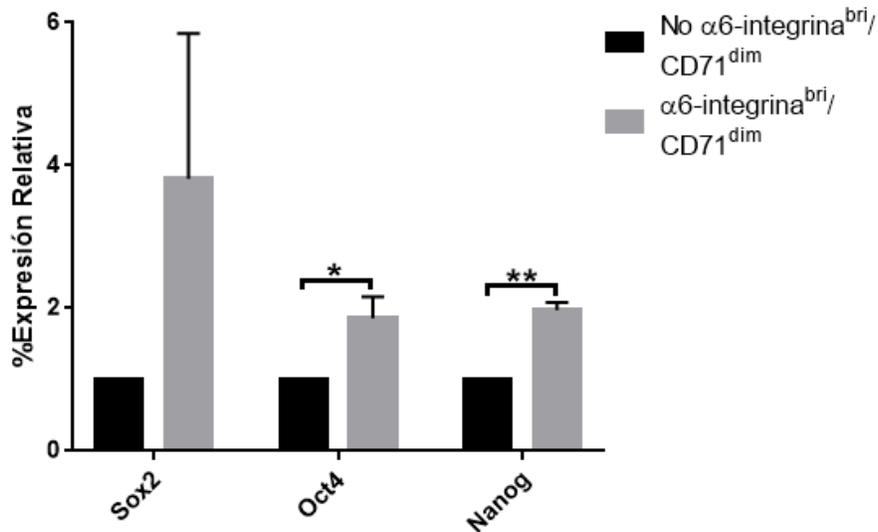


Figura 13. Análisis RT-qPCR para la expresión de SOX2, OCT4 y NANOG en células $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} (BriDim) y No $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim}, ambas después de la separación por citometría de flujo. Los valores son calculados con el método $\Delta\Delta C_t$ utilizando β -actina como control. Los resultados son representativos de 3 ensayos separados expresados como la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

9.3. Confirmación de la expresión de E2 en la línea celular HaCaT-E216

Previamente a realizar la separación celular en las células HaCaT-E216 se verificó la expresión adecuada y exclusiva del gen E2 en esta línea. Para esto se realizó una RT-PCR utilizando RNA (cDNA) de las células HaCaT-E216 y HaCaT-LacZ como control, ya que esta última no debe de expresar este gen. En la Fig. 14 se observa la expresión específica del gen viral en la línea celular que presenta el transgen, al obtenerse una única banda exclusivamente al realizarse la reacción con

el cDNA de la línea que expresa E2 y por lo tanto, nos indica que el transgen de E2 se transcribe activamente. La expresión de actina fue utilizada como control de carga.

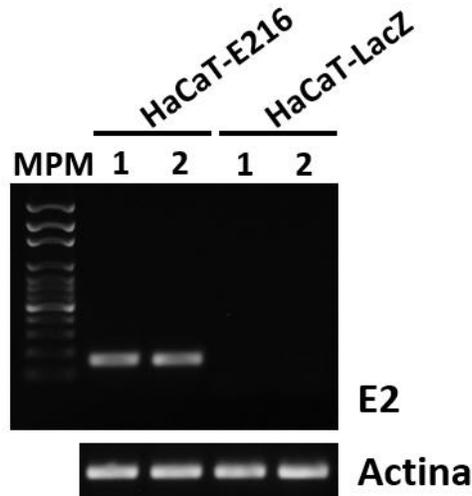


Figura 14. Expresión del transcrito de E2 en las líneas celulares HaCaT-E216 y HaCaT-LacZ. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5% de reacciones de RT-PCR para el gen E2 y de actina de las células HaCaT-E216 y HaCaT-LacZ. MPM, Marcador de 100pb. Cada línea celular se analizó por duplicado.

Una vez confirmada la expresión del transcrito, se procedió a verificar indirectamente la expresión y correcto funcionamiento de la proteína E2, al comprobar su actividad biológica. A ambas líneas celulares (HaCaT-E216 y HaCaT-LacZ) se les transfeció con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) el plásmido pGL4.10LCR18, el cual tiene clonada en su secuencia la región larga de control del VPH tipo 18 acoplada a un reportero de luciferasa, que al presentar sitios de unión para la proteína E2, si esta se encuentra activa y funcional, se unirá a estos promoviendo la transcripción del gen de la enzima luciferasa. Al agregar el sustrato de la enzima a los lisados totales de estas células, reaccionará y como producto de esta reacción emitirá luz que será detectable por medio de un luminómetro. En la Fig. 15 se observan los resultados de uno de estos experimentos que indican una mayor emisión de luz en la línea celular con el transgén de E2 que en la línea control, indicando la presencia de una proteína E2 funcional en las células HaCaT-E216, por lo que se consideró que contaban con las condiciones adecuadas para su uso

y poder cumplir los demás objetivos de este trabajo. Cabe destacar que las diferencias con respecto a la cantidad de luz relativa en ambas líneas celulares no resultan tan grandes debido a que la línea celular HaCaT-E216 expresa a la proteína E2 como producto de una transducción con Lentivirus la cual está diseñada para expresar el transgén que se desee a bajos niveles.

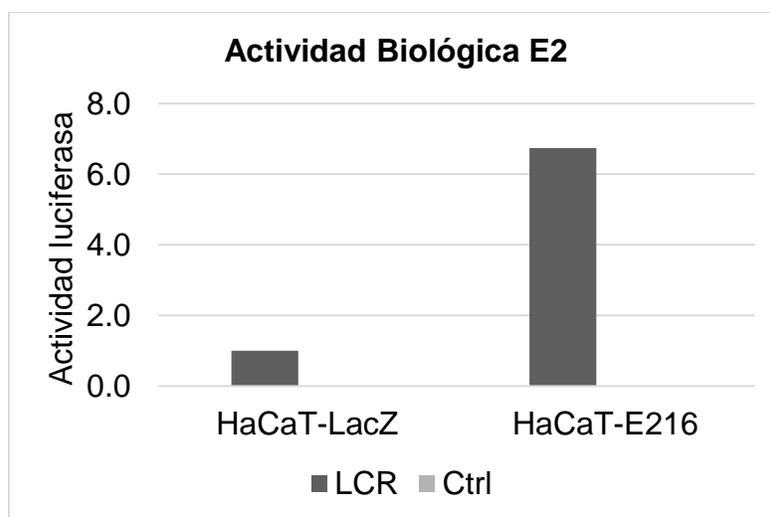


Figura 15. Ensayo de actividad biológica de la proteína E2. En la figura se observa las diferencias en la actividad de luciferasa entre las líneas HaCaT-LacZ y HaCaT-E216 transfectadas (LCR) y no transfectadas (Ctrl).

9.4. Expresión de $\alpha 6$ -integrina y CD71 en células HaCaT-E216

Una vez corroborada la expresión de E2 en la línea celular HaCaT-E216, se procedió a analizar las subpoblaciones celulares de esta línea celular mediante la tinción con anticuerpos anti- $\alpha 6$ -integrina y anti-CD71, para así separar las subpoblaciones BriDim y PT-BD. En la Fig. 16 se observa un gráfico tipo dot-plot representativo de este análisis en el cual se observa que en esta línea celular las proporciones de las subpoblaciones son las siguientes: células diferenciadas tempranas o $\alpha 6$ -integrina^{dim} un $29.39 \pm 4.09\%$ (R8), células transitoriamente amplificadas o $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{bri} un $69.32 \pm 3.80\%$ (R7), y por último células “troncales” o $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} un $1.25 \pm 0.30\%$ (R6). En esta se puede apreciar

que la presencia de E2 modifica la abundancia relativa de las subpoblaciones con una propensión al enriquecimiento de las células diferenciadas tempranas (de $8.44\pm 0.43\%$ a un $29.39\pm 4.09\%$) y con una disminución de las otras dos subpoblaciones. Esta tendencia fue reportada previamente en nuestro grupo de investigación por Domínguez-Catzín en 2017, sugiriendo que este gen viral estimula la diferenciación temprana de las células HaCaT.

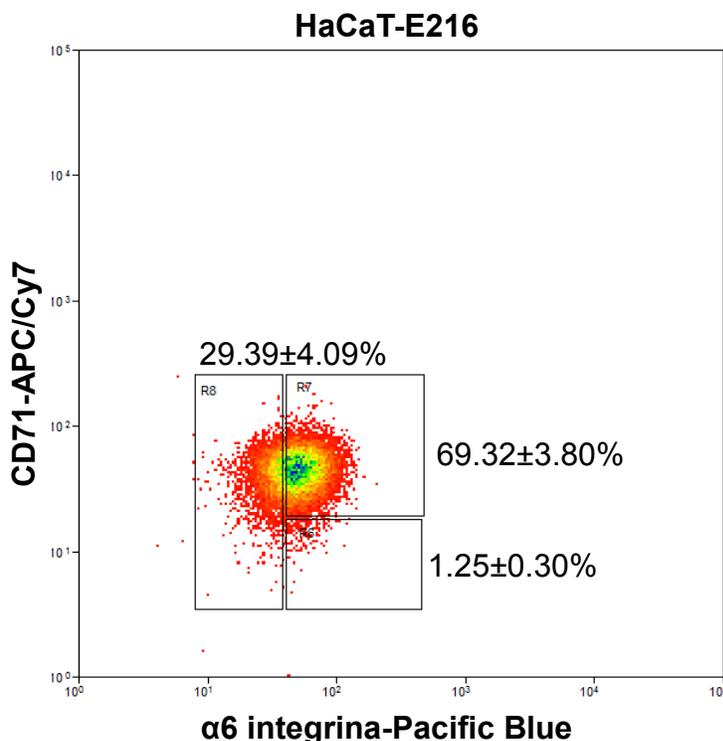


Figura 16. Análisis de citometría de flujo para la expresión de $\alpha 6$ integrina y CD71 en la línea celular HaCaT-E216. Se representan 3 subpoblaciones: $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim} (R6), $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{bri} (R7) y $\alpha 6$ -integrina^{dim} (R8). La imagen es representativa de 3 experimentos separados.

9.5. Comparación de niveles de expresión de genes de interés entre la Población Total de células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216

Como primer acercamiento, se analizaron los niveles de expresión de los 12 genes seleccionados, con promotores bivalentes en la población total (células tomadas directamente del cultivo celular) de ambas líneas. Los resultados de este análisis

pueden observarse en la Fig. 17, estos se normalizaron otorgándole el valor de 1 a la línea celular control, HaCaT-LacZ. En esta figura se observa una tendencia general a la baja de la expresión de los genes cuando se encuentra presente el gen viral E2, siendo estos genes celulares p27, JunB, CCNA1, HRas, eIF5a2, NCAM2 y SLC11A1; es decir, 7 de los 12 genes analizados mostraron una disminución estadísticamente significativa, mientras que el resto no presentó diferencias. Esta tendencia a la baja de la expresión génica causada por la proteína E2 ha sido reportada previamente por Ramirez-Salazar y cols. En nuestro grupo de investigación en 2011 y por lo tanto, los datos obtenidos concuerdan con lo descrito en la literatura.

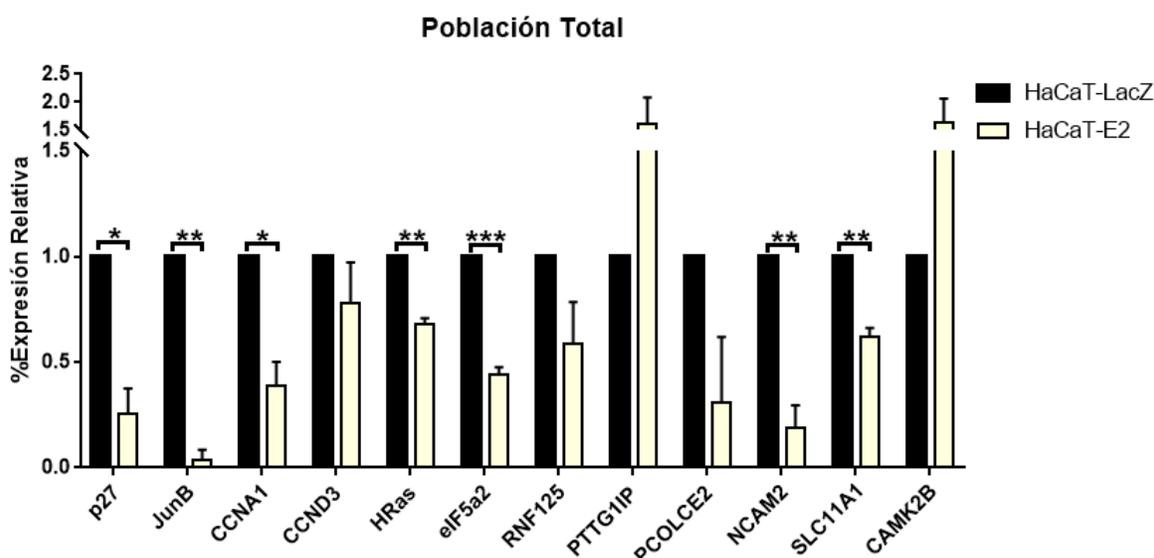


Figura 17. Análisis por RT-qPCR de los 12 genes seleccionados en la población total de las líneas celulares HaCaT-LacZ (negro) y HaCaT-E2 (blanco). Los valores son calculados con el método $\Delta\Delta C_t$ utilizando β -actina como control. Los resultados son representativos de 3 ensayos separados expresados como la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

9.6. Comparación de niveles de expresión de genes de interés entre las subpoblaciones PT-BD y BriDim de células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216.

A continuación se prosiguió con el análisis de la expresión génica en las subpoblaciones PT-BD (Población Total–BriDim, es decir, todas las células excepto

las $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim}) y BriDim (células $\alpha 6$ -integrina^{bri}/CD71^{dim}), ambas separadas por medio de citometría de flujo. En la Fig. 18. se encuentran los resultados correspondientes a la subpoblación PT-BD, en la que se normalizaron los resultados otorgándole el valor de 1 a la subpoblación PT-BD de la línea HaCaT-LacZ. En la subpoblación PT-BD de HaCaT-E216 se mantiene la tendencia a la baja de la expresión génica observada en la Población Total, ya que en 5 de los 12 genes (CCNA1, eIF5a2, PTTG1IP, PCOLCE2 y CAMK2B) disminuye su expresión por la presencia de E2, mientras que en únicamente 2 de 12 genes (NCAM2 y SLC11A1) su expresión aumenta en la línea HaCaT-E216. En el resto de los genes no se observó una diferencia significativa entre ambas líneas celulares. Esta correlación entre los resultados de esta subpoblación con los de la población total era de esperarse, ya que las células PT-BD representan la gran mayoría de la población total (alrededor del 95%).

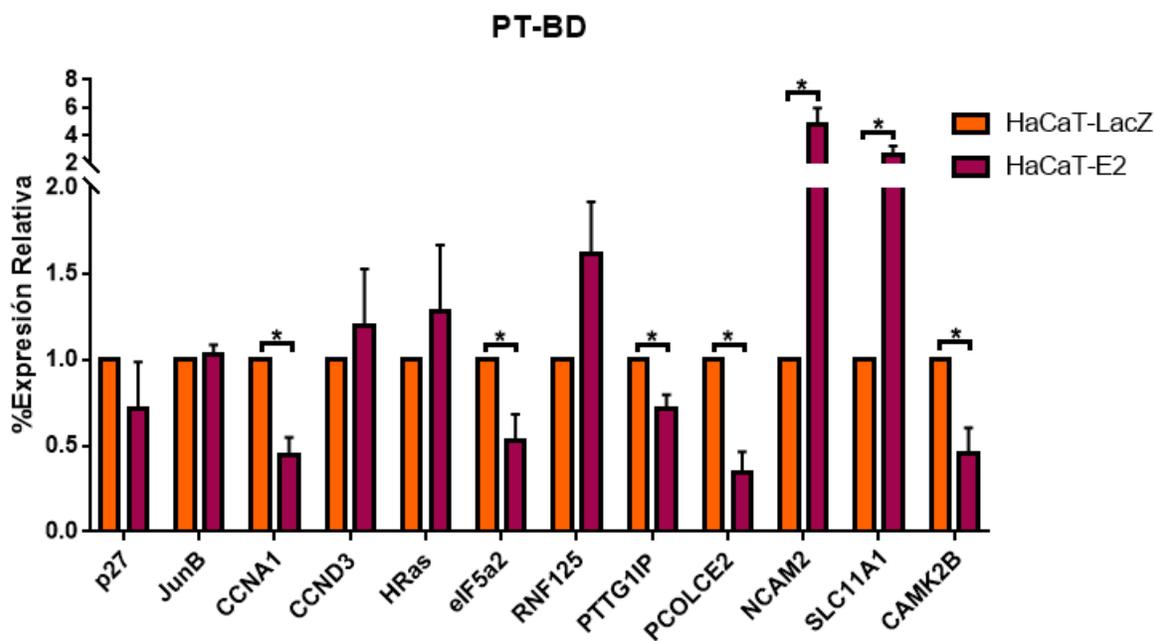


Figura 18. Análisis por RT-qPCR de los 12 genes seleccionados en la subpoblación PT-BD de las líneas HaCaT-LacZ (naranja) y HaCaT-E2 (violeta). Los valores son calculados con el método $\Delta\Delta C_t$, utilizando β -actina como control. Los resultados son representativos de 3 ensayos separados expresados como la media \pm DS. * $p < 0.05$.

Los niveles de expresión de la subpoblación progenitora (BriDim) se encuentran en la Fig.19. En esta se utilizó la subpoblación PT-BD de la línea HaCaT-LacZ para

normalizar, otorgándole el valor de expresión relativa de 1 (señalada en la figura como una línea punteada). Se distingue que, a diferencia de las otras poblaciones analizadas, en la subpoblación BriDim la mayoría de los genes tuvo una tendencia de expresión a la alta, en presencia del gen viral E2, observándose este comportamiento en 5 de los 12 genes (p27, NCAM2, CAMK2B, CCNA1 y eIF5a2). Interesantemente, en los tres primeros se detectaron niveles considerablemente elevados, con un aumento de alrededor de 5, 22 y 8 veces respectivamente. Además en 4 genes los niveles de expresión se detectaron disminuidos (JunB, RNF125, PTTG1IP y PCOLCE2, el último con una disminución de la expresión del 60%) y por último, 3 genes cuya expresión no fue alterada (CCND3, HRAS y SLC11A1).

Además, si comparamos la Fig. 18 y 19 podemos observar que existen algunos genes en los que aparentemente el efecto de E2 fue similar en ambas subpoblaciones, ya sea únicamente aumentando o disminuyendo su expresión, como es el caso de PTTG1IP, PCOLCE2 y NCAM2, por lo que consideramos que este efecto fue general en toda la población HaCaT-E216. Por otra parte, vemos genes como p27, JunB y RNF125 en los que la expresión no resultó significativamente diferente en la subpoblación PT-BD tanto en ausencia como en presencia de E2, mientras que en la subpoblación BriDim sí se observaron diferencias importantes. En los genes CCNA1, eIF5a2 y CAMK2B, la expresión de E2 tuvo efectos contrarios entre las dos subpoblaciones, mientras que en los genes CCND3 y HRAS no se observaron cambios significativos en ninguna subpoblación y el gen SLC11A1, no mostró expresión en la subpoblación BriDim en ninguna de las líneas celulares.

Por último, es destacable que los genes NCAM2 y CAMK2B, los cuales no se expresan en la subpoblación de la línea control, al encontrarse en un ambiente en donde la proteína E2 está presente, se encienden y sucede una alta expresión de estos en las células BriDim, por lo que E2 aparentemente provocó que pasaran de un estado apagado a uno encendido. Con lo descrito anteriormente podemos

concluir que los efectos de E2 sobre la expresión génica son diferenciales y claramente distintos en cada subpoblación celular.

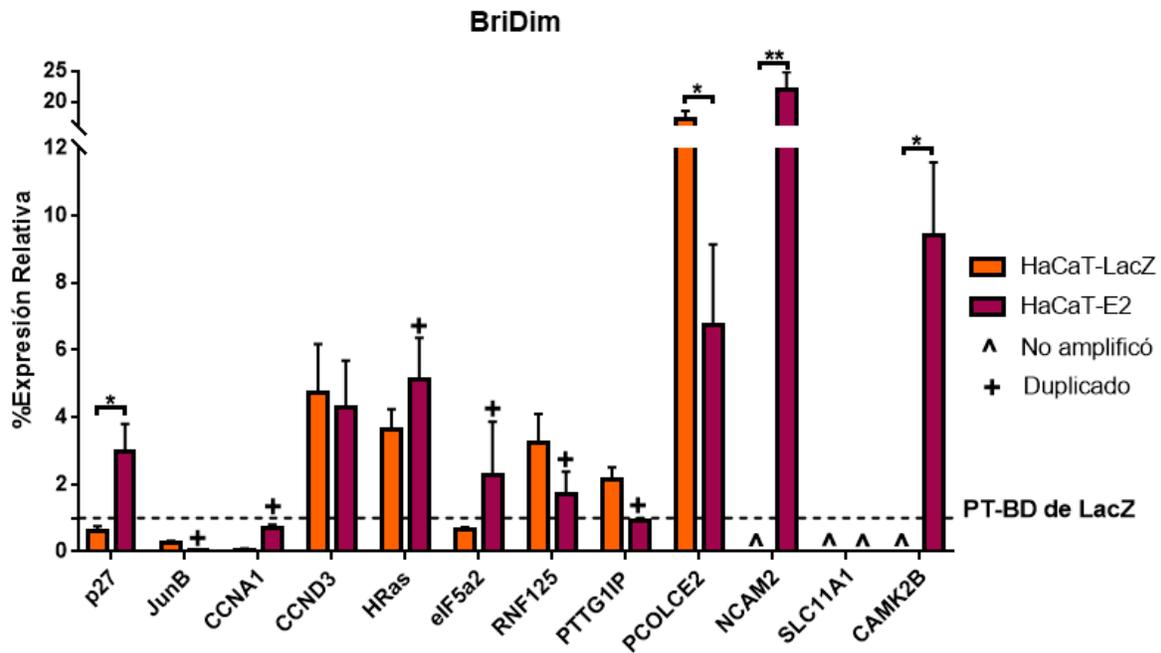


Figura 19. Análisis por RT-qPCR de los 12 genes con promotores bivalentes en la subpoblación BriDim de las líneas HaCaT-LacZ (naranja) y HaCaT-E2 (violeta). Los valores son calculados con el método $\Delta\Delta Ct$, utilizando β -actina como control. Los resultados son representativos de 2 ó 3 ensayos separados expresados como la media \pm DS.

Por otra parte, detectamos que un pequeño grupo de genes tienen como característica que su expresión es mayor en las células BriDim, independientemente de la presencia o ausencia de E2 en las células. Estos genes fueron HRAS, CCND3 y PCOLCE2 (Fig. 20), siendo el último el que presenta una mayor diferencia entre las subpoblaciones, expresándose alrededor de 17 veces más en las células progenitoras que en la subpoblación PT-BD. Estos genes, al encontrarse consistentemente más expresados en la subpoblación BriDim, les hemos denominado como “genes BriDim” y por lo tanto genes designados como asociados a la troncalidad en nuestra línea de estudio, las células HaCaT.

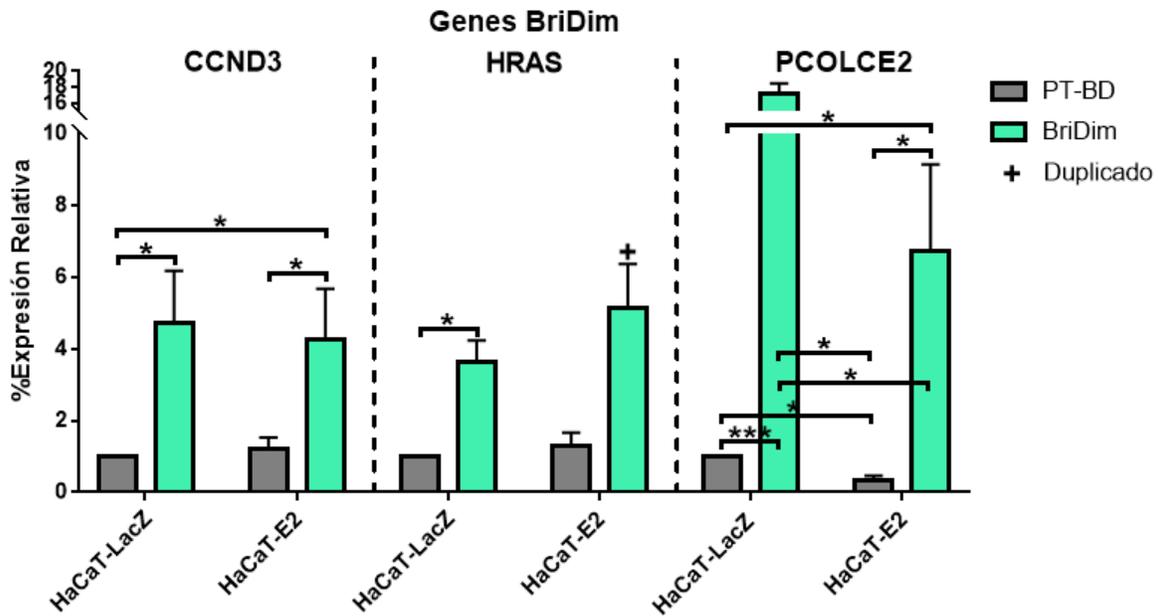


Figura 20. “Genes BriDim” de células HaCaT. Comparación entre las subpoblaciones PT-BD (gris) y BriDim (azul) de las líneas HaCaT-LacZ y HaCaT-E216 de genes mayormente expresados en células progenitoras. Los valores son calculados con el método $\Delta\Delta Ct$, utilizando β -actina como control. Los resultados son representativos de 2 ó 3 ensayos separados expresados como la media \pm DS.

9.7. Análisis de los genes seleccionados de acuerdo a su función.

Para tratar de entender mejor el papel de los cambios en la expresión génica de las subpoblaciones de ambas líneas celulares en el contexto del ambiente del virus, se clasificó a los genes analizados en diferentes categorías para su análisis: Ciclo celular (p27, JunB, CCNA1 y CCND3), oncogenes (HRAS, eIF5a2, RNF125 y PTTG1IP) y genes cuya expresión es baja en células HaCaT (PCOLCE2, NCAM2, SLC11A1 y CAMK2B).

El primer grupo de genes, los cuales están implicados en la progresión del ciclo celular, pueden dividirse a su vez en tres grupos: uno que arresta el ciclo celular como p27 deteniéndolo en la transición G1/S; otro que dependiendo de las condiciones de la célula, puede tanto promover como arrestar el ciclo, como JunB, que detiene el ciclo en G1 al inhibir a la ciclina D1 y también es necesario para una

progresión rápida en la fase S al promover la transcripción de la ciclina A2; y por último un grupo de genes que regula positivamente la progresión del ciclo celular, la ciclina A1 (CCNA1) que actúa durante la fase S y la ciclina D3 (CCND3) que regula la transición G1/S (Oldak, M. 2010; Ren, D. 2015; Song, W. 2015; Zuo, Q. 2014).

El análisis de los niveles de expresión de este grupo de genes (Fig. 21) nos revela que en la línea celular control existe una diferencia significativa en la expresión de todos los genes relacionados con el ciclo entre la subpoblación PT-BD y BriDim, por lo tanto el perfil de expresión entre estos tipos celulares es diferente, evidenciando lo distintas que son entre sí las subpoblaciones. En cuanto a la expresión de estos genes en la subpoblación PT-BD, no hubo diferencia significativa entre las líneas celulares, excepto en CCNA1 donde hubo una disminución significativa del 55% en aquellas células que expresan E2.

Con respecto al comportamiento particular de cada gen, en p27 existe un incremento del 500% en su expresión en las células BriDim en presencia de E2, mientras que la expresión de JunB se encuentra disminuida en la subpoblación BriDim y esto se potencia en un contexto positivo a E2. El transcrito de la CCNA1 en general es bajo en las células HaCaT, ya que es más característica de cerebro y testículos, y aunque en las células progenitoras de la línea control se apaga por completo, E2 tiene la capacidad de promover la transcripción del gen en estas. Mientras, que el gen de CCND3, clasificado por nosotros como “Gen BriDim” ya que se expresa abundantemente en estas células, no es afectado en su expresión por la presencia de E2.

Por lo tanto, el perfil de expresión en células BriDim nos indica que E2 probablemente está deteniendo el ciclo celular en fase G1/S, lo cual se encuentra relacionado con un arresto del crecimiento y el comienzo de la diferenciación terminal en queratinocitos humanos (Hara, T. 2011).

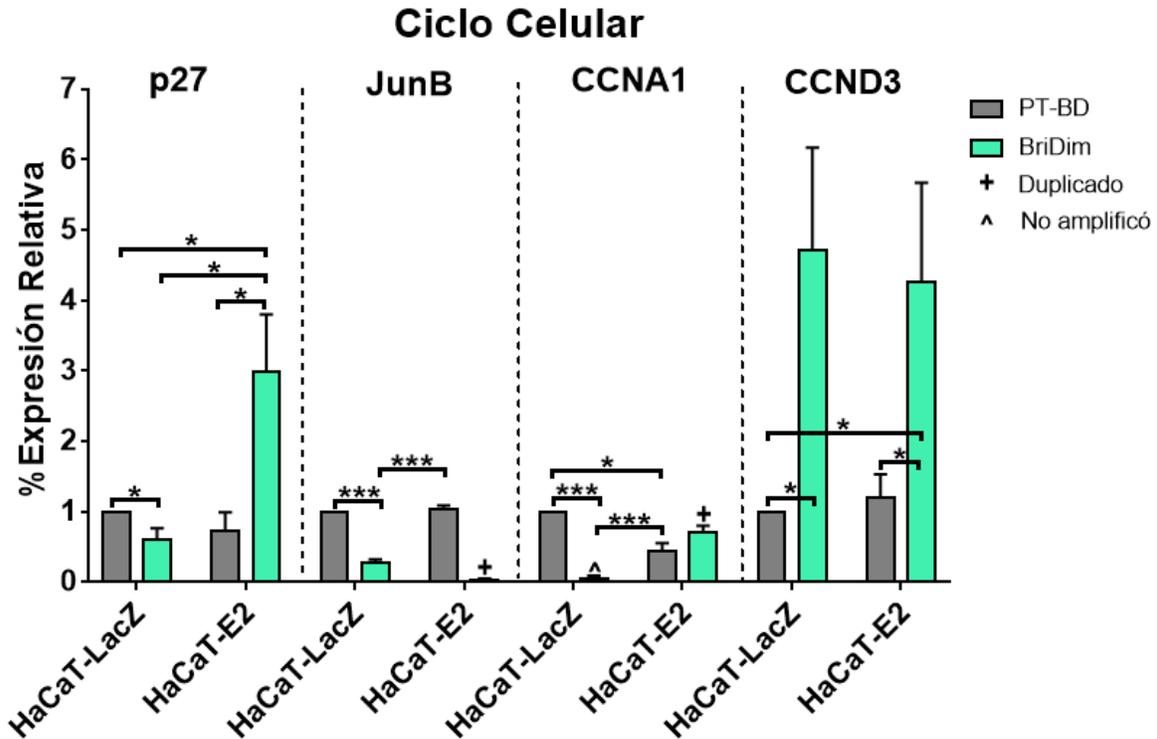


Figura 21. Niveles de expresión de genes relacionados al ciclo celular en subpoblaciones de células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216. Comparación entre subpoblaciones PT-BD (gris) y BriDim (azul) de ambas líneas celulares. Los valores son calculados con el método $\Delta\Delta Ct$, utilizando β -actina como control. Los resultados son representativos de 2 o 3 ensayos separados expresados como la media \pm DS.

Los genes del segundo grupo estudiado se encuentran relacionados con el desarrollo de cáncer. En este grupo se encuentran: la GTPasa HRAS, involucrada en cascadas de señalización como la vía Raf/MEK/ERK que se encuentra mutada en el 30% de cánceres humanos; el factor de elongación de la traducción eIF5a2, que se encuentra sobreexpresado en tumores sólidos; la E3 ubiquitin-ligasa RNF15 que promueve la degradación de p53 y se ha reportado aumentada en cáncer epitelial de ovario; y por último el proto-oncogen PTTG1IP, que se encuentra poco caracterizado y se ha detectado con una expresión elevada en cáncer mamario y de tiroides (Liu, Y. 2014; Membrino, A. 2011; Xang-Peng, W. 2014; Yang, L. 2015).

El perfil de expresión de los genes descritos anteriormente se encuentra representado en la Figura 22. Al observar la subpoblación PT-BD, se encuentran diferencias significativas en 2 de los 4 genes evaluados, eIF5a2 y PTTG1IP,

encontrándose en ambos una disminución de la expresión (en un 45% y 30%, respectivamente), mientras que en la subpoblación BriDim hubo un comportamiento con tendencia a una menor expresión en los genes RNF125 y PTTG1IP.

La expresión del gen HRAS no mostró ser afectada significativamente por la presencia de E2, pues no se observaron cambios importantes entre las subpoblaciones celulares, pero manteniéndose una expresión alta en las células progenitoras, característica por la que se le clasificó previamente como “Gen BriDim”. La disminución de la expresión en la subpoblación PT-BD del gen eIF5a2 corresponde a lo detectado previamente en la población total, mientras que la subpoblación progenitora tiene una tendencia al aumento en su expresión. Por otra parte, la expresión del gen RNF125 en la subpoblación BriDim resulta mayor al compararse con la subpoblación PT-BD, y se ve disminuida en un ambiente con E2. Con respecto al gen PTTG1IP, el efecto de E2 parece tener una consecuencia general sobre la línea celular HaCaT, ya que la tendencia a la disminución de la expresión se observa en ambas subpoblaciones, siendo más marcada en las células progenitoras.

Con base a los resultados anteriores, es notable que este grupo de oncogenes tiene una tendencia a ser expresados en mayor nivel en la subpoblación progenitora en condiciones “normales” (línea celular control), probablemente relacionado con que las células con el hecho de que las células troncales comparten ciertas características en sus perfiles de expresión génica con las células cancerígenas. A pesar de que podemos observar una tendencia al apagamiento en dos de los genes integrantes de este grupo en presencia de E2, el aumento de la expresión del gen eIF5a2 en las células progenitoras podría ser reflejo de una síntesis de proteínas aumentada en esta subpoblación, lo que indicaría una salida del estado quiescente por el efecto de E2.

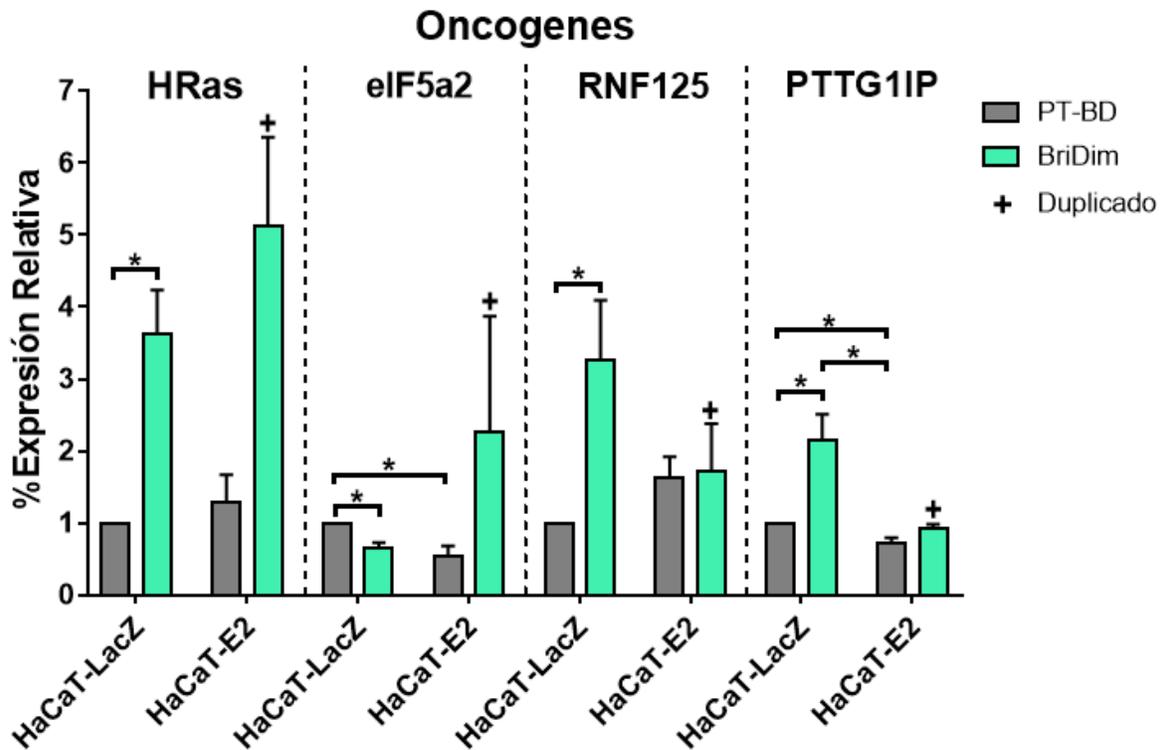


Figura 22. Niveles de expresión de posibles oncogenes en subpoblaciones de células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216. Comparación entre subpoblaciones PT-BD (gris) y BriDim (azul) de ambas líneas celulares. Los valores son calculados con el método $\Delta\Delta Ct$, utilizando β -actina como control. Los resultados son representativos de 2 ensayos separados expresados como la media \pm DS.

Por último, se analizó un grupo de genes con funciones diversas pero con la característica común de que su expresión es baja en queratinocitos (Fig. 23). Este grupo incluye al gen PCOLCE2 que es un potenciador de la actividad de la enzima procolágeno proteinasa-C, a la molécula de adhesión de células neurales 2 (NCAM2) involucrado en interacciones homofílicas de las células neurales, al gen SLC11A1 que codifica para una proteína transmembranal transportadora de metales de transición divalentes expresada en células de origen mielóide y a la proteína cinasa dependiente de calmodulina (CAMK2B) que funciona como cinasa de serina/treonina y es altamente expresada en el cerebro (Baicu, C. F. 2012; Fang, M. 2014; Feng, Y. 2013; Takahashi, S. 2010).

En la subpoblación PT-BD observamos comportamientos distintos en estos genes, dos en los que su expresión aumentó, NCAM2 y SLC11A1 (5 y 2.5 veces) y dos que

disminuyeron, PCOLCE2 y CAMK2B (65% y 55%). En el caso de las células BriDim la transcripción del gen PCOLCE2 disminuyó alrededor del 60%, mientras que en los genes NCAM2 y CAMK2B aparentemente su transcripción se enciende fuertemente por la expresión de E2 (aumentó su transcripción 22 y 9 veces, respectivamente) y por último SLC11A1 no se ve afectado, manteniéndose en un estado apagado en presencia o ausencia de E2.

Con respecto al comportamiento particular del gen PCOLCE2, observamos un efecto similar en ambas subpoblaciones (disminución de alrededor del 65%) por lo que en este gen el efecto de E2 es aparentemente general (sobre toda la línea celular HaCaT). El gen NCAM2 es un caso similar, ya que su expresión se encontró aumentada tanto en las células PT-BD como en las progenitoras. Por otro lado, el gen SLC11A1 mostró un aumento en su expresión en la subpoblación PT-BD, mientras que en la de la subpoblación BriDim no se vio afectada, manteniéndose en un estado completamente silenciado. Por último es interesante observar que la presencia de E2 afectó la expresión del gen CAMK2B de manera diferencial en las subpoblaciones celulares, disminuyendo en la PT-BD y aumentando en la BriDim.

Destaca en este grupo de genes que se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todas las subpoblaciones, tanto dentro de la misma línea celular, como comparando ambientes en ausencia y presencia de E2. Además sobresalen de manera importante los genes NCAM2 y CAMK2B, que fueron aquellos cuya expresión tuvo el mayor cambio de todos los genes analizados.

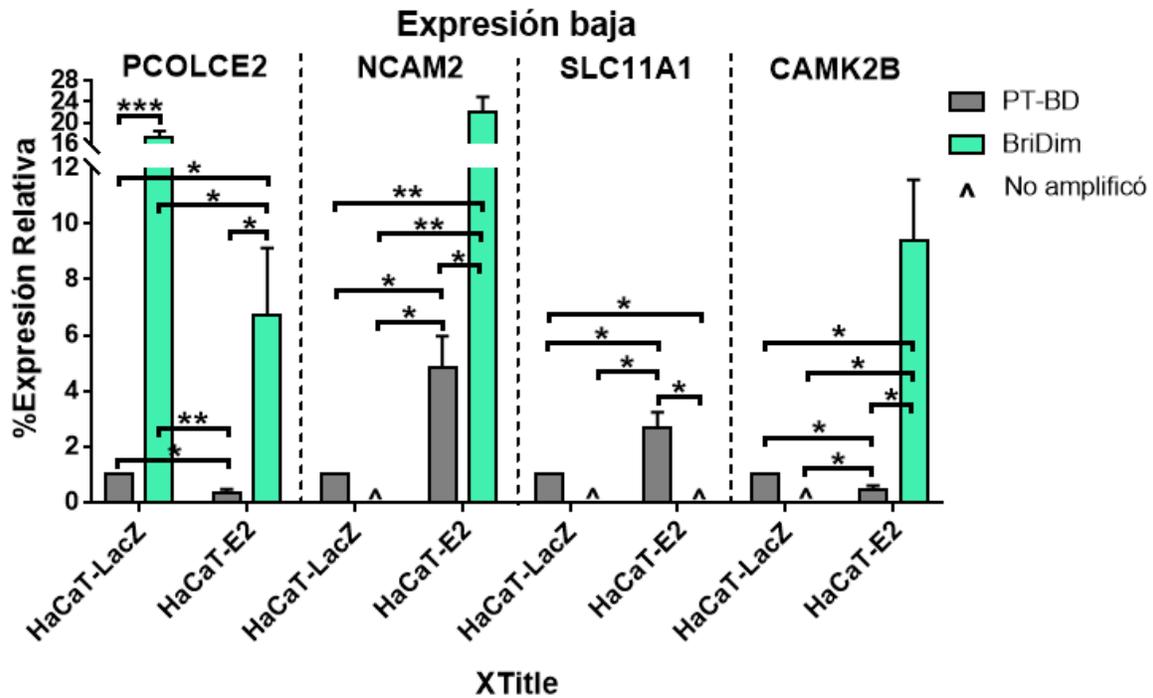


Figura 23. Niveles de expresión de genes cuyos niveles son bajos en la población total en subpoblaciones de células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216. Comparación entre subpoblaciones PT-BD (gris) y BriDim (azul) de ambas líneas celulares. Los valores son calculados con el método $\Delta\Delta Ct$, utilizando β -actina como control. Los resultados son representativos de 3 ensayos separados expresados como la media \pm DS.

En general, los resultados de la determinación de los niveles de transcritos de los genes incluidos en el estudio, nos indican que E2 del VPH16 afecta de manera diferencial la expresión de la mayoría de los genes analizados en las diferentes subpoblaciones de las células HaCaT y por lo tanto su efecto es selectivo para algunos tipos celulares y en muchos casos “enmascarado” si se analiza únicamente la expresión en la población general.

9.8. Inmunoprecipitación de la cromatina con $\alpha H3K4me3$ y $\alpha H3$ en la Población Total de células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216.

Bajo el supuesto de que E2 modifica la expresión de genes a través de cambios en la abundancia de las marcas de la cromatina relacionadas a los promotores bivalentes, se analizó la abundancia de la marca H3K4me3, así como de la histona

H3 sin esta metilación, en la población total en las células HaCaT control y con E2 de VPH16, analizando específicamente algunos de los genes en los que el análisis de expresión mostró una diferencia significativa; estos fueron p27, JunB, CCNA1, eIF5a2, SLC11A1 y NCAM2 (Fig. 24-26). Para este análisis se utilizaron 2 pares de oligonucleótidos que amplifican regiones distintas en cada gen, los denominados TAF1, que permiten amplificar un amplicón que incluye la región promotora y la secuencia iniciadora (Inr) a la cual se une dicha proteína, y otros que permiten amplificar una región corriente abajo del sitio de iniciación de la transcripción, incluyendo por lo tanto secuencias codificantes de estos genes (señalada en las gráficas como CR, Coding Region).

Al analizar las regiones del DNA donde se une TAF1 en los genes relacionados con ciclo celular (Fig. 24), las diferencias más evidentes se observan en JunB, en donde los niveles de H3 sin la metilación específica son marcadamente mayores en las células que expresan E2, mientras que la marca de H3 trimetilada disminuye en la misma proporción en estas células. Para las regiones codificantes en estos genes, los cambios más notorios se observan en el gen p27, en el que se detecta un comportamiento muy similar al observado en la región TAF1 de JunB, encontrando los niveles de H3 sin la metilación específica marcadamente mayores, y la marca H3K4me3 disminuída en la misma proporción en las células que expresan E2. Interesantemente, en el gen CCNA1 prácticamente no se observaron cambios en la abundancia de ambas histonas H3 entre las líneas celulares (Lac Z y E2) ni en su región TAF1, ni en la región codificante analizada.

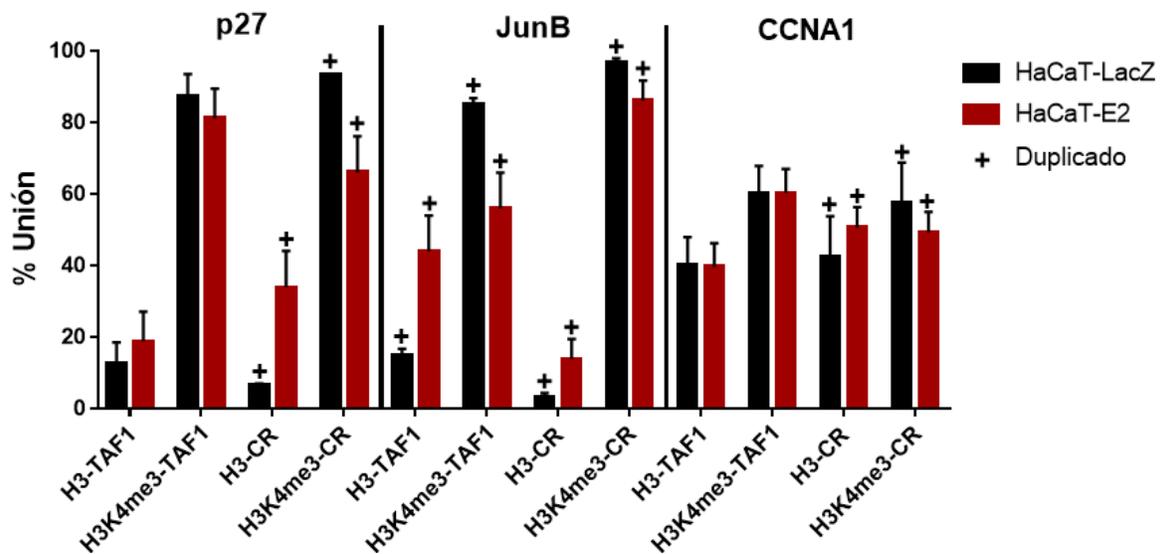


Figura 24. Análisis por qPCR de los ChIP con anti-H3 y anti-H3K4me3 de los genes del ciclo celular (p27, JunB y CCNA1) en población total de células HaCaT-LacZ (negro) y HaCaT-E216 (rojo) con oligonucleótidos para sitios TAF1 y CR. Los valores son calculados con el método $\Delta\Delta Ct$, empleando como control endógeno para normalizar el Input de cada muestra. Los resultados son representativos de 2 ó 3 ensayos separados expresados como la media $\pm DS$.

Para el gen *elF5a2*, se observó un comportamiento peculiar (Fig. 25), ya que se observaron cambios en la abundancia relativa de las histonas analizadas entre las líneas celulares, pero estos fueron en sentidos opuestos dependiendo de la región del gen analizada. Observamos que en la región TAF1 de este gen, en las células que expresan E2 el nivel de H3 sin la metilación particular disminuye, aumentando la H3K4me3; mientras que en la región codificante, el nivel de H3 aumenta y el de H3K4me3 disminuye en estas células.

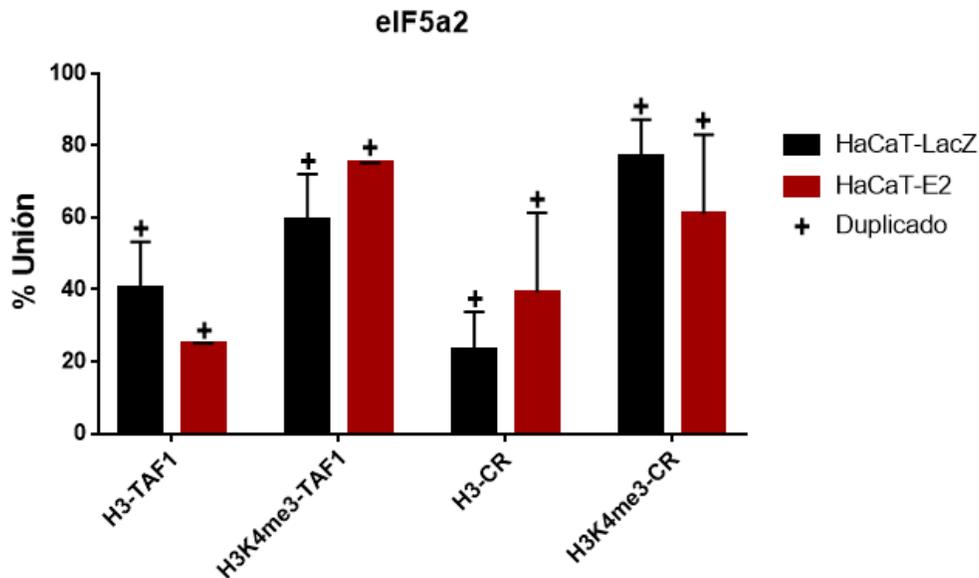


Figura 25. Análisis por qPCR de los CHIP con anti-H3 y anti-H3K4me3 del gen eIF5a2 en población total de células HaCaT-LacZ (negro) y HaCaT-E216 (rojo) con oligonucleótidos para sitios TAF1 y CR. Los valores son calculados con el método $\Delta\Delta Ct$, empleando como control endógeno para normalizar el Input de cada muestra. Los resultados son representativos de 2 ensayos separados expresados como la media $\pm DS$.

Por último, para los genes SLC11A1 y NCAM2 (Fig. 26), únicamente se analizó la región codificante, debido a que estos carecen de secuencia Inr en su promotor. Para el gen SLC11A1 observamos que en las células que expresan E2, los niveles de H3 sin la metilación específica tienden a ser menores, mientras que los de la H3K4me3 se incrementan (comportamiento similar al observado para la región TAF1 de eIF5a2). Para el caso del gen NCAM2, aunque prácticamente no se observaron diferencias en el nivel de estas histonas tanto en ausencia como en presencia de E2, la tendencia observada fue hacia una disminución en la marca H3K4me3.

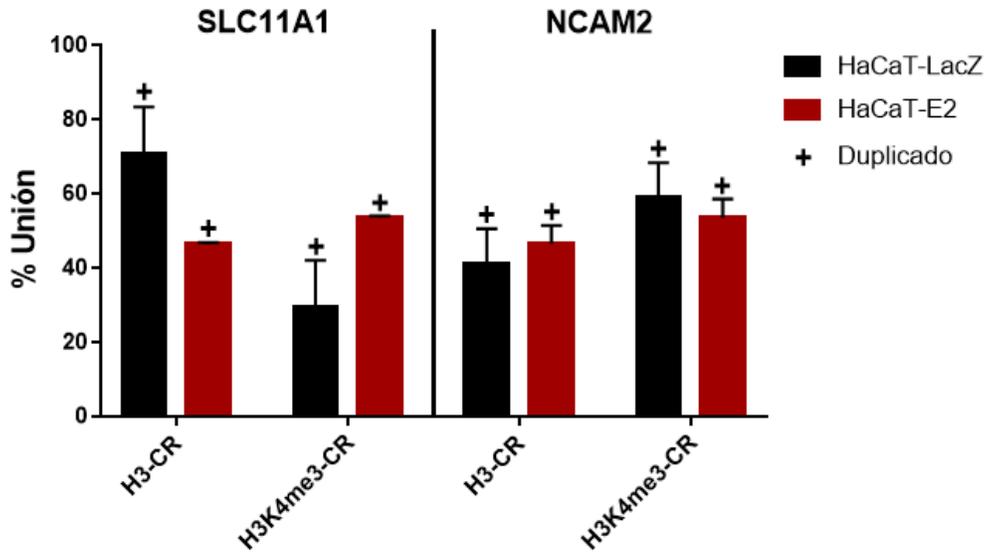


Figura 26. Análisis por qPCR de los ChIP con anti-H3 y anti-H3K4me3 de los genes SLC11A1 y NCAM2 en población total de células HaCaT-LacZ (negro) y HaCaT-E216 (rojo) con oligonucleótidos para sitios CR. Los valores son calculados con el método $\Delta\Delta Ct$, empleando como control endógeno para normalizar el Input de cada muestra. Los resultados son representativos de 2 ensayos separados expresados como la media \pm DS.

La modificación en la unión relativa por consecuencia de E2 tuvo efectos diversos en los genes analizados; sin embargo, en general estos resultados nos indican la habilidad de la proteína E2 de modificar la abundancia de la marca de la cromatina H3K4me3 relacionada a activación transcripcional, disminuyendo su presencia en la mayoría de los casos. Esto se correlaciona con la disminución en los niveles de los transcritos analizados que se detectó en la población total de las células HaCaT-E216.

10. DISCUSIÓN

10.1. E2 apaga de forma general los genes en la Población Total

Como se destacó en la Fig. 17, E2 de VPH16 produjo una disminución en la expresión de la mayoría de los genes analizados en la población total en la línea celular HaCaT. Esto no fue del todo inesperado, ya que este aparente apagado generalizado de genes había sido previamente reportado por nuestro grupo de investigación en 2011, en donde se encontró que de los genes afectados tras la expresión del gen E2, aproximadamente el 66% fueron reprimidos en células C-33A (Ramirez-Salazar, E., 2011).

Una forma mediante la cual E2 podría estar efectuando este apagamiento génico de forma generalizada es mediante modificaciones epigenéticas (especialmente metilaciones, ya que estas han sido las más asociadas a una represión de la expresión), a través de interacciones de la proteína E2 con la maquinaria epigenética. A este respecto, se ha reportado en numerosas ocasiones que E2 es capaz de interactuar con múltiples proteínas celulares, siendo la mayoría de estas relacionadas con la transcripción. En el trabajo de Jang y cols. en 2015 se identificaron más de 200 diferentes proteínas que interactúan con E2 por medio de un método de purificación por afinidad en tándem acoplado a espectrometría de masas. En este trabajo, en el que se utilizaron 11 diferentes proteínas E2 de 7 diferentes géneros de *Papillomaviridae*, que se expresaron establemente en la línea celular C-33A, se identificó que las proteínas E2 interactúan con múltiples remodeladores de la cromatina como son SWI/SNF (SMARCA4), NuRD (CHD4, SMARCA5, HDAC1/2, MTA1/2), WICH (BAZ1B, SMARCA5) y TRRAP/TIP60 (INO80, EP400, TRRAP); así como con varias proteínas modificadoras de histonas como acetil transferasas TRRAP/TIP60 (INO80, p400, TRRAP, TIP60); deacetyltransferasas NCOR1/HDAC; la demetilasa KDM1B; y metilasas WR5, WHSC (WHSC1, WHSC1L1, SALL4) y PRMT5. Esta extensa variedad y cantidad de proteínas de la maquinaria epigenética con las que interactúa E2, nos lleva a pensar que, a través de la interacción con estas (ya sea no permitiendo el

ensamblaje adecuado de los complejos o dirigiéndolos de alguna forma), podría modular de manera general la transcripción de genes al modificar las marcas de la cromatina y por lo tanto volverla más o menos permisiva a la transcripción (Jang, K. 2015, Muller, M. 2012).

10.2. E2 tiene efectos diferenciales sobre la expresión génica en cada subpoblación celular componente del cultivo de células HaCaT

Se encontraron múltiples genes en los que el efecto de E2 fue diferencial dependiendo de la subpoblación analizada, esto podría deberse a diferentes razones. Una de estas es que la estructura de la cromatina de la subpoblación progenitora es considerablemente diferente a la de una subpoblación no troncal. Se ha descrito que como resultado de eventos epigenéticos, el nivel de compactación de la cromatina, su accesibilidad y posicionamiento dentro de dominios nucleares especializados, sufren cambios dinámicos durante la diferenciación de células troncales, demostrado por cambios en los componentes de organización de la cromatina, como la heterocromatina, cuerpos promielocíticos de leucemia (PML NBs) y posicionamiento del centrómero. La cromatina de células troncales pluripotentes se encuentra notablemente sin heterocromatina, sugiriendo que estas células tienen una estructura de la cromatina abierta o suelta. Una cromatina abierta correlaciona con un estado transcripcional globalmente permisivo, y se ha propuesto que contribuye a la plasticidad del desarrollo, o pluripotencia de las células troncales embrionarias. Mientras la diferenciación avanza, las células sufren una reorganización global de la cromatina, llevando a la acumulación de una heterocromatina más rígida, conducida por la compactación de repetidos satélite mayores y regiones pericéntricas de algunos cromosomas, resultando en foci de heterocromatina concentrados detectables a través de análisis citológico. Esto sugiere que la naturaleza pluripotente de las células troncales embrionarias se vuelve más restringida transcripcionalmente, debido a la condensación y maduración de la heterocromatina a partir de la diferenciación (Tollervey, J. R., 2012).

Con base a lo anterior, la cromatina de células troncales es más relajada y dinámica y por lo tanto mucho más fácil de acceder para la maquinaria epigenética en comparación con la cromatina de las células diferenciadas; es decir, los efectos que puede tener la proteína viral E2 al interactuar con las diferentes proteínas que modifican la cromatina podrían ser más severos gracias al fácil acceso que se tiene a la cromatina en estas células. Además, probablemente la cromatina de las células troncales se encuentre con un control más estricto de la maquinaria epigenética, por lo que un desbalance en esta fina regulación afectaría la transcripción génica de una manera más evidente.

Por otra parte, se han descrito complejos remodeladores de la cromatina, como SWI/SNF, que presentan subunidades características de la subpoblación troncal. Este complejo comprende de 9 a 12 subunidades, de las cuales una o dos son subunidades catalíticas ATPasa mutuamente excluyentes: BRM (también conocido como SMARCA2) o BRG1 (SMARCA4), y son expresadas diferencialmente. Las células troncales expresan las subunidades BRG1, BAF155 y BAF60A, mientras que tras la diferenciación, ocurre un switch de expresión de subunidades y estas son reemplazadas por BRM, BAF170 y BAF60C, respectivamente. Por lo tanto, la consecuencia de un ambiente en el que E2 se encuentra presente, con respecto a los complejos remodeladores de la cromatina, podría ser diferente dependiendo de la subpoblación que se analice, ya que sus componentes son significativamente diferentes y por eso, el efecto de E2 puede ser particular para cada subpoblación (Tollervey, J. R., 2012).

10.3. Efectos de E2 con base en la función de los genes analizados

Para entender mejor el contexto en el cual E2 actúa y tener una mejor comprensión de los datos obtenidos, se analizará el efecto de su expresión en los genes seleccionados clasificándolos por su función (como se describió en los resultados) y relacionándolo con las ventajas que esto puede otorgarle al virus. Cabe destacar que estos genes no fueron seleccionados por su función, sino por los criterios de inclusión mencionados anteriormente. Estos criterios son los siguientes: Genes con

promotores bivalentes, que contengan una isla CpG dentro de su secuencia, y que su expresión sea modulada por TAF1 y modificada por E2 de VPH16.

10.3.1. Ciclo celular.

El ciclo celular consiste de una serie de eventos que llevan a la duplicación del ADN (replicación) y división celular para producir dos células hijas. La proliferación de las células de mamíferos es estrictamente controlada por la activación ordenada de ciclinas dependientes de cinasas (Cdks). El inhibidor de Cdk, p27 es un supresor de tumores que regula la transición de la fase del ciclo celular G0 a la fase S al unirse e inhibir la actividad de las Cdks (Song, W. 2015).

En los resultados se observa un aumento de la expresión de p27 en las células BriDim en presencia de E2, posiblemente relacionado con un proceso de diferenciación. Se ha descrito que cambios en la expresión de genes, controlan diferentes procesos, como son la proliferación y diferenciación de queratinocitos. De estos cambios, una regulación a la alta de los inhibidores de Cdks p21^{Cip1/WAF1} y p27^{Kip1} en este tipo de células, se asocia con un arresto en el crecimiento y el comienzo de la diferenciación terminal. Por lo tanto, este aumento implicaría la detención del crecimiento y la salida de la troncalidad de estas células, lo cual se ve reflejado en las proporciones de las subpoblaciones en los análisis de citometría de flujo. Sin embargo, este arresto no resulta automáticamente en la diferenciación terminal, sino que esta debe de ser juzgada por el aumento de marcadores específicos tanto a nivel transcripcional como protéico (Hara. T. 2011; Imamura, Y. 2014; Kolly, C. 2005).

Por otro lado, la familia del factor de transcripción AP-1, que integra reguladores transcripcionales compuestos ya sea por homodímeros de Jun o JunB, o heterodímeros de una proteína Jun y una Fos, se expresan en la epidermis de una manera específica según el grado de diferenciación de las células. Estos regulan la expresión génica en queratinocitos y tienen papeles importantes en múltiples procesos biológicos, como la proliferación celular, transformación, motilidad y diferenciación. Los niveles de expresión de varios genes específicos de

diferenciación, como loricrina, filagrina, involucrina y transglutaminasa, son controlados por AP-1 en la epidermis (Oldak, M. 2010).

Uno de los heterodímeros de la familia AP-1 es el de Fra-1 y JunB, el cual se ha demostrado que se expresa en las células basales *in vivo*. En esta población se demostró que JunB/Fra-1 se une al promotor y regula la expresión de β 4-integrina de una manera específica en la diferenciación. Esta integrina es detectada en la capa basal del epitelio estratificado, donde se une a las lamininas de la membrana basal y mantiene la firme asociación de la epidermis con la dermis. La pérdida de la unión a la membrana basal es un pre-requisito de los queratinocitos para moverse a la capas suprabasales, más diferenciadas, por lo que β 4-integrina no se expresa en las células suprabasales (Oldak, M. 2010).

En queratinocitos indiferenciados humanos normales con alta expresión de β 4-integrina, el promotor de este gen se encontró fuertemente unido por el heterodímero JunB/Fra-1, mientras que tanto la expresión β 4-integrina como la ocupación de su promotor por JunB/Fra-1 disminuye gradualmente durante la diferenciación. Los resultados de Oldak y cols. en 2011 demostraron una disminución cuantitativa en la unión de JunB/Fra-1 en queratinocitos humanos (células NHK) tanto en la diferenciación, como por la expresión de E2 de VPH8 (hasta un 84%), ya que E2 compite por el sitio de unión en el promotor por medio de su sitio de unión al ADN. Cabe destacar que la unión de JunB/Fra1 al promotor de β 4-integrina fue corroborada en células HaCaT en este mismo trabajo (Oldak, M. 2010).

Nuestros resultados reflejan una disminución en el transcrito para el gen JunB en las células progenitoras. Esta baja en los niveles del mRNA de este gen puede tener como consecuencia una disminución en la eficiencia del factor para formar heterodímeros y unirse a diversos promotores blanco, o bien un desplazamiento de JunB/Fra-1 de los promotores, entre ellos el de β 4-integrina. Si E2 es capaz de unirse a la secuencia blanco del heterodímero JunB/Fra-1 en el promotor de este gen, podría implicar su unión a otros blancos de JunB/Fra-1, que como se mencionó anteriormente, son genes relacionados a procesos de proliferación celular,

transformación, motilidad y diferenciación. Esto tendría como consecuencia la diferenciación de los queratinocitos de la capa basal, dato que de nuevo corresponde con lo encontrado en los análisis de citometría de flujo, donde el cambio de la distribución de las subpoblaciones celulares indica una diferenciación temprana de las células.

Las ciclinas son una familia de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular. La ciclina A1 (CCNA1) contribuye a la progresión de la fase G1 a la S del ciclo en células somáticas y juega un papel en el mantenimiento de la proliferación celular; su sobre-expresión promueve la entrada a la fase S. Esta ciclina se expresa mayormente en testículo y cerebro y se piensa que su función principal es el control del ciclo celular meiótico de la línea germinal. Además, la CCNA1 se ha reportado como gen supresor de tumores en múltiples tipos de cáncer incluyendo el cáncer cervico-uterino, y se ha correlacionado una alta metilación de su promotor con el desarrollo de cáncer cervical invasivo (Zuo, Q. 2014)

Aunque se ha reportado un nivel de expresión de CCNA1 mayor en muestras con genomas virales en forma episomal (que expresan E2) que en forma integrada (pérdida de E2), y esto se ha relacionado con un menor nivel de metilación del promotor de CCNA1 en las muestras E2 positivas, nuestras observaciones sobre el efecto diferencial en la expresión de esta ciclina tras la expresión de E2 en las diferentes subpoblaciones componentes de cultivos de la línea celular HaCaT, sugieren que en el ciclo replicativo del virus, CCNA1 podría jugar algún papel (Yanatatsaneejit, P. 2015; Zuo, Q. 2014).

Se ha demostrado que en lesiones cervicales, la metilación del promotor de CCNA1 es modulada por la presencia del VPH, lo que podría estar relacionado con el papel de esta ciclina en la vía de reparación de rupturas de doble cadena del ADN, en la que interactúa con el complejo Ku70/Ku80, específicamente, fosforilando a Ku70. Lo anterior concuerda con publicaciones que describen una reparación de rupturas de doble cadena deficiente en líneas celulares de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello VPH positivas, por lo que el virus podría estar afectando esta vía de reparación (Müller-Tidow, 2004; Rieckmann, T. 2013).

Por lo tanto, al encontrarse disminuida la expresión de la CCNA1 en un 55% en la subpoblación PT-BD que representa la gran mayoría de la población celular (95%), este defecto en la reparación de daños al ADN desencadenaría una mayor inestabilidad genómica y así contribuiría a la progresión del cáncer. Por otra parte, en la subpoblación BriDim encontramos un aumento en la expresión de este gen, que se enciende gracias a la presencia de E2. La sobre-expresión de CCNA1 promueve la entrada a la fase S del ciclo celular, lo cual es consistente con la salida de la quiescencia de las células BriDim, correspondiendo con la tendencia descrita anteriormente

La ciclina D3 (CCND3) es una de las 3 ciclinas tipo D que forman un complejo y funcionan como subunidad regulatoria de las cinasas CDK4 o CDK6, cuya actividad es requerida para la transición de la fase G1/S del ciclo celular. Se ha demostrado que esta proteína interactúa y está involucrada en la fosforilación de la proteína supresora de tumores Rb promoviendo el inicio del ciclo celular. Entre las ciclinas, CCND3 ha sido detectada sobre-expresada en múltiples tipos de cáncer, como cáncer endometrial, tumor estromal gastrointestinal, cáncer del tracto aerodigestivo, carcinoma de células renales y cáncer de próstata, pero disminuido en cáncer de seno y en adenocarcinoma ovárico (Huang, B. 2015).

Nuestros datos indican diferencias significativas en la expresión de esta ciclina, entre las poblaciones PT-BD y BriDim de ambas líneas celulares (LacZ y E2), por lo que designamos a este como un “Gen BriDim”. Dada la función de la ciclina D de promover el inicio del ciclo celular, esta designación podría resultar contradictoria, sin embargo se ha reportado la expresión de esta ciclina en células troncales hematopoyéticas quiescentes (HSC), específicamente de las ciclinas D2 y D3. Una posible razón es que la progresión estocástica al ciclo celular depende de combinaciones permisibles de activadores e inhibidores del ciclo celular, generadas por fluctuaciones (aleatorias) de niveles y actividades de proteínas individuales. Además, en células troncales hematopoyéticas (HSC) se ha demostrado que la entrada al ciclo celular depende de exceder un límite de señales activadores y/o

atenuantes con muchas diferentes combinaciones posibles de eventos que desencadenan el mismo resultado (Ruscetti, F.W. 2004).

Es bien sabido que las células de la capa basal del epitelio estratificado dividiéndose activamente, son el blanco de la infección por el VPH; sin embargo una buena parte del ciclo de vida viral tiene lugar en las células suprabasales que se encuentran diferenciándose. La replicación de este virus depende críticamente de la coexistencia de la maquinaria de replicación celular y de eventos de diferenciación en los queratinocitos. Sin embargo, en queratinocitos normales este proceso se encuentra separado y confinado ya sea a las células basales o al compartimiento de células suprabasales diferenciándose. Por lo tanto es interesante que la consecuencia principal observada de la expresión de E2 del VPH16 en los genes relacionados con el ciclo celular sea un comienzo de la diferenciación terminal de los queratinocitos, que implica una salida del estado de troncalidad de las células BriDim. Esto resulta muy conveniente en cuestión del ambiente viral ya que, como se mencionó anteriormente, la replicación del virus depende de la diferenciación de los queratinocitos, por lo que E2 sería capaz de generar un ambiente celular más adecuado para dar lugar a la amplificación del genoma viral en etapas iniciales de la infección, en el que las células se encuentren diferenciándose activamente (Oldak, M. 2010).

10.3.2. Oncogenes

Los oncogenes son genes que han mutado y cuyos productos se asocian a la transformación neoplásica, en su estado normal se les conoce como proto-oncogenes. Un ejemplo de estos es la proteína Ras, que funciona como un switch de GTPasa regulado, a través de un proceso conocido como transducción de señal, en el cual la proteína H-Ras retransmite un espectro diverso de señales del ambiente extracelular (incluyendo mitógenos y factores de diferenciación) al núcleo, que instruyen a la célula a crecer o dividirse. La función más descrita de Ras es activar la cascada de cinasas citoplásmicas Raf-MEK-ERK, aunque también Ras activado estimula una multitud de cascadas de señal “río abajo” como la vía Akt/PKB

que promueve la supervivencia celular. Además activa al factor de transcripción NF- κ B el cual juega un papel anti-apoptótico. Los genes Ras son expresados en una manera tejido-específica: HRas es altamente expresado en la piel y músculos esqueléticos (Membrino, A. 2011; Shields, J. M. 2000).

Nuestros resultados sobre la expresión de este gen indican que no existen diferencias significativas entre las líneas celulares analizadas, pero sí observamos una alta expresión de este gen en las células progenitoras, por lo que este gen también fue clasificado como “Gen BriDim”. Aparentemente E2 no afecta la transcripción de este gen, aunque se observa una tendencia a su aumento en la subpoblación BriDim. Es difícil esclarecer el rol de este gen en nuestra línea celular ya que Ras medía acciones en formas mecanísticamente distintas, dependiendo tanto de la especie como del tipo de identidad celular. Frecuentemente, la cooperación de múltiples efectores es requerida para causar acciones específicas de Ras. Por ejemplo, la progresión por Ras a través de la fase G1 del ciclo celular es mediada, en parte, por el aumento de la expresión de la ciclina D1 por Raf, RalGDS y PI3Ky la activación transcripcional de E2F. Entonces, probablemente Ras utiliza distintos grupos de efectores y en diferentes combinaciones para efectuar diversas acciones biológicas. Podría especularse, debido a los resultados obtenidos en general en los genes del ciclo celular, que en la subpoblación BriDim cuando E2 se expresa, la transcripción del gen HRas se encuentra ligeramente aumentada, probablemente propiciando la progresión del ciclo celular y la consecuente salida de la troncalidad de estas células (Vaughan, M. B. 2009).

Por otra parte, el factor eucariótico de iniciación de la traducción 5A2 es esencial para la viabilidad de las células eucarióticas ya que actúa principalmente como un factor de elongación durante el paso de la traducción del RNAm y es requerido para el establecimiento de la polaridad de la actina. La disminución de la expresión de este factor en la subpoblación PT-BD refleja una caída en la traducción de un número de genes, estando de acuerdo con una caída generalizada de la expresión ya reportada por la presencia de E2. Con respecto a las células progenitoras, observamos un aumento de la expresión de este gen en esta subpoblación. El

aumento de la expresión de eIF5a2 ha sido relacionado con un mal pronóstico en melanoma y en otros tipos de cáncer. Tratándose de un regulador de la homeostasis de poliaminas, su desregulación puede alterar el crecimiento celular e inducir tumorigénesis (Bao, Y. 2015; Khosravi, S. 2016; Liu, Y. 2014).

RNF125 es una proteína del tipo E3 ubiquitin-ligasa, cuya función más estudiada es participando como regulador positivo de la vía de señalización del receptor de células T. Sin embargo, interesantemente, también promueve la degradación de p53, reprimiendo sus funciones que incluyen la transactivación p53-dependiente y la inhibición del crecimiento celular, mediante la promoción de su degradación vía ubiquitin-proteosoma. Es interesante remarcar la tendencia de expresión a la baja de este gen en las células progenitoras, en presencia de E2, ya que podría implicar una disminución en la degradación de p53 y por consiguiente un aumento de esta proteína que podría traer como consecuencia un aumento de la apoptosis celular. Por lo tanto, esto podría representar una forma de defensa de la célula al daño causado por la presencia de la proteína viral. (Liu, Z. Y. 2017; Yang, L. 2015).

Por último, la proteína interactuante del gen transformante de tumores de pituitaria 1 (PTTG1IP por sus siglas en inglés, también denominada factor de unión a PTTG1 o PBF) es un oncogén, detectado originalmente como una proteína de 22 kDa unida a la securina, que es expresado fuertemente en células epiteliales de todo tipo. La securina, el producto proteico del gen PTTG1, en cambio, es un proto-oncogén descrito primeramente en células tumorales de pituitaria de rata. Ambas proteínas tienen un papel importante en la compleja red regulatoria responsable de la liberación controlada de las cromátides hermanas durante la transición metafase/anafase del ciclo celular. PTTG1IP promueve la activación de la securina al facilitar el cambio de la securina del citoplasma celular al núcleo, permitiendo la interacción entre la separasa y la securina. Además de este papel en la transición metafase/anafase, se ha reportado que PTTG1IP interactúa con la securina en la transactivación de FGF-2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2) y en la regulación del simporter de sodio humano en células tiroideas. Sin embargo, no se conoce el

espectro completo de funciones de PTTG1IP, por lo que se encuentra poco caracterizado (Repo, M. L. 2014; Xiang-Peng W. 2014).

Existe evidencia contradictoria sobre la relación de este gen con el cáncer. Se ha reportado que su sobre-expresión aumenta la capacidad de invasión celular independientemente del incremento en la proliferación, tanto en cáncer de seno como cáncer colorectal. En contraste, en el material reportado por Repo y cols. en 2014 que comprende todos los subtipos de carcinoma de seno, con un seguimiento de las pacientes hasta durante 22 años, fue muy baja o nula presencia de PTTG1IP la que se asoció con un incremento de 1.5 veces del riesgo de muerte por cáncer de seno. Este subgrupo negativo para PTTG1IP, contenía la mayoría (78%) de carcinomas de seno triple negativo, donde esta nula expresión de PTTG1IP se combinaba con una expresión alta de securina, localizada en el citoplasma de células cancerosas. Este descubrimiento está de acuerdo con literatura previa en la que se indica que la falta de PTTG1IP restringe la nuclearización de la securina (Repo, M. L. 2014).

La presencia de E2 provoca una caída de los niveles de expresión de PTTG1IP en ambas subpoblaciones celulares estudiadas. De acuerdo a la función de este gen, esto implicaría un desplazamiento de la securina en el citoplasma entorpeciendo la transición metafase/anafase provocando probablemente una falla en la separación de las cromátides hermanas en la mitosis. Hay que destacar que no se conoce mucho de las funciones de este gen y por lo tanto especular sobre su papel en el contexto de la expresión de E2 y del ciclo replicativo viral, resulta difícil.

En conjunto, el análisis de los cambios en la expresión de oncogenes generados por E2, nos indica un estado con alteraciones en algunos de los procesos celulares fundamentales, como el control del ciclo celular y la proliferación. Resulta interesante sugerir que en las células progenitoras, estos cambios podrían resultar de un reconocimiento de daño y debido a esto cambiar su destino hacia la diferenciación celular.

10.3.3. Genes con baja expresión en células HaCaT-LacZ

El producto del gen PCOLCE2 es un potenciador funcional de la procolágeno proteinasa-C. Este gen se expresa abundantemente en corazón de humano adulto y además se expresa en menor medida en la glándula pituitaria, vejiga, glándulas mamarias y tráquea. Se ha reportado que esta proteína se une en un número de sitios de la triple hélice de colágeno. Aunque observamos expresión de este gen en niveles alrededor de 16 veces mayores en las células BriDim de la línea celular control, la expresión de E2 provocó una reducción por igual de la expresión de este gen en ambas subpoblaciones. La disminución de la expresión de este gen ha sido relacionada con cambios estructurales en el colágeno dérmico en la piel, específicamente en muestras de piel de pacientes humanos con diabetes tipo 2. Cabe destacar que el colágeno es la proteína más abundante de la piel y que por lo tanto, la presencia de la proteína viral podría dañar la estructura celular y esto facilitar subsecuentes infecciones. También es posible que la detección de este daño lleve a una disminución de la auto-renovación celular y al comienzo de la diferenciación, proceso que se encuentra evidentemente favorecido en las células HaCaT-E216. Además resulta evidente que esta proteína poco caracterizada, es de suma importancia para la estructura celular de las células progenitoras, debido a la alta expresión detectada en esta subpoblación en las células HaCaT-LacZ (Steiglitz, B. M. 2002; Wu, C. 2017).

Por otro lado, las moléculas de adhesión celular (CAMs) modulan la transducción de señal intracelular a través de interacciones mediadas por sus dominios citoplasmáticos o a través de interacciones entre su parte extracelular y receptores de factores de crecimiento. La molécula de adhesión de células neurales 2 es un homólogo cercano de la molécula de adhesión de células neurales 1 (CD56) y forma trans-interacciones homofílicas (Takahashi, S. 2010).

Durante el desarrollo embrionario humano, NCAM2 es expresado en distintos tejidos, incluyendo pulmón, hígado, y riñón con una mayor expresión en el cerebro. El nivel de expresión de NCAM2 llega a su máximo en el día 21 postnatal y se

mantiene en la adultez, sugiriendo que la proteína es necesaria tanto durante el desarrollo como en cerebros adultos (Leshcyns'ka, I. 2015).

Con respecto al análisis realizado en este trabajo, en este gen se encontró un aumento en su expresión en ambas subpoblaciones estudiadas siendo más marcado en las células BriDim, aumentando 22 veces, siendo este el mayor cambio registrado en este estudio; además es muy interesante la observación de que este gen pasó de un estado totalmente apagado, a una expresión tan importante. Aunque la función de NCAM2 ha sido asociada principalmente a actividades de transducción de señal en el cerebro, pareciera tener una alta importancia en el ciclo viral en este modelo de queratinocitos, debido al aumento tan significativo de su expresión. Esto podría estar relacionado a que se ha descrito que las CAMs que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, tienen un papel en el control de la proliferación y diferenciación de las células troncales neurales embrionarias y de adulto, específicamente que NCAM y sus ligandos inhiben la proliferación e inducen la diferenciación de las células progenitoras neurales del hipocampo. Si realizamos una extrapolación a las células progenitoras del linaje epitelial analizadas en este trabajo, en el que además se han descrito múltiples genes alterados relacionados con procesos de proliferación y diferenciación, podríamos deducir que este gen podría estar desarrollando una función muy similar a la que se le atribuyó en células neurales, induciendo a la diferenciación (Amoureux, M. C. 2000; Deleyrolle, L. 2015).

El miembro 1 de la familia de acarreadores de soluto 11 (SLC11A1), antes conocido como la proteína de macrófagos asociada a resistencia natural 1 (NRAMP1), es una proteína transmembranal implicada previamente en enfermedades autoinmunes y en la defensa del huésped contra enfermedades infecciosas. Su expresión normalmente es detectable sólo en células de origen mieloide (monocitos, macrófagos y células dendríticas), por lo que es de esperarse su baja expresión en la línea celular HaCaT (Feng, Y. 2013).

Este gen codifica una proteína integral de membrana que medía el transporte de iones divalentes, activando macrófagos y ejerciendo otros efectos pleiotrópicos en

el sistema inmune innato. Los datos disponibles indican que esta proteína protege al huésped contra patógenos intracelulares como *Salmonella spp.* al controlar la homeostasis del hierro dentro de macrófagos, limitando el acceso del patógeno a este elemento esencial dentro del hospedero, y al mismo tiempo promueve un aumento en la producción de moléculas efectoras antimicrobiales (Petrucci, M. F. 2018).

En nuestro modelo de estudio, encontramos que SLC11A1 se expresa únicamente en la subpoblación PT-BD y que esta expresión aumenta en un ambiente en el que E2 se encuentra presente. La expresión aumentada de este gen ha sido reportada en queratinocitos de pacientes con quemaduras severas, sugiriendo que participa en la respuesta inmune innata como consecuencia a la presencia de heridas en el tejido, por lo que la expresión aumentada de este gen refleja quizá un mecanismo de defensa celular, al encontrarse una proteína extraña en el ambiente y que lo modifica de manera generalizada. El gen SLC11A1 puede ejercer algunos efectos en la señalización del sistema inmune como son la activación de macrófagos, la regulación de interleucina 1- β , y la inducción de iNOS, moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II, y el factor de necrosis tumoral α (TNF α), entre otros. Sin embargo, se requieren estudios más profundos para elucidar de manera completa el posible mecanismo de defensa (Petrucci, M. F. 2018).

Por último, los miembros de la familia CAMK2 son esenciales para la plasticidad sináptica y el aprendizaje normal en el hipocampo, córtex y cerebelo. La proteína cinasa dependiente de calmodulina 2B (CAMK2B), es una cinasa de serina/treonina altamente conservada con diferentes funciones fisiológicas en diferentes tejidos. Es altamente expresada en el cerebro y juega un papel enzimático y estructural en la plasticidad del hipocampo y el cerebelo (Fang, M. 2014; Kool, M. J. 2016).

CAMK2B es un sensor de calcio expresado ubicuamente, regula funciones celulares diversas, incluyendo la regulación del citoesqueleto de actina y la transcripción dependiente del factor CREB. Interesantemente, en nuestro análisis encontramos un incremento de la expresión de este gen en las células BriDim, pasando de un

estado apagado a una expresión alrededor de 9 veces mayor. El análisis de König y cols. en 2010 nos brinda una idea de lo que pueda estar sucediendo en estas células, ya que en este reportaron a esta cinasa como un regulador de la transcripción del ARN del virus de influenza A y que el uso de un inhibidor específico de CAMK2B (KN-93), es capaz de inhibir el crecimiento de este virus. Por lo tanto, aunque existen diferencias obvias entre los virus (influenza tiene un genoma de ARN y papilomavirus de ADN) pero con células blanco similares (células epiteliales), esta proteína regula la transcripción de genomas virales, por lo que podría tener un papel similar en el contexto de E2 (König, R. 2010).

Debido a que este grupo de genes se distinguió por su baja expresión en las células HaCaT y por consiguiente, su función se lleva a cabo preferentemente en diferentes tipos de células (piel, cerebro y células del sistema inmune, principalmente), sus funciones son muy diversas. Por los cambios en la expresión de estos genes podemos inferir que E2 podría modificar la estructura de colágeno celular y activar vías de defensa contra patógenos intracelulares, como es el VPH. Además, modifica la expresión de algunos genes que podrían ayudar a la transcripción viral y por último, los datos discutidos en esta sección reafirman la idea de que la principal consecuencia de la expresión de E2 en las células progenitoras es la inducción a la diferenciación celular. La mayoría de los genes de esta categoría se encuentran pobremente estudiados en queratinocitos, por lo que resulta difícil establecer de manera concreta las consecuencias biológicas de los cambios en su expresión generados por la presencia de E2.

10.4. E2 modifica la abundancia de la marca de cromatina H3K4me3

Una vez que se determinó que E2 es capaz de modular la expresión de diversos genes, tanto en la población total como en las distintas subpoblaciones, se decidió evaluar si esto sucedía mediante modificaciones epigenéticas, específicamente mediante la eliminación de la marca de activación transcripcional H3K4me3, en población total.

Al analizar la unión relativa de la histona H3 y de la histona trimetilada en la lisina cuatro, en la región del promotor (donde se une TAF1) para los genes del ciclo celular, observamos una clara tendencia a la disminución de H3K4me3 siendo significativa únicamente en el gen JunB. Esto quiere decir que en general en los genes implicados en ciclo celular, los niveles de la histona H3 con la marca de activación analizada, no tienen un cambio marcado en esta región. Sin embargo, si analizamos los resultados del gen p27 en la región codificante, podemos observar una disminución de la marca H3K4me3, lo que corresponde perfectamente con el estado esperado, ya que una disminución de las marcas de activación reflejarían un estado en el que en presencia de E2, la cromatina se encuentre más condensada. El análisis de estas marcas epigenéticas en el gen de CCNA1 no mostró diferencias en su estado, ya sea en ausencia o presencia de E2, lo que sugiere que los efectos que la proteína viral provoca sobre su expresión son debidos a otros mecanismos. Interesantemente, para el gen eIF5a2 el comportamiento de estas marcas epigenéticas fue dual, observándose un ligero incremento en el nivel de H3K4me3 en la región de TAF1, pero una disminución de esta en la región codificante. Esta observación sugiere que el aumento en esta marca epigenética en la región TAF1 es más decisiva para la actividad transcripcional de este gen, ya que sus niveles de ARNm fueron mayores en presencia de E2. Por último, tenemos los genes NCAM2 y SLC11A1, en los que se evaluó el nivel de unión únicamente en la región codificante. Para el gen SLC11A1 se observó un patrón muy similar al de la región TAF1 de eIF5a2, con un claro incremento en la marca H3K4me3, lo que correlaciona con el incremento en su expresión observado en las células en la que E2 está presente. Para NCAM2, no se encontraron diferencias importantes en la abundancia relativa de estas marcas epigenéticas, lo que sugiere, al igual que para el gen CCNA1, que el efecto que E2 ejerce sobre su expresión, podría deberse a mecanismos distintos a esta modificación de la histona H3, como por ejemplo cambios en la metilación en la región de islas CpG en su promotor, o bien mecanismos no epigenéticos.

En general los resultados de las marcas de la cromatina corresponden a lo esperado para los genes analizados, los cuales tuvieron una expresión significativamente

menor en la población total cuando se encontraba presente E2, y por lo tanto se esperaba una disminución de la marca de activación transcripcional H3K4me3. En mamíferos, la metilación de H3K4 es catalizada por SET1-SETD1A, SETD1B, MLL1, MLL2, MLL3 y MLL4. Estos complejos comprenden las subunidades catalíticas de SETD1/MLL, junto con 4 subunidades centrales: WDR5, RBBP5, ASH2L y DPY30, así como otras subunidades específicas. Como se mencionó anteriormente, E2 del VPH es capaz de interactuar con WDR5, y mediante esta unión podría modificar la capacidad del complejo SETD1/MLL de efectuar esta metilación y por lo tanto, disminuir la abundancia de esta marca de manera generalizada, provocando una disminución de la transcripción (Jang, M. K. 2015; Zhang, T. 2015).

Se ha descrito que la distribución de H3K4me3 se encuentra altamente acoplada a la presencia de islas CpG, esto mediante la región de dedo de Zinc (CxxC) que se encuentra presente en las subunidades MLL1/2 y CFP1 de SETD1A/B y mediante la cual se une específicamente a islas CpG no metiladas. Estos motivos de unión actúan reclutando complejos SETD1/MLL a los templados de cromatina promoviendo el reconocimiento del sitio blanco. Se ha relacionado esta habilidad para reconocer los promotores y además unir H3K4me3, con el mantenimiento de esta marca en genes activos, sugiriendo que una vez establecida, esta marca refuerza positivamente su propia deposición. La retroalimentación de la deposición podría ser otro paso en el que E2 podría afectar la abundancia de H3K4me3 (Harikumar, A. 2015; Zhang, T. 2015).

Con respecto a los diferentes juegos de oligonucleótidos empleados en la realización de este trabajo destaca el hecho de que los resultados al medir la zona que abarca más la región río abajo del inicio de la transcripción (oligos CR) reflejan cambios más contrastantes en ella, por lo que a pesar de que esta se distribuye a lo largo del promotor y de sitios de inicio de la transcripción, podríamos inferir a partir de los resultados que E2 afecta principalmente a unos sitios o que aunque se encuentren las marcas a lo largo del gen y de los sitios de inicio, esta distribución

no es homogénea, sino que se encuentra una mayor abundancia en la región más cercana a la región codificante (Zhang, T. 2015).

Esta habilidad de E2 de disminuir de manera generalizada la expresión de genes celulares podría estar ligado al hecho de que el virus necesita utilizar la maquinaria transcripcional de la célula para transcribir sus propios genes, y posteriormente sintetizar las proteínas virales para finalmente formar viriones completos, terminando así el ciclo replicativo. Al encontrarse la transcripción génica celular disminuída, la maquinaria transcripcional y de síntesis de proteínas tendría una mayor disponibilidad para utilizar como molde los genes virales y por la tanto tener una producción viral más efectiva.

10.5. E2 interactúa con la maquinaria epigenética de células progenitoras

Las células troncales de todo tipo se caracterizan por sus estados estables y heredables, permitiendo su salida hacia múltiples vías de desarrollo. Durante el desarrollo embrionario, la potencia de las células troncales se reduce con el tiempo de totipotentes (mórula) a pluripotentes (células troncales embrionarias) a multipotentes (células troncales fetales y de adulto) a omnipotentes (células precursoras) debido a un silenciamiento génico progresivo de genes y a la adquisición de compromiso de diferenciación a un linaje específico. Genes activos en progenitores tempranos son gradualmente silenciados en etapas posteriores durante el desarrollo, y a su vez, subgrupos de genes específicos de un tipo celular se encienden. El mantenimiento de la auto-renovación de las células troncales embrionarias depende de dos eventos igualmente importantes: la represión de genes de linaje específico mediado por los complejos PcG y la actividad transcripcional de genes de auto-renovación como OCT3/4, SOX2 y KLF, que es mediada por el grupo de modificadores de histonas Trithorax (Tollervey, J. R., 2012).

Como se mencionó anteriormente, la proteína E2 es capaz de interactuar con múltiples proteínas celulares encargadas de la maquinaria epigenética, las cuales podrían tener una relación con la diferenciación observada en las células progenitoras de la línea celular HaCaT-E2. Entre estas proteínas destacan las

siguientes, debido a su estrecha relación con las modificaciones epigenéticas en células troncales: las subunidades p400 y TRRAP del complejo histona acetil-transferasa TRRAP/TIP60, la metil-transferasa de histonas WDR5 y la proteína SMARCA4 (BRG1) del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF (Jang, M. K., 2015).

Las subunidades p400 y TRRAP forman diferentes subcomplejos que tienen funciones diferentes con respecto a las modificaciones de histonas y por lo tanto se discutirán por separado. Tip60-p400 es un complejo remodelador de la cromatina de 17 subunidades con dos actividades remodeladoras de la cromatina: la subunidad Tip60 (también conocido como Kat5) acetila la cola N-terminal de las histonas H2A, H4 y un número de factores de transcripción, mientras que la subunidad p400 media el intercambio de los dímeros H2A-H2B por dímeros H2AZ-H2B dentro de los nucleosomas. Tip60-p400 funciona mayormente como un co-activador transcripcional que funciona con numerosos factores de transcripción secuencia-específicos para activar la expresión génica. En contraste, mientras Tip60-p400 promueve la expresión de algunos genes requeridos para la proliferación celular y regulación del ciclo celular en células troncales embrionarias, su función más importante es silenciar genes que se encuentran activos durante la diferenciación. Además, se ha descrito que Tip60-p400 integra señales de Nanog y H3K4me3 para regular la expresión génica en ESCs. Es por esto que al ser p400 parte de un complejo, su interacción con E2 podría llevar a una formación incorrecta de este y por lo tanto perder la función de inactivar genes y llevar a diferenciación a las células. Aparentemente el mantenimiento de niveles adecuados de acetilación de histonas es esencial para perpetuar el estado pluripotente (Chen, P. B., 2013, Fazio, T. G. 2008).

Como se mencionó anteriormente, Tip60 es una HAT y TRRAP es un cofactor de esta, importante para el reclutamiento de complejos HAT a los factores de transcripción en la cromatina. Un estudio realizado por Murr y cols. en 2005 demuestra que TRRAP-Tip60 participa en la reparación de rupturas de doble cadena de ADN por recombinación homóloga, mediante la modificación o

remodelamiento de la cromatina. Proponen un modelo en el que la inducción de una ruptura de doble cadena en el ADN, resulta en el reclutamiento de la actividad HAT mediada por TRRAP acetilando la cromatina que rodea el sitio de ruptura en el ADN. Las histonas acetiladas facilitan el acceso y la unión de la maquinaria de reparación al ADN de la cromatina. Una vez que la reparación del ADN se completa, las histonas son deacetiladas por una HDAC y se restaura la cromatina. Basándose en este modelo, la interacción de E2 con TRRAP, impediría que esta última realice correctamente su función de reclutar la actividad HATs al sitio de la ruptura de doble cadena de ADN y por lo tanto dificultaría la reparación del genoma dando lugar a daños que pueden culminar en la progresión a cáncer (Murr, R. 2005).

Otra proteína de la maquinaria epigenética con la que interacciona E2 es la proteína WDR5, que es parte del complejo Trithorax (TrxG) el cual medía la deposición de marcas post-traduccionales (PTMs) de histonas que marcan la transcripción activa, como es H3K4me3. Se ha demostrado que WDR5 es indispensable para el ensamblaje de SET/MLL (metiltransferasas de histonas que catalizan la metilación de H3K4) y para la transición de H3K4me2 al estado trimetilado. Los niveles de expresión de WDR5 correlacionan positivamente con el estado indiferenciado de las células troncales embrionarias, sugiriendo una función específica de esta proteína en el mantenimiento de este estado. La disminución o pérdida de la función de WDR5 debido a su interacción con la proteína viral E2, ocasionaría la diferenciación de las células progenitoras. Además, se ha demostrado que esta proteína es crítica para el mantenimiento global y localizado de H3K4me3, así como para la activación transcripcional de blancos específicos en las células troncales embrionarias (Tollervey, J. R., 2012).

Por último, E2 interactúa con la proteína BRG1, también denominada SMARCA4, que es una subunidad con actividad ATPasa del complejo SWI/SNF. En células troncales embrionarias de humano, el complejo SWI/SNF que contiene BRG1 es requerido para la habilidad de células troncales embrionarias para mantener la auto-renovación y permanecer pluripotentes. La unión de BRG1 se sobrepone más con H3K4me1 que con H3K4me3, sugiriendo que ocupa “enhancers” o potenciadores y

elementos reguladores en vez de sitios de transcripción activa. El complejo SWI/SNF se une a potenciadores y promotores de genes que codifican reguladores de pluripotencia importantes, y coopera con los reguladores de pluripotencia maestros, como OCT3/4 y SOX2 para el control del circuito de troncalidad. También actúan como represores transcripcionales en un número de genes específicos de diferenciación en células troncales embrionarias. Además, se ha demostrado que la adición del complejo SWI/SNF a la mezcla de pluripotencia maestra, usada en la reprogramación de células somáticas a células troncales pluripotentes inducidas, incrementa la eficiencia de reprogramación dramáticamente, destacando su importancia en el mantenimiento de la pluripotencia de estas células. Por lo tanto, si la interacción de E2 con BRG1 impidiera la correcta formación del complejo SWI/SNF en las células troncales, esto llevaría a una pérdida de la habilidad de auto-renovación de estas, propiciando su diferenciación (Tollervey, J. R., 2012).

Independientemente del mecanismo epigenético por el cual lo lleve a cabo, los resultados encontrados en este trabajo indican claramente que la expresión de E2 genera un daño en la estructura celular, que aunado a múltiples factores, desencadena una salida de la “troncalidad” de las células progenitoras de la línea celular HaCaT. En el contexto del ciclo viral, pasos iniciales hacia la diferenciación de las células epiteliales permitirían la expresión de los genes virales, permitiendo

11. CONCLUSIONES

Se confirmó que el principal efecto de E2 del VPH16 sobre la expresión génica celular, es un decaimiento generalizado de este proceso en la población total celular. Una posible causa de esto podría ser la disminución de la abundancia de la marca de activación transcripcional H3K4me3 a causa de diferentes interacciones de la proteína E2 con componentes protéicos de la maquinaria epigenética encargada del posicionamiento y mantenimiento de esta.

Además E2, tiene la capacidad de cambiar los niveles de expresión de genes de forma diferencial dependiendo de la subpoblación celular, muy probablemente como consecuencia de las diferencias que presentan estas células en la estructura de su cromatina, así como la composición de los complejos multiprotéicos que la modifican.

En este trabajo se demostró que la proteína E2 es capaz de promover la salida de la troncalidad de las células HaCaT $\alpha 6$ -integrina^{bri}CD71^{dim}, las cuales se comprobó previamente en nuestro grupo de trabajo, tienen características de células progenitoras. Interesantemente, se encontró posible evidencia de daño tanto estructural (disminución del colágeno celular) como del genoma (rupturas de doble cadena), lo cual podría desencadenar una detención de la división horizontal (auto-renovación) y llevar a las células a diferenciación. Esta salida del estado troncal es notoria por los cambios en la expresión de distintos genes del ciclo celular que evidencian la diferenciación temprana de estas células, lo que en el contexto viral, serviría para comenzar con las etapas tardías del ciclo infeccioso del virus.

Por último, los cambios particulares que se observan en la subpoblación “BriDim” pueden estar relacionados con la capacidad de E2 de interactuar con las proteínas p400 y TRRAP, WDR5 y BRG1, todas relacionadas con procesos de cambios epigenéticos específicamente en células troncales, aunque es necesario realizar más estudios para comprobar esto.

12. PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina con anticuerpos anti-H3K27me3 para corroborar los resultados obtenidos, así como realizar esta inmunoprecipitación en células $\alpha 6$ -integrina^{bri}CD71^{dim} y comprobar si los genes analizados tienen un estado de bivalencia en las células progenitoras de esta línea celular, además de observar los cambios en estas marcas epigenéticas por la presencia de E2-VPH16.
- Analizar si existen cambios en la metilación de las islas CpG de los genes analizados, tanto en la población total como en las diferentes subpoblaciones, para comprobar si el apagamiento de los genes estudiados, también es consecuencia de su metilación en alguna de estas subpoblaciones.
- Corroborar si los cambios en la expresión de estos genes son debidos a la interacción de E2 con componentes de la maquinaria epigenética, como metilasas y desmetilasas de histonas, y complejos remodeladores de la cromatina, utilizando inhibidores específicos de estas, tanto en población total como en las células progenitoras. Específicamente en la subpoblación “BriDim”, analizar si la función de las proteínas p400, TRRAP, WDR5 y BRG1 se ve afectada por la presencia de E2.
- Evaluar la expresión génica y cambios en las marcas de cromatina a tiempos de expresión más cortos de E2, con células recién transducidas, para evaluar si el efecto de E2 es distinto en el comienzo de la infección.

13. REFERENCIAS

1. Albright, S. R., Tijan, R. TAFs revisited: more data reveal new twist and confirm old ideas. *Gene*. 2000;242:1-13.
2. Amoureux, M. C., Cunningham, B. A., Edelman, G. M., Crossin, K. L. N-CAM Binding Inhibits the Proliferation of Hippocampal Progenitor Cells and Promotes Their Differentiation to a Neural Phenotype. *The Journal of Neuroscience*. 2000;20(10):3631-40.
3. Baicu, C. F., Zhang, Y., Can Laer, A. O., Renaud, L., Zile, M. R., Bradshaw, A. D. Effects of the absence of procollagen C-endopeptidase enhancer-2 on mitochondrial collagen accumulation in chronic pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303:H234-40.
4. Bhattacharya, S., Lou, X., Hwang, P., Rajashankar, K. R., Wang, X., Gustafsson, A. A., et. al. Structural and functional insight into TAF1-TAF7, a subcomplex of transcription factor II D. *PNAS*. 2014;111(25):9103-08.
5. Boukamp, P.; Petrussevska, R. T.; Breitkretutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fuseing, N. E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploidy human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*. 1988;106(3):761-71.
6. Burns, J. E., Walker, H. F., Schmitz, C., Maitland, N. J. Phenotypic effects of HPV-16 E2 protein expression in human keratinocytes. *Virology*. 2010;401:314-21.
7. Centeno, F., Ramírez-Salazar, E., García-Villa, E., Gariglio, P., Garrido, E. TAF1 interacts with and modulates human papillomavirus 16 E2-dependent transcriptional regulation. *Intervirology*. 2008;51:137-43.
8. Chen, P. B., Hung, J. H., Hickman, T. L., Coles, A. H., Carey, J. F., Weng, Z. et. al. Hdac6 regulates Tip60-p4" function in stem cells. *eLife*. 2013;3:1-25.
9. Court, F., Arnaud, P. An annotated list of bivalent chromatin regions in human ES cells: a new tool for cancer epigenetic research. *Oncotarget*. 2017;8(3):4110-24.

10. Deleyrolle, L., Sabourin, J. C., Rothhut, B., Fujita, H., Guichet, P. O., Teigell, M., et. al. OCAM Regulates Embryonic Spinal Cord Stem Cell Proliferation by Modulating ErbB2 Receptor. PLoS ONE. 2015;10(4):1-18.
11. Dominguez-Catzín, V., Reveles-Espinoza, A. M., Sánchez-Ramos, fJ., Cruz-Cadena, R., Lemus-Hernández, D., Garrido, E. HPV16-E2 protein modifies self-renewal and differentiation rate in progenitor cells of human immortalized keratinocytes. Virology Journal. 2017;14(65):1-13.
12. Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. M. et. al. The biology and lyfe-cycle of human papillomaviruses. Vaccine 30S. 2012;F55-F70.
13. Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., Murakami, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. Rev. Med. Virol. 2015;25:2-23.
14. Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H. Doorbar, J. Human papillomaviruses; epithelial tropisms, and the development of neoplasia. Viruses. 2015;7:3863-90.
15. Fang, M., Feng, C., Zhao, Y., Liu, X. Camk2b protects neurons from homocysteine-induced apoptosis with the involvement of HIF-1 α signal pathway. Int J Clin Exp Med. 2014;7(7):1659-68.
16. Fazio, T. G., Huff, J. T., Panning, B. An RNAi Screen of Chromatin Proteins Identifies Tip60-p400 as a Regulator of Embryonic Stem Cell Identity. Cell. 2008;134:162-74.
17. Feng, Y., Cohen, S. N. Upregulation of the Host SLC11A1 Gene by *Clostridium difficile* Toxin B Facilitates Glucosylation of Rho GTPases and Enhances Toxin Lethality. Infection an Immunity. 2013;81(8):2724-32.
18. Galloway, D. A., Laimins, L. A. Human papillomaviruses: shared and distinct pathways for pathogenesis. Current Opinion in Virology. 2011;14:87-92.
19. Hara, T. Miyazaki, M., Hakuno, F., Takahashi, S., Chida, K. PKC η promotes a proliferation to differentiation switch in keratinocytes via upregulation of p27^{Kip1} mRNA through suppression of JNK/c-Jun signaling under stress conditions. Cell Death and Desease. 2011;1(e157):1-10.
20. Harikumar, A., Meshorer, E. Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells. EMBO reports. 2015;15:1609-19.

21. Huang, B., Li, H., Huang, L., Luo, C., Zhang, Y. Clinical significance of microRNA 138 and cyclin D3 in hepatocellular carcinoma. *Journal of Surgical Research*. 2015;193:718-23.
22. Imamura, Y., Tomita, S., Imanishi, M., Kihira, Y., Ikeda, Y., Ishizawa, H. *et al.* HIF-2 α /ARNT complex regulates hair development *via* induction of p21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip1}. *The FASEB Journal*. 2014;28:2517-24.
23. Jang, M. K., Anderson, D. E., Van Doorslaer, K., McBride, A. A. A proteomic approach to discover and compare interacting partners of papillomavirus E2 proteins from diverse phylogenetic groups. *Proteomics*. 2015;15:2038-50.
24. Kaur, P., Li, A. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *The journal of investigative dermatology*. 2000;414-420.
25. Kaur, P., Li, A., Redvers, R., Bertinello, I. Keratinocyte stem cell assays: an evolving science. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2004;9:238-47.
26. Khosravi, S., Martinika, M., Zhou, Y., Ong, C. J. Prognostic significance of the expression of nuclear eukaryotic translation initiation factor 5A2 in human melanoma. *Oncology Letters*. 2016;12:3089-100.
27. Kolly, C. Suter, M. M., Müller, E. J. Proliferation, Cell Cycle Exit, and Onset of Terminal Differentiation in Cultured Keratinocytes: Pre-Programmed Pathways in Control of C-Myc and Notch1 Prevail Over Extracellular Calcium Signals. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2005;124(5);1014-24.
28. Kool, M. J., Van de Bree, J. E., Bodde, H. E., Elgersma, Y., Van Woerden, G. M. The molecular, temporal and region-specific requirements of the beta isoform of Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase type 2 (CAMK2B) in mouse locomotion. *Scientific Reports*. 2016;6:1-12.
29. Lanza, R. (Ed.). (2004). *Handbook of stem cells*. EEUU: Elsevier.
30. Leshchyn'ska, I., Liew, H. T., Shepherd, C., Halliday, G. M., Stevens, C. H., Ke, Y. D. *et al.* A β -dependent reduction of NCAM2-mediated synaptic adhesion contributes to synapse loss in Alzheimer's disease. *Nature communications*. 2015;6:1-18.

31. Li, A., Simmons, P. J., Kaur, P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95:3902-07.
32. Liu, Y., Du, F., Chen, W., Yao, M., Lv, K., Fu, P. EIF5A2 is a novel chemoresistance gene in breast cancer. *Breast Cancer.* 2015;22:602-07.
33. Liu, Z. Y., Cao, J., Zhang, J. T., Xu, G. L., Li, X. P., Wang, F. T. *et al.* Ring finger protein 125, as a potential highly aggressive and unfavorable prognostic biomarker, promotes the invasion and metastasis of human gallbladder cancers *via* activating the TGF- β 1-SMAD3-ID1 signaling pathway. *Oncotarget.* 2017;8(3):49897-914.
34. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods.* 2001;402-08.
35. McBride, A. A. The Papillomavirus E2 proteins. *Virology.* 2013;445:57-79.
36. Membrino, A., Cogoi, S., Pedersen, E. B., Xodo, L. E. G4-DNA Formation in the *HRAS* Promoter and Rational Design of Decoy Oligonucleotids for Cancer Therapy. *PLoS ONE.* 2011;6(9):e24421.
37. Muller, M.; Demeret, C. The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions: A Complex Hijacking of the Cellular Network. *The Open Virology Journal.* 2012;6: 173-89.
38. Müller-Tidow, C., Ji, P., Diederichs, S., Potratz, J., Bäumer, N., Köhler, G. *et al.* The Cyclin A1-CDK2 Complex Regulates DNA Double Strand Break Repair. *Mol. Cell. Biol.* 2004;24(20):8917-28.
39. Nguyen, H. P., Ramírez-Fort, M. K., Rady, P. L. The biology of human papillomaviruses. *Molecular Biology and Pathogenesis.* 2014;45:19-32.
40. O'Brien, T., Tjian, R. Different functional domains of TAF_{II}250 modulate expression of distinct subsets of mammalian genes. *PNAS.* 2000;97(6):2456-61.
41. Oldak, M., Maksym, R. B., Sperling, T., Yaniv, M., Smola, H., Pfister, H. J. *et al.* Human Papillomavirus Type 8 E2 Protein Unravels JunB/Fra-1 as an Activator of the β 4-Integrin Gene in Human Keratinocytes. *J. Virol.* 2010;84(3):1376-86.

42. Petrucelli, M. F., Peronni, K., Sanches, P. R., Komoto, T. T., Matsuda, J. B., Araújo da Silva Jr. W. *et. al.* Dual RNA-Seq Analysis of *Trichophyton rubrum* and HaCat Keratinocyte Co-Culture Highlights Important Genes for Fungal-Host Interaction. *Genes*. 2018;9(362):1-18.
43. Ramirez-Salazar, E., Centeno, F., Nieto, K., Valencia-Hernández, A., Salcedo, M., Garrido, E. HPV16 E2 could act as a down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. *Virology Journal*. 2011;8(247):1-10.
44. Ren, D., Liu, F., Dong, G., You, M., Ji, J., Huanh, Y. *et. al.* Activation of TLR7 increases CCND3 expression via the downregulation of miR-15b in B cells of systemic lupus erythematosus. *Cellular & Molecular Immunology*. 2016;13:764-75.
45. Repo, H. Gurvits, N., Löyttyniemi, E., Nykänene, M., Lintunen, M., Karra, H. *et. al.* PTTG1-interacting protein (PTTG1IP/PBF) predicts breast cancer survival. *BMC Cancer*. 2017;17(705):1-8.
46. Rieckmann, T., Tribius, S., Grob, T. J., Meyer, F., Busch, C., Petersen, C. *et. al.* HNSCC cell lines positive to HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiotherapy and Oncology*. 2013;107;242-46.
47. Rogers, A., Waltke, M. Angeletti, P. C. Evolutionary variation of papillomavirus E2 protein and E2 binding sites. *Virology Journal*. 2011;8(379):1-12.
48. Shields, J. M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A., Der, C.J. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends in CELL BIOLOGY*. 2000;10:147-54.
49. Song, W., Xie, R., Zhu, A., Xu, Y., Shi, Y., Shen, Y., *et.al.* p27^{Kipl} and Ser10-phosphorylated p27^{Kipl} in breast cancer: clinical significance and expression. *OncoTargets and Therapy*. 2015;8:1863-69.
50. Steiglitz, B. M., Keene, D. R., Greenspan, D. S. *PCOLCE2* Encodes a Functional Procollagen C-Proteinase Enhancer (PCPE2) That Is a Collagen-binding Protein Differing in Distribution of Expression and Post-translational Modification from the Previously Described PCPE1. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;227(52):49820-30.

51. Takahashi, S., Kato, S., Nakamura, K., Nakano, R., Kubota, K., Hamada, H. Neural cell adhesion molecule 2 as a target molecule for prostate and breast cancer gene therapy. *Cancer Sci.* 2010;102(4);808-14.
52. Vaughan, M. B., Ramirez, R. D., Andrews, C. M., Wright, W. E., Shay, J. W. H-Ras Expression in immortalized Keratinocytes Produces an Invasive Epithelium in Cultured Skin Equivalents. *PLoS ONE.* 2009;4(11);1-9.
53. Wassarman, D. A., Sauer, F. TAFII250: a transcription toolbox. *Journal of Cell Science.* 2001;114:2895-902.
54. Wu, C., Chen, X., Shu, J., Lee, C. T. Whole-genome expression analyses of type 2 diabetes in human skin reveal altered immune function and burden of infection. 2017;8(21):34601-09.
55. Xiang-Peng, W., Xing-Li, D., Li-Yan, L. MicroRNA-584 functions as a tumor supresor and targets PTTG1IP in glioma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(12):8573-82.
56. Yanatatsaneejit, P., Mutirangura, A., Kitkumthorn, N. Human Papillomavirus's Physical State and Cylcin A1 Promoter Methylation in Cervical Cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2011;21:902-06.
57. Yang, L., Zhou, B., Li, X., Lu, Z., Li, W., Huo, X. *et- al.* RNF125 is a Ubiquitin-Protein Ligase that promotes p53 Degradation. *Cell Physiol Biochem.* 2015;35:237-45.
58. Zhang, T., Cooper, S., Brockdorff, N. The interplay of histone modifications-writers that read. *EMBO reports.* 2015;16:1467-81.
59. Zuo, Q., Zheng, W., Zhang, J., Pan, Z., Liu, Y., Long, H. *et. al.* Methylation in the promoters of HS3ST2 and CCNA1 genes is associated with cervical cancer in Uygur women in Xinjiang. *Int J Biol Markers.* 2014;29(4):e354-62.