



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Impacto de E2 de VPH-16 sobre la regulación transcripcional  
del locus CDKN2A/B”**

**T E S I S**

Que presenta:

**Q.F.B. Diana Laura Sánchez Trujillo**

para obtener el Grado de

**Maestra en Ciencias**

en la Especialidad de

**Genética y Biología Molecular**

Director de la Tesis  
**Dr. José Efraín Garrido Guerrero**



## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

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), Unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. José Efraín Garrido Guerrero y con el financiamiento del Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología (CONACYT), mediante los fondos del proyecto CB-256514.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) ya que durante mis estudios de maestría conté con una beca que me permitió llevar a cabo mis estudios con número de CVU **973113**, apoyo que agradezco profundamente.

Agradezco a mis asesores el Dr. Bulmaro Cisneros Vega, perteneciente al Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN y al Dr. José Glustéin Pozo Molina, perteneciente a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, por sus comentarios y revisiones que enriquecieron este trabajo, sin su apoyo no hubiera sido posible.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A todos los integrantes del Laboratorio 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular, en especial al **Dr. Efraín Garrido** por su apoyo incondicional a pesar de las circunstancias adversas y por enseñarme que todo debe ser analizado y pensado más de dos veces. Al Biólogo **Pedro Chávez** por su apoyo en la interpretación de los resultados de qPCR y por sus platicas amenas sobre los lugares que valen la pena conocer al sur de la CD.MX. A mis compañeras de doce horas al día: **Maricarmen** por siempre estar tranquila y transmitirme calma en los momentos de frustración, **Paty** por ser mi amiga desde el primer día en la maestría; gracias por esas charlas de ciencia y no ciencia y en especial a **Lili**, por siempre estar apoyándome en los experimentos y retribuyendo en todo el análisis de este trabajo.

Sin ustedes este trabajo no sería posible.

Gracias por ser y estar.

A mi familia, en especial a mi tía **María** por su apoyo incondicional. A mis amigos nuevos y viejos. A **Juan** por brindarme su amistad en CD.MX.; gracias por las platicas con café y la comida vegana. A **Majo** por su amistad; la comida coreana y ayudarme a conocer la ciudad. A **David** por traer a Mikel al departamento y a mi amiga y colega de siempre **Ivy** que a la distancia siempre me estuvo apoyando.

*A Joaquín Velázquez Álvarez† ...*

*Cada una de mis letras siempre será para ti*

## Contenido

<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>I. Introducción</b> .....	<b>10</b>
<b>I.I. Virus del Papiloma Humano (VPH)</b> .....	<b>10</b>
- Características generales.....	10
- Genoma y proteínas virales.....	11
- Ciclo viral.....	13
<b>I. II. La proteína E2 del VPH-16 como un interesante regulador transcripcional</b> .....	<b>16</b>
<b>I. III. El impacto de la presencia de la proteína E2 de VPH sobre elementos celulares</b> .....	<b>18</b>
<b>I. IV. El locus CDKN2A/B</b> .....	<b>21</b>
<b>I. VI. ANRIL: Los RNAinc y su impacto en la regulación epigenética</b> .....	<b>23</b>
<b>I. V. Relevancia de la función del locus CDKN2A/B</b> .....	<b>25</b>
<b>II. Antecedentes</b> .....	<b>27</b>
<b>III. Justificación</b> .....	<b>33</b>
<b>IV. Hipótesis</b> .....	<b>35</b>
<b>V. Objetivos</b> .....	<b>36</b>
<b>V. I. Objetivo general</b> .....	<b>36</b>
<b>V. II. Objetivos específicos</b> .....	<b>36</b>
<b>VI. Metodología experimental</b> .....	<b>37</b>
<b>Cultivo celular</b> .....	<b>37</b>
<b>Extracción de RNA</b> .....	<b>38</b>
<b>Síntesis de cDNA (Reverso-Transcripción (RT))</b> .....	<b>39</b>
<b>PCR en punto final</b> .....	<b>39</b>
<b>Identificación de la expresión de E2-VPH16</b> .....	<b>40</b>
<b>Análisis de expresión génica por PCR cuantitativa (PCR en tiempo real o qPCR)</b> .....	<b>40</b>
<b>Preparación de lisados celulares y western blot</b> .....	<b>41</b>

<b>VII. Resultados .....</b>	<b>43</b>
<b>VII.I. Selección del modelo de estudio y confirmación de la expresión de E2-VPH16.....</b>	<b>43</b>
<b>VII.II. Efecto de la expresión de E2-VPH16 sobre el <i>locus</i> CDKN2A/B en células C-33A. ....</b>	<b>45</b>
VII.II. I. El gen CDKN2B no es afectado por la presencia de E2-VPH16 .....	46
VII.II. II. El gen CDKN2A es regulado positivamente por la presencia de E2-VPH16 en células C-33A.....	48
VII.II. III. El RNAinc ANRIL es regulado al alta por la presencia de E2-VPH16 en células C-33A. ....	52
<b>VII. III. Correlación positiva entre la expresión del RNAinc ANRIL y p16-INK4A.....</b>	<b>54</b>
<b>VII. IV. Sitios CpG que engloban al promotor p16<sup>INK4A</sup> .....</b>	<b>55</b>
<b>VIII. Discusión.....</b>	<b>58</b>
<b>VIII.I. E2-VPH16 favorece un estado de sobre regulación del <i>locus</i> CDKN2A/B ..</b>	<b>58</b>
<b>ANRIL y p16; una expresión coordinada favorecida por la presencia de E2-VPH16 .....</b>	<b>59</b>
<b>E2-VPH16 no afecta la transcripción de p15 INK4B .....</b>	<b>61</b>
<b>Mecanismos de regulación del <i>locus</i> CDKN2A/B que pueden ser afectados por la presencia de E2-VPH 16.....</b>	<b>62</b>
<b>IX. Conclusiones .....</b>	<b>64</b>
<b>X. Perspectivas .....</b>	<b>65</b>
<b>XI. Bibliografía .....</b>	<b>66</b>

## RESUMEN

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un factor de riesgo importante para el desarrollo de diversos tipos de cáncer, en especial el cérvico-uterino (Mallory E. Harden, 2017). El ciclo de vida del virus se relaciona estrechamente con la diferenciación de los queratinocitos de la capa basal del epitelio, ya que éstas son las células blanco del virus (Zhi-Ming Zheng, 2006). El genoma del virus suele integrarse al genoma celular cuando avanza la infección, pero este evento sucede únicamente en procesos cancerígenos y después de presentar una infección recurrente por largos periodos de tiempo; al suceder la integración, se rompe el marco de lectura del gen E2. La proteína E2 es el regulador transcripcional por excelencia de la maquinaria viral, se expresa en las etapas iniciales de la infección promoviendo la replicación y segregación del genoma viral. Para realizar estas funciones, E2 puede interaccionar, reclutar y afectar a muchos elementos celulares, como supresores tumorales (ST) o factores de transcripción, remodeladores de la cromatina y proteínas que medían el ciclo celular y la apoptosis (Mallory E. Harden, 2017; Muller M., 2012). Este trabajo busca esclarecer si E2 de VPH16 (E2-16) afecta la transcripción del *locus* CDKN2A/B, que codifica tres ST (p14<sup>ARF</sup>, p15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup>) y un RNAinc llamado ANRIL, involucrados en la regulación del ciclo y la senescencia celular (Bahrami et al., 2018; Rivandi et al., 2018; Sherr, 2012), ya que es una región altamente susceptible a sufrir inactivación funcional mediante mecanismos diversos. Determinar el efecto que E2-16 tiene sobre este *locus* ayudara a comprender como afecta el arresto y progresión del ciclo celular en etapas iniciales de la infección, así como la regulación de la expresión génica de elementos de la célula huésped. En este trabajo determinamos que la presencia de E2-16 en células C-33A, modifica la expresión de este *locus* génico a nivel transcripcional y a nivel proteico; además se estableció, la existencia de una correlación positiva y significativa entre la expresión de p16<sup>INK4A</sup> y ANRIL, sugiriendo así, que la regulación que afecta E2-16, es un mecanismo que involucraría este *locus* génico en su totalidad. Trabajos anteriores señalan a la metilación del promotor de p16<sup>INK4A</sup> como la responsable de co-regular la expresión de ANRIL y p14<sup>ARF</sup> (Gan et al., 2018), así, mediante un análisis *in silico*, se establece a una isla CpG de 362pb que engloba el TSS p16<sup>INK4A</sup>, como la posible responsable de ser afectada por la presencia de E2-VPH16. La confirmación experimental de este hallazgo queda pendiente de realizar.

Todo parece indicar que las funciones en *cis* y *trans* que ejerce ANRIL sobre el *locus* no se ven afectadas por la presencia de E2-VPH16, ya que estas están ligadas al reclutamiento de PcG y la represión de p15<sup>INK4B</sup>, la cual permanece estable en presencia de E2-VPH16 (Kotake et al., 2011); indicio que señala a la metilación del DNA o a una regulación indirecta mediante factores de transcripción (Tcf1/3, E2F1, CTCF y ZNF304), como los mecanismos alterados por la presencia de E2-VPH16 y que afectan la regulación del *locus* CDKN2A/B.



## ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV) is a common infection and important risk factor for the development of several types of cancer, especially cervical cancer (Mallory E. Harden, 2017). The life cycle of the virus is closely related to the differentiation of keratinocytes from the basal layer of the epithelium, since these are the target cells of the virus (Zhi-Ming Zheng, 2006). The virus genome usually integrates into the cellular genome when the infection progresses, but this event occurs only in carcinogenic processes and after presenting a recurrent infection for long periods of time; when integration occurs, the E2 open reading frame is disrupted. The E2 protein is the transcriptional regulator of the viral machinery, it is expressed in the early stages of infection promoting replication and segregation of the viral genome. To perform these functions, E2 can interact, recruit and affect many cellular elements, such as tumor suppressors (TS) or transcription factors, chromatin remodelers and proteins that mediate cell cycle and apoptosis (Mallory E. Harden, 2017; Muller M., 2012). The aim of this study is to elucidate if HPV16 E2 (E2-16) affects the transcription of the *CDKN2A/B locus*, which encodes for three ST (p14<sup>ARF</sup>, p15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup>) and a lncRNA called ANRIL, involved in cell cycle regulation and cell senescence (Bahrami et al., 2018; Rivandi et al., 2018; Sherr, 2012), due to the fact that this region is highly susceptible to suffer functional inactivation by several mechanisms. Defining the effect that E2-16 has on this *locus* will help to understand how this viral protein affects cell cycle arrest and progression in early stages of the infection, as well as the regulation of gene expression of host cell elements. In this research, we identified that the presence of E2-16 in C-33A cells modifies the expression of this *locus* at transcriptional level and at the protein level; we also established the existence of a positive and significant correlation between the expression of p16<sup>INK4A</sup> and ANRIL, suggesting that the regulation affected by E2-16 is a mechanism that involves the gene *locus* in general. Previous work indicates a methylation of the p16<sup>INK4A</sup> promoter as the responsible for co-regulating the expression of ANRIL and p14<sup>ARF</sup> (Gan et al., 2018), so in silico analysis we have established a 362bp CpG island that contains the p16<sup>INK4A</sup> TSS, this island may be responsible for being affected by the presence of E2-VPH16. Experimental confirmation of this finding remains to be performed. Everything seems to indicate that cis-trans functions exerted by ANRIL on the *locus* are not affected by the presence of E2-16, because they are linked to the recruitment of PcG and the repression of p15<sup>INK4B</sup>, which remains stable in the presence of E2-16 (Kotake et al., 2011); this suggests that DNA methylation or indirect regulation by transcription factors (Tcf1/3, E2F1, CTCF and ZNF304), are the mechanisms altered by the presence of E2-16, affecting the regulation of the *CDKN2A/B locus*.

## I. Introducción

### I.I. Virus del Papiloma Humano (VPH).

- Características generales.

En la actualidad el VPH se asocia como un factor de riesgo muy importante para el desarrollo de diversos tipos de cáncer, como carcinoma de cérvix, ano, vulva, vagina, pene y cáncer orofaríngeo (Mallory E. Harden, 2017).

El VPH es un virus de genoma circular de doble cadena de DNA sin envoltura, de aproximadamente 8 Kb que pertenece a la familia *Papillomaviridae*, el cual infecta células epiteliales cutáneas y mucosas, causando lesiones de bajo y alto riesgo, muchas persistiendo de manera asintomática en el hospedero. Actualmente se han secuenciado más de 200 tipos de papilomavirus que se agrupan en cinco géneros: *Alfapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* y *Nupapillomavirus*, los tres primeros géneros incluyen las especies de papilomavirus que causan infecciones de importancia médica (Bernard, 2010).

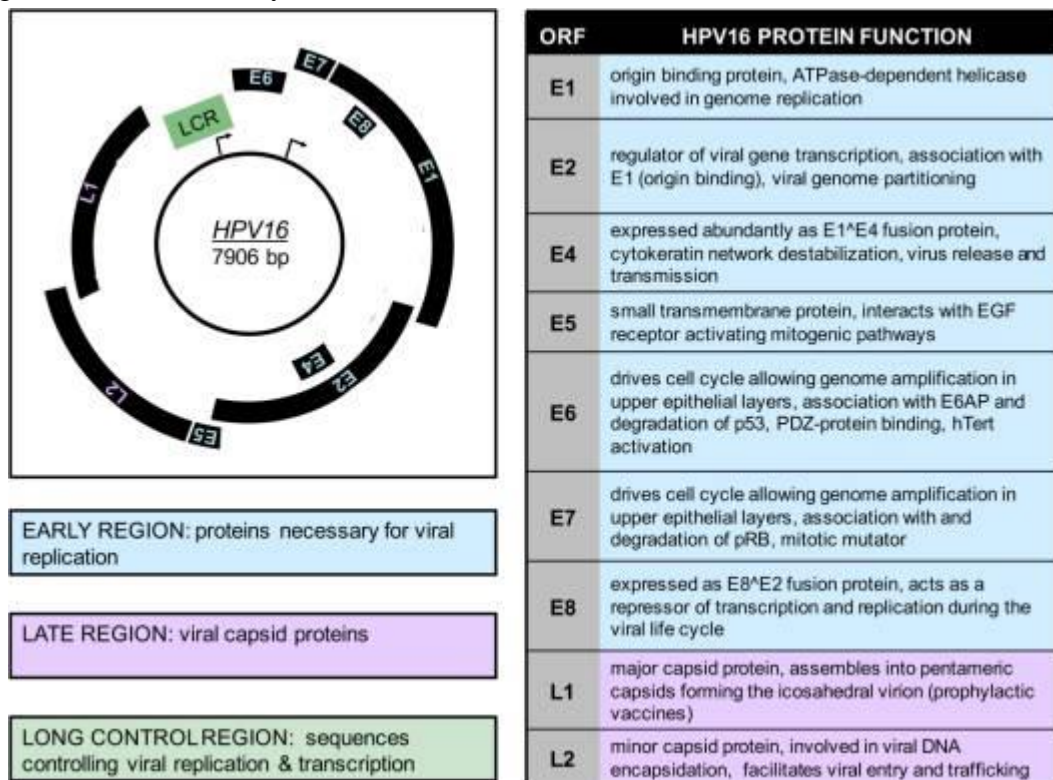
El género *alfa* de los papilomavirus es el más estudiado, por la capacidad que tienen de causar lesiones mucosas y cutáneas que pueden o no ser oncogénicas, las especies dentro de este género se clasifican a su vez en: VPH de alto riesgo y de bajo riesgo, por su capacidad oncogénica antes mencionada; dentro de los de bajo riesgo se encuentran el VPH-11 y VPH-6 asociados con condilomas acuminados, mientras que en el grupo de alto riesgo se encuentran el VPH-16 y VPH-18, sumamente estudiados por su gran capacidad oncogénica y asociación con padecer cáncer cervicouterino (Eileen M. Burd, 2015; Mallory E. Harden, 2017).

Aunque en la última década ha comenzado a comercializarse la vacuna contra el VPH, esta no inmuniza contra todos los tipos de VPH, sino únicamente contra los de alto riesgo, es por ello por lo que se siguen requiriendo estudios sobre la biología molecular del VPH que permitan desarrollar mejores técnicas de detección, mejores vacunas para la prevención de la infección por VPH y mejores opciones terapéuticas para el tratamiento de la infección por VPH.

-Genoma y proteínas virales.

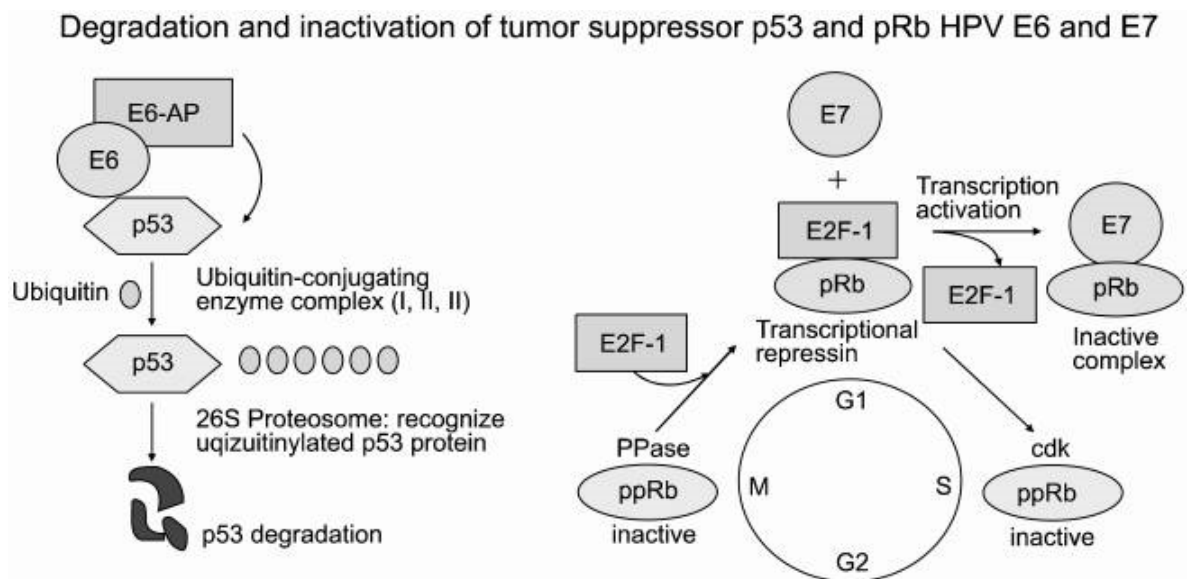
El genoma del VPH se caracteriza como ya se mencionó por ser un virus de doble cadena de DNA, sin envoltura y con una longitud de aproximadamente 8kb; cada partícula viral consiste en una cápside icosaédrica de aproximadamente 60 nm de diámetro (Mallory E. Harden, 2017).

Los virus del papiloma humano tienen tres regiones genómicas principales: región temprana (E), tardía (L) y larga (LCR o región no codificante NCR); y a su vez contiene 10 marcos de lectura abiertos (ORF). La región temprana contiene siete ORFs que codifican para las proteínas de regulación viral E1, E2, E4, E5, E6, E7 y E8, la región tardía contiene dos ORFs L1 y L2 que codifican para las proteínas de la formación de la cápside viral, y la región larga no codificante contiene el origen de la replicación del DNA, así como las secuencias de control de la transcripción de los oncogenes virales (Mallory E. Harden, 2017).



*Figura 1. Esquema del genoma viral del VPH-16 y resumen de las funciones de sus productos. Tomada de Mallory E. Harden, 2017.*

El VPH-16 es el prototipo de los VPH's de alto riesgo, por lo que las funciones de sus productos protéicos han sido ampliamente estudiadas. La proteína E1 actúa como una helicasa para la replicación del DNA viral, y es reclutada al origen de replicación por E2, que a su vez es un regulador transcripcional de las oncoproteínas E6 y E7, las cuales tienen la capacidad de interactuar con elementos celulares como los supresores de tumores celulares p53 y Rb respectivamente. E6 promueve la proliferación celular al estimular la degradación de p53, mediante la formación de un complejo trimérico que comprende E6, p53 y la enzima celular de ubiquitinación E6-AP. Por su lado la oncoproteína viral E7 interrumpe la interacción entre Rb y el factor transcripcional E2F; la liberación de factores E2F en sus formas transcripcionalmente activas estimula la replicación y la división celular (Yim E. K., 2005).



**Figura 2.** Mecanismo de acción de las oncoproteínas E6 y E7 tomada de: (Yim E. K., 2005)

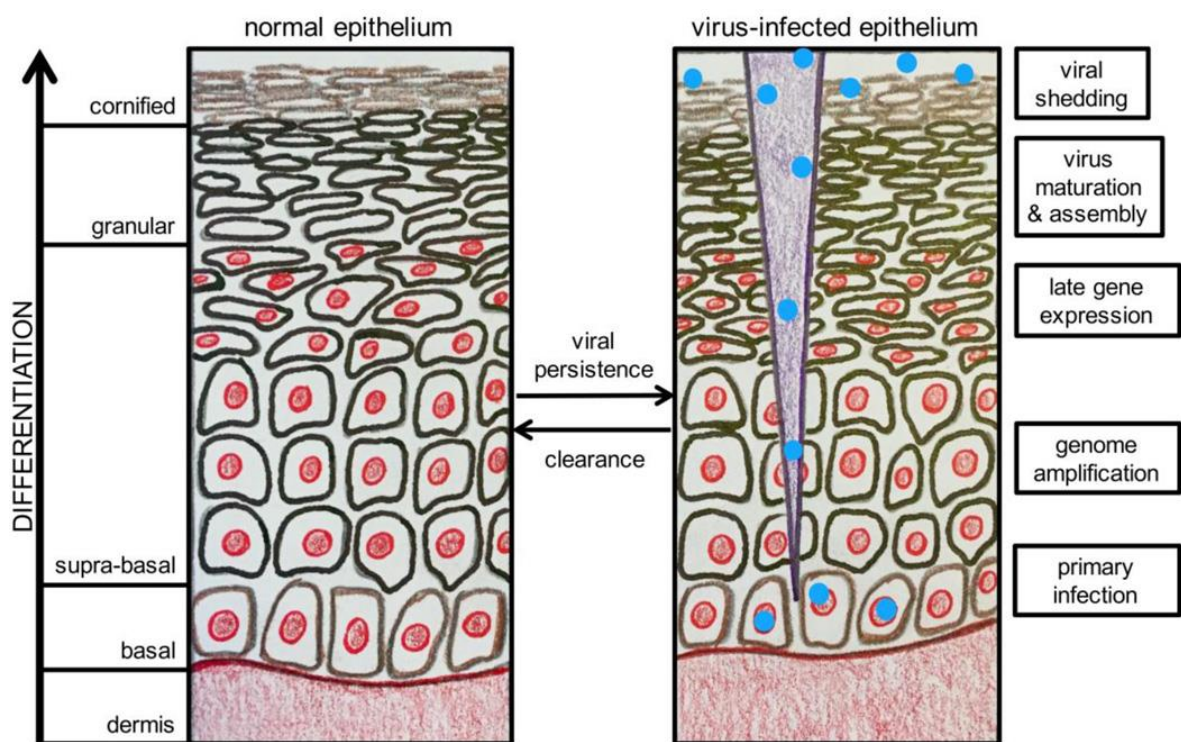
Por otro lado, las proteínas virales E4 y E5 favorecen la replicación viral de diversas maneras, E5 mejora la actividad de las señales de EGF y MAP quinasa para facilitar la amplificación del genoma y E4 se sintetiza como una proteína de fusión E1 ^ E4 como resultado de un *splicing* alternativo que favorece la liberación viral, entre otras funciones aun no muy definidas (Yajid AI, 2017).

Las proteínas virales que se expresan durante la etapa tardía L1 y L2, contribuyen a la conformación de la cápside y al empaquetamiento viral y su producción se activa

cuando existen niveles altos de E2. E2 funciona como un regulador transcripcional de la maquinaria vírica y su función diversa se discutirá más adelante (Yajid AI, 2017).

-Ciclo viral.

Los virus del papiloma humano se replican y ensamblan exclusivamente en el núcleo celular, e interesantemente infectan primero a las células epiteliales basales indiferenciadas; después la progenie viral se produce en las células hijas diferenciadas de las capas epiteliales superiores del epitelio. Su ciclo de vida se relaciona estrechamente con la diferenciación de los queratinocitos (Zhi-Ming Zheng, 2006).



**Figura 3.** Establecimiento de la Infección por VPH en el epitelio basal. Tomada de:(Eileen M. Burd, 2015)

Al darse una infección primaria el virus se mantiene en forma episomal dentro de la célula, y se mantendrá de dicha manera hasta que la célula comience un proceso de división celular, a esto se le conoce como infección inactiva o latente, en la cual el virus no comienza ningún proceso de replicación de DNA viral, solo se mantiene dentro de la célula de forma inactiva y su diagnóstico solo se podría realizar por métodos moleculares, es por ello que se ha establecido, que la expresión y replicación de los genes virales se realiza de forma estrictamente controlada y regulada por la

diferenciación de queratinocitos y aunque, el mecanismo sobre cómo la diferenciación de queratinocitos regula la expresión génica del VPH no se comprende completamente, se han establecido varias propuestas (Mallory E. Harden, 2017).

Cuando el VPH comienza un proceso de replicación de DNA viral constante se conoce como infección productiva o activa, la cual está caracterizada en primera instancia por la expresión de la proteína viral E1, que interacciona con el origen de replicación viral (ORI) y promueve la expresión de la proteína E2, que en conjunto con ésta promoverá el reclutamiento de elementos celulares para el establecimiento de la infección, es decir activar o reprimir la expresión de todos los genes tempranos (E4, E5, E6, E7) y promover la amplificación del DNA viral.

Al entrar la célula de la capa basal al proceso de diferenciación, se da una etapa de replicación de DNA viral a nivel exponencial y la proteína E2 es la encargada de mediar la segregación del DNA viral durante la división celular. Antes de que las células salgan de su proceso de diferenciación, se comienzan a expresar los genes de la etapa tardía L1 y L2 que serán los responsables del empaquetamiento del genoma viral y de conformar la cápside de este. Una vez que las células se han diferenciado a epitelio plano estratificado se da el empaquetamiento viral y el establecimiento de la infección para posteriormente liberar más partículas virales que infectarán más células; difícilmente una infección activa conduce a malignidad ya que las células infectadas se desechan (Eileen M. Burd, 2015; Mallory E. Harden, 2017).

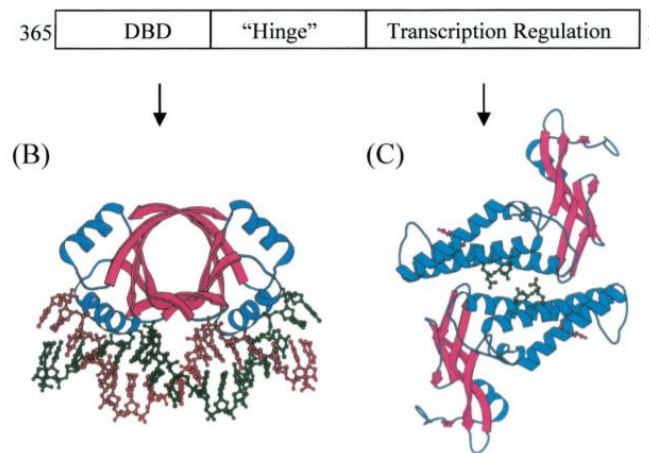
Actualmente, se cree que la infección productiva es favorecida en el ambiente celular del exocérvix, pero es ineficientemente sostenida por las células en el endocérvix, donde se favorece la infección no productiva; los VPH's de alto riesgo se caracterizan por favorecer las infecciones no productivas y tener una inestabilidad genómica que favorece la desregulación viral habitual (Egawa N, 2015).

Es durante la infección activa cuando los oncogenes E6 y E7 pueden favorecer la transformación celular. Cuando esta sucede y se establece una progresión neoplásica, los genomas de VPH de alto riesgo a menudo suelen integrarse en el genoma del huésped. La integración surge en sitios propensos a sufrir recombinación genética (Johannsen E., 2013). Estos eventos de recombinación ocurren comúnmente dentro de

la región temprana 3' del virus, favoreciendo la pérdida de la expresión de los genes E1, E2, E4, E5 y L2. Se sabe que E2 reprime la transcripción de los genes virales tempranos, incluidos los oncogenes E6 y E7. Al perderse la expresión de E2, solo favorece a que los oncogenes establezcan una malignidad más fuerte, es por ello que E2, es un importante regulador transcripcional (Mallory E. Harden, 2017; Ruiz, Ponce, & Ávila, 2005).

## I. II. La proteína E2 del VPH-16 como un interesante regulador transcripcional.

La proteína E2 de los diversos tipos de VPH es una proteína muy conservada. Su estructura consiste en un dominio de transactivación N-terminal (TAD) y un dominio de unión al DNA C-terminal (DBD), conectados por una región flexible llamado región bisagra, de longitud variable dependiendo el tipo viral; entre las múltiples funciones de la proteína E2 se encuentra la replicación del DNA viral, la segregación del genoma, la transcripción, el control del ciclo y senescencia celular (Centeno, 2008; Lee A. Y., 2009).



**Figura 4.** Estructura de la proteína E2 VPH-16. Tomada de:(Dell & Gaston, 2001)

La proteína E2 del VPH-16 está conformada por 365 aminoácidos y es una proteína de unión al DNA, que reconoce secuencias palindrómicas de 12pb 5'-ACCG(N)<sub>4</sub>CGGT-3' mejor conocidas como sitios de unión de E2 (E2BS). A lo largo del genoma viral existen diversos E2BS, los cuales al ser reconocidos por E2 favorecen la regulación transcripcional positiva o negativa dependiendo de la distancia de estos a la caja TATA y del promotor (Hawley-Nelson P., 1988). E2 puede regular la transcripción por tres mecanismos principales; el primero uniéndose a TBP (TATA Binding Protein), el segundo interactuando con factores nucleares como Sp1 u otros que corregulan la transcripción y el tercero, mediante la remodelación de la estructura de la cromatina y del DNA (Tsin-Wah. et al., 2015).



La proteína E2 actúa como un dímero para realizar su función, en los VPH de alto riesgo se encuentran cuatro E2BS conservados en posiciones específicas en la región LCR del genoma viral, que participan en la regulación transcripcional de las oncoproteínas E6 y E7 (Blakaj DM, 2009; Centeno, 2008). La proteína E2, además de su papel como factor de transcripción, recluta a la proteína E1 al genoma viral para permitirle funcionar como una helicasa de DNA específica del genoma viral, y así mismo al unirse a la región LCR asegura la regulación de la replicación y transcripción del genoma viral; también se ha detectado un efecto en el *splicing*, lo que sugiere que E2 controla la expresión de genes virales a través de la regulación de la transcripción y el procesamiento del mRNA. Entre otras de sus funciones destaca también la de atar el genoma viral al huso mitótico del huésped durante la división celular, permitiendo su segregación eficiente en las células hijas (Blakaj DM, 2009; Muller M., 2012).

El genoma del virus suele integrarse al genoma celular cuando avanza la infección y como ya se ha mencionado, al incorporarse se pierde la expresión de E2 y con ella la regulación transcripcional que esta proteína realizaba. E2 puede reclutar e interactuar con muchos elementos celulares, y al existir en el genoma múltiples E2BS, posiblemente podría regular su expresión génica. Así mismo, al analizar el interactoma de E2 se ha encontrado que interactúa con múltiples factores de transcripción, remodeladores de la cromatina y proteínas que median el ciclo celular y la apoptosis (Mallory E. Harden, 2017; Muller M., 2012).

Muchas de las funciones de E2 se le atribuyen a su capacidad de interactuar con elementos celulares, por ejemplo, para la segregación viral durante la mitosis, E2 interactúa con Bdr4, estabilizando así su unión del huso mitótico con los cromosomas (Lee A. Y., 2009). Por lo mismo, E2 es un interesante regulador transcripcional no solo para el genoma viral, sino también para el genoma del huésped, y su estudio apenas está originándose.

### **I. III. El impacto de la presencia de la proteína E2 de VPH sobre elementos celulares**

La proteína E2 tiene dos dominios, separados por una región bisagra flexible rica en serina y arginina, el dominio C-terminal, que medía la unión al DNA y la dimerización (DBD) y el dominio de activación de la transcripción N-terminal (TAD), que tiene una alta capacidad de unirse a las proteínas celulares; aunque, el dominio DBD también puede interactuar con elementos celulares, es el TAD al que se le han asociado más interacciones (Muller M., 2012).

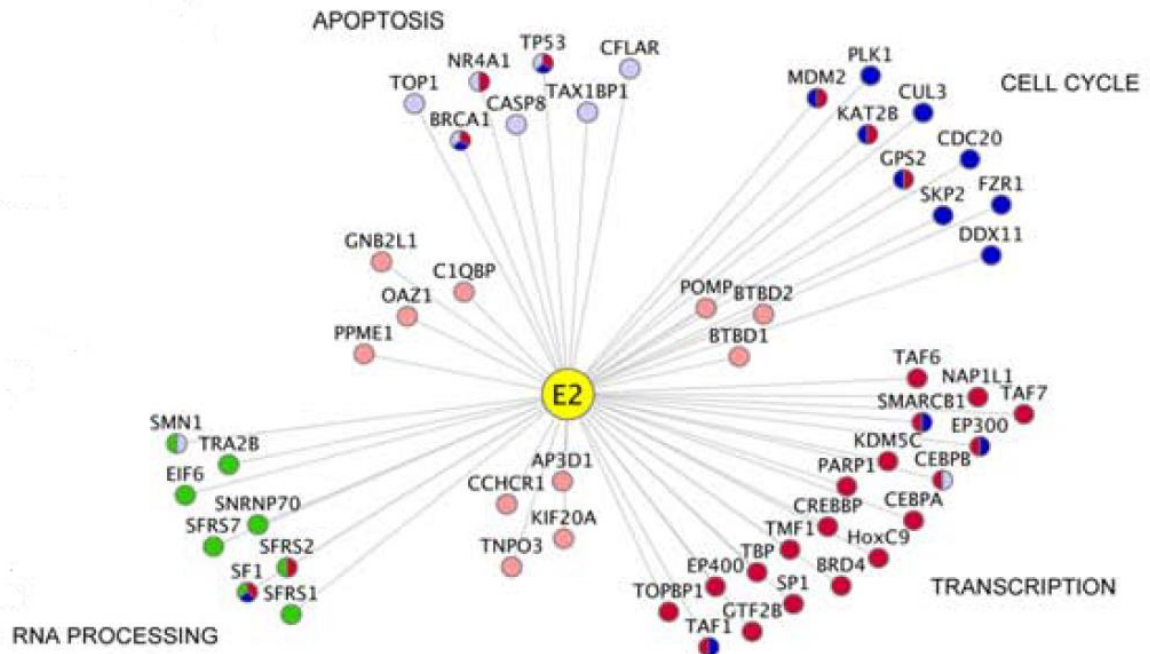
Entre las interacciones notables atribuidas al dominio DBD de E2, se encuentra la proteína de bromodominio 4 (Brd4), que se une también al dominio TAD de E2 por su extremo carboxilo terminal y es necesaria para el inicio de la síntesis del DNA viral. Brd4 se colocaliza con E2 para unir el genoma viral a los cromosomas durante la segregación mitótica en conjunto con las proteínas ChIR1 y TopBP1 (DeSmet Marsha, 2019).

La interacción entre E2 y elementos celulares como factores de transcripción o proteínas, ha demostrado que la proteína viral puede regular la transcripción del huésped a través de dichas interacciones; sin embargo, hasta la fecha, no ha habido una caracterización detallada de la regulación específica que E2 de HPV16, ejerce sobre la expresión génica del huésped (Evans et al., 2019). Lo anterior es la razón por la cual la mayoría de las funciones de E2 se relacionan con el interactoma que esta proteína viral tiene con elementos celulares (Muller M., 2012).

El interactoma de E2 reportado en el 2012 por Müller y colaboradores, reporta a cuatro familias funcionales principales: elementos celulares relacionados con la regulación de la transcripción, procesamiento de RNA, apoptosis y modulación del ciclo celular. Entre ellas destacan Sp1, TAF-1, P53 entre otros elementos celulares que se pueden apreciar en la siguiente imagen y que son de suma importancia para la regulación transcripcional y la supervivencia celular.

Las proteínas E2 pueden modular la transcripción a través de la modificación de histonas, ya que se ha comprobado su interacción con varias acetiltransferasas de

histonas: PCAF, EP300, CBP, TRRAP / TIP60 (INO80, p400, TRRAP, TIP60);  
 desacetiltransferasas: NCOR1 / HDAC; desmetilasas: KDM1B, SMCX y metilasas:  
 WDR5, WHSC (WHSC1, WHSC1L1), SALL (Jang, Anderson D. Eric, van Doorslaer  
 Koenraad, & McBride, 2015; Muller M., 2012).



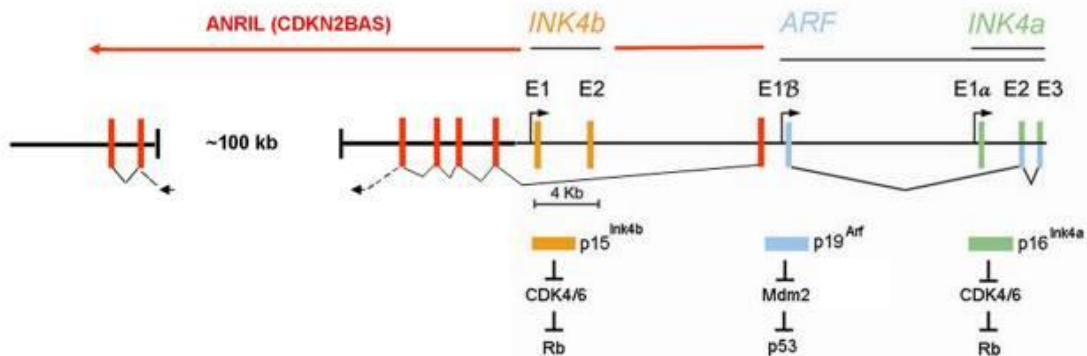
**Figura 5.** Elementos celulares con los cuales se ha demostrado que E2 puede interaccionar. Tomada de Muller M., 2012.

Por otro lado, también se ha demostrado la interacción con miembros de los complejos de remodelación de la cromatina, involucrados en el depósito o desplazamiento de los nucleosomas: NAP1L1 y hSNF5. NAP1L1 participa principalmente en el ensamblaje de nucleosomas acoplados a la replicación al mediar la incorporación de dímeros de histonas H2A-H2B en los nucleosomas (Rehtanz, Schmidt, Warthorst, & Steger, 2004). El complejo de remodelación de cromatina SWI/SNF (SMARCA4) mejora la transcripción dependiente de HPV18 E2 a través de la unión directa del componente central hSNF5 a E2 (Cha & Seo, 2011). Otras interacciones de E2 con complejos remodeladores de la cromatina son: NuRD (CHD4, SMARCA5, HDAC1 / 2, MTA1 / 2) y WICH (BAZ1B, SMARCA5). Esta última interacción identificada con E2 del VPH 8, es de particular interés ya que se trata de un complejo de remodelación de cromatina que está involucrado en la transcripción de DNAr y que también podría funcionar para mantener la estructura de la cromatina donde se encuentran los genes ribosomales (Jang et al., 2015).

La proteína E2 del VPH-16 interacciona fuertemente con muchos elementos celulares, para regular la transcripción del genoma viral, lo que ha llevado a postularla como un regulador transcripcional de la célula huésped. Resulta interesante dilucidar la manera en que la presencia de la proteína E2 afecta diferentes reguladores transcripcionales, involucrados en el ciclo celular, como inhibidores de quinasa dependiente de ciclina de la familia INK y ARF, reguladores epigenéticos, RNA largos no codificantes (RNAInc) o remodeladores de la cromatina, así como los efectos que dichas interacciones o alteraciones de la función puedan ocasionar en la célula huésped.

## I. IV. El locus CDKN2A/B

El locus 9p21 también conocido como CDKN2A/B, comprende una región de aproximadamente 50Kpb. Este locus génico consta de tres genes principales CDKN2A, CDKN2B y CDKN2B-AS1, los cuales transcriben a tres importantes supresores tumorales (ST) y a un RNAInc. CDKN2A transcribe a p16-INK4A y a p14-ARF (en ratón conocido como p19-ARF), importantes inhibidores de quinasa dependiente de ciclina, que favorecen el arresto del ciclo celular mediante la vía Rb y p53 respectivamente, ya que p16<sup>INK4A</sup> inhibe a la CDK4 y CDK6, ocasionando que la fosforilación de RB no suceda y se bloquee el ciclo celular en la fase G1, mediante la inactivación de E2F; mientras que P14<sup>ARF</sup> interacciona con la proteína ligasa de ubiquitina E3 (Mdm2), evitando así que se forme el complejo Mdm2-p53, favoreciendo la estabilidad y función de p53, deteniendo el ciclo celular en la fase G1-G2 de manera dependiente de p53 (Bahrami et al., 2018; Rivandi et al., 2018; Sherr, 2012).



**Figura 6.** Locus CDKN2A/B o INK4-ARF. Las líneas negras horizontales indican regiones intrónicas, las flechas sitios de inicio de la transcripción y los rectángulos son exones (E) del código de colores correspondiente. Tomada de: (Sherr, 2012)

Por su parte, el gen CDKN2B codifica a la proteína p15-INK4B, también catalogado como supresor tumoral ya que al igual que p16<sup>INK4A</sup>, tiene la capacidad de inhibir a CDK4/6, favoreciendo así, el arresto del ciclo celular en fase G1. A p15<sup>INK4B</sup> siempre se le ha catalogado como homólogo de la función de p16<sup>INK4A</sup>, que se activa cuando p16<sup>INK4A</sup> no puede llevar a cabo su función, ya que tanto p16 como p14 son muy susceptibles a sufrir mutaciones puntuales que inactivan su función (Krimpenfort et al., 2007).

Este *locus* es regulado mediante diferentes mecanismos. El primero de ellos lo constituyen factores de transcripción específicos que favorecen o no la activación del *locus*. Es el caso de la existencia de sitios de respuesta a CTCF en el *locus*, por lo que al unirse el factor específico, se favorece una conformación de la cromatina que induce la expresión de INK4A/B (Hirose et al., 2012). De la misma manera, el *locus* contiene sitios de respuesta al factor tcf1, el cual es dependiente de la activación de la vía Wnt- $\beta$  catenina para inducir la expresión de reguladores negativos del ciclo celular, lo que conduce a una reducción de la proliferación celular y al aumento en el número de células en la fase G1 (De Jaime-Soguero et al., 2017). También se ha demostrado que INK4A y ARF son regulados positivamente por la abundancia de EGR 2 (Tyler et al., 2021).

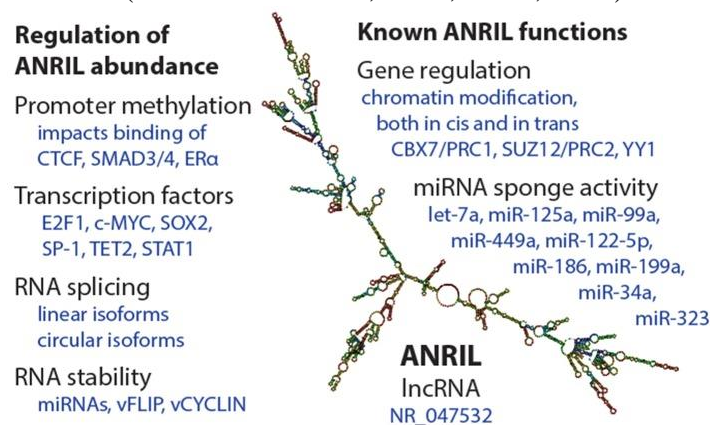
Se han establecido mecanismos de regulación común del *locus*, uno de ellos involucra el estímulo de un oncogén, que favorece el reclutamiento de un factor de transcripción, induciendo así el silenciamiento del *locus* por medio del reclutamiento de complejos proteicos represores de la cromatina. Por ejemplo, en células de cáncer de colon el oncogén KRAS, induce la unión del factor de transcripción ZNF304 al promotor del *locus* INK4-ARF, favoreciendo su represión mediante el reclutamiento de KAP1, SETDB1 y DNMT1 como co-represores (Serra, Fang, Park, Hutchinson, & Green, 2014).

El RNAinc llamado ANRIL que se transcribe en sentido opuesto al grupo de los ST, gracias a un promotor bidireccional compartido con ARF, tiene relevancia debido a que ejerce una regulación en cis y en trans sobre todo el *locus*. Se ha postulado que ANRIL tiene la capacidad de reclutar a los *Polycomb Repressive Complex 1 y 2* y así instaurar la represión del *locus* génico (C. Achour & F. Aguilo, 2018).

## I. VI. ANRIL: Los RNAInc y su impacto en la regulación epigenética

A lo largo del genoma humano se ha establecido que existen además de las regiones codificantes que transcriben a mRNA, RNA's largos no codificantes (RNAInc) mayores a 200nt ubicados en regiones intergénicas o intragénicas, que se pueden transcribir tanto en sentido como en sentido opuesto, por la RNA polimerasa II. Las funciones de estos RNAInc están ligadas a regulación transcripcional y epigenética, gracias a su capacidad de secuestrar miRNAs y evitar la función de estos o por funcionar como *scaffold* o andamiaje para reclutar reguladores epigenéticos y factores de transcripción (Cyrinne Achour & Francesca Aguilo, 2018).

ANRIL es un RNAInc de 3834 pb, transcrito de la hebra anti sentido del *locus* CDKN2A/B, como se puede observar en la figura 6. Hasta ahora, se ha reportado que contiene 21 exones y diversas variantes *de splicing* y estructuración, tanto lineal como circular. En la posición p21 del cromosoma 9 existe una región de aproximadamente 100Kb propensa a sufrir mutaciones de un solo nucleótido (SNP), que se han asociado con diversas enfermedades, y un fragmento de ella está dentro de la región intrónica del gen CDKN2B- AS1 (Drak Alsibai et al., 2019; Sherr, 2012).



**Figura 7.** Regulación y funciones del RNAInc ANRIL. Tomada de: (Kong, Hsieh, & Alonso, 2018)

La abundancia y función de ANRIL varía dependiendo de varios factores como se puede observar en la figura 7 (Kong et al., 2018).

La capacidad de ANRIL de actuar como regulador transcripcional resulta interesante, ya que puede reclutar e interactuar con reguladores epigenéticos como proteínas del grupo *Polycomb* (PcG) y metiltransferasas de DNA e histonas (Cyrinne

Achour & Francesca Aguilo, 2018). Las PcG, están agrupadas en dos grandes complejos, el *Polycomb Repressive Complex 1* y 2 (PRC1 y PRC2). El PRC2 está compuesto por EED (por sus siglas en inglés: Embryonic Ectoderm Development), el supresor de zeste (SUZ12), proteínas de unión a histona (CAF1, RBBP4 y RBBP7) y una metiltransferasa, que contiene un dominio SET de zeste (EZH2 o EZH1). Este complejo (PRC2), lleva a cabo la trimetilación de la histona 3 en la lisina 27 (H3K27me3), que se considera una marca epigenética importante para mantener la pluripotencia y la plasticidad de las *stem cells* (SC) durante el desarrollo embrionario; también es una marca de represión transcripcional importante en las células somáticas (Schuettengruber, Bourbon, Di Croce, & Cavalli, 2017).

La marca H3K27me3 recluta específicamente al PRC1 que instaura la represión transcripcional y está constituido por: *RING1* (RING1A o RING1B), que media la monoubiquitinación de la histona H2A en la lisina 119 (H2AK119ub), y una de las seis proteínas de dominio de “anillo-dedo” del grupo *Polycomb* (PCGF1-PCGF6), una proteína que posee un cromodominio o “cromobox” (CBX2, CBX4 y CBX6 – CBX8) que se une a H3K27me3 y una proteína homóloga Polihomeótica (Ph) (PHC1 – PHC3), que contiene un motivo alfa estéril SAM (S-adenosilmetionina), dominio esencial para la represión mediada por PcG (Ezhkova et al., 2009; Robinson et al., 2012).

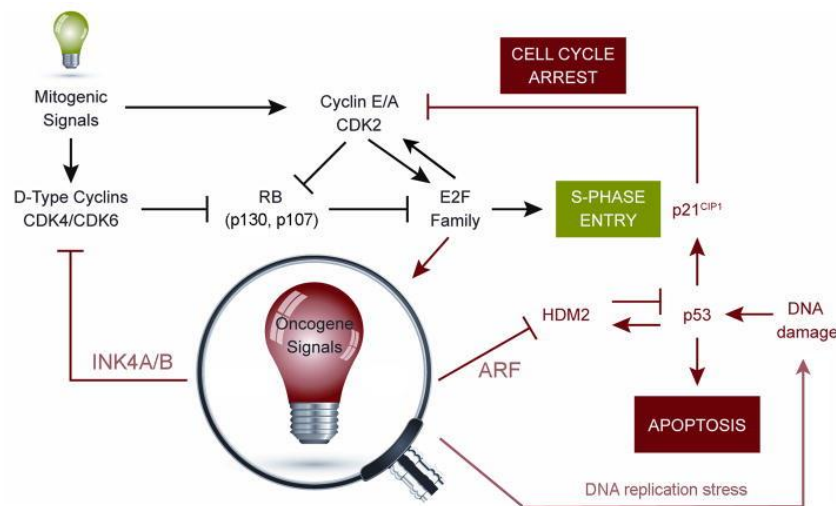
ANRIL tiene la capacidad de interactuar con SUZ12 y favorecer así el reclutamiento de PRC2 para que instaure su marca de represión transcripcional (H3K27me3), y para que ésta a su vez reclute al PRC1. Sin embargo, ANRIL también puede reclutar al PRC1 mediante su interacción con CBX7 (Cyrinne Achour & Francesca Aguilo, 2018; Yap et al., 2010)

En la actualidad, se sigue dilucidando el amplio espectro de funciones que ANRIL podría desempeñar para apoyar la regulación epigenética, ya que se ha demostrado que puede funcionar como andamio para WDR5, que es esencial para que HDAC3 pueda instaurar la marca de activación transcripcional H3K4me3 (C. Zhang et al., 2020).



## I. V. Relevancia de la función del *locus* CDKN2A/B

El *locus* CDKN2A/B es una ubicación génica que se ve frecuentemente mutada o deletada en diversos procesos carcinogénicos, como cáncer de riñón, colon, ovario, mama, cérvix, entre muchos otros más, ya que, al contener este *locus* tres ST importantes (INK4A/B y ARF), se suele prescindir de su función durante procesos cancerígenos, evitando la función de p53 y promoviendo la función de RB; para así bloquear la apoptosis y promover la proliferación celular ver figura 8 (Bahrami et al., 2018; Cáceres-Durán, Ribeiro-Dos-Santos, & Vidal, 2020; Drak Alsibai et al., 2019; Rivandi et al., 2018)



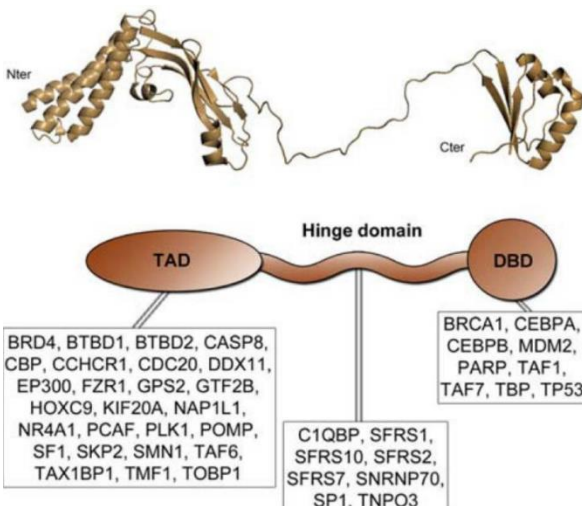
**Figura 8.** Función de los supresores tumorales p16-INK4A, p15-INK4B y p14-ARF. Tomada de: (Sherr, 2012)

El RNAnc ANRIL también se ha reportado sobre expresado en procesos carcinogénicos, favoreciendo el secuestro de miRNAs que funcionan como ST y favoreciendo la represión transcripcional mediante el reclutamiento de PcG y metiltransferasas de DNA. Diversos SNP's en este RNAnc se han observado asociados al desarrollo de cáncer y enfermedades metabólicas como diabetes mellitus tipo II, así como en aneurismas e infartos al miocardio (Kong et al., 2018). ANRIL puede actuar como un regulador en cis al estar siendo transcrito por la RNA pol II, favorecer el reclutamiento de PRC1 y 2, e instaurar la represión transcripcional de los ST INK4A/B y ARF, aunque se ha reportado que dicha función también la puede desempeñar en trans, más directamente sobre INK4B (Kotake et al., 2011).

Se ha considerado que el *locus* CDKN2A/B, tiene un fuerte potencial terapéutico, debido a que p16-INK4A induce arresto del ciclo celular, incluso independientemente del estatus de RB. Por su parte ANRIL en condiciones normales y en respuesta al daño del DNA, se suele activar transcripcionalmente gracias a E2F1 de una manera dependiente de ATM, para promover el crecimiento celular al suprimir los inhibidores del ciclo celular del *locus*, lo que sucede después de que termina la reparación del DNA, permitiendo el reingreso al ciclo celular; sin embargo, en condiciones de enfermedad, ANRIL se sobre regula o bien los inhibidores de la familia INK4 pierden su función (Bahrami et al., 2018; Congrains, Kamide, Ohishi, & Rakugi, 2013; Rivandi et al., 2018).

## II. Antecedentes

La proteína E2 del VPH16 regula la transcripción de los elementos virales, principalmente a los pertenecientes a la región genómica de expresión temprana, además, posee la capacidad de interactuar con elementos celulares del genoma del huésped como factores de transcripción, remodeladores de la cromatina y proteínas moduladoras del ciclo celular. Así mismo, se ha demostrado que puede regular negativa o positivamente la actividad de varios promotores celulares como el de  $\beta$ 4-integrina y hTERT y de forma positiva a p21, involucrina y SF2/ASF. En 2012, Müller y colaboradores publicaron un artículo de revisión en el cual recopilaban los reportes sobre todos los elementos celulares afectados por la presencia de la proteína E2-VPH, concluyendo que “el análisis funcional del interactoma de E2 proporciona una imagen completa del rango de sus funciones, visto a través de sus interacciones con el proteoma del huésped y que destaca un impacto predominante de E2 en los procesos celulares de transcripción, procesamiento de RNA, apoptosis, ubiquitinación y transporte intracelular” (Muller M., 2012; Ramírez-Salazar et al., 2011).



**Figura 9.** Interactoma de E2-VPH16 con elementos celulares. Tomada de:(Müller M., 2012)

En el 2011 Ramírez Salazar y colaboradores, expresaron el gen E2 de VPH16 en células C-33A por medio de un sistema de infección adenoviral y en un análisis de microarreglos de RNA, demostraron que la presencia de E2 VPH16 modifica la expresión génica del genoma de la célula huésped, encontrando 1048 genes regulados negativamente y 581 regulados positivamente; la vía celular más comprometida fue

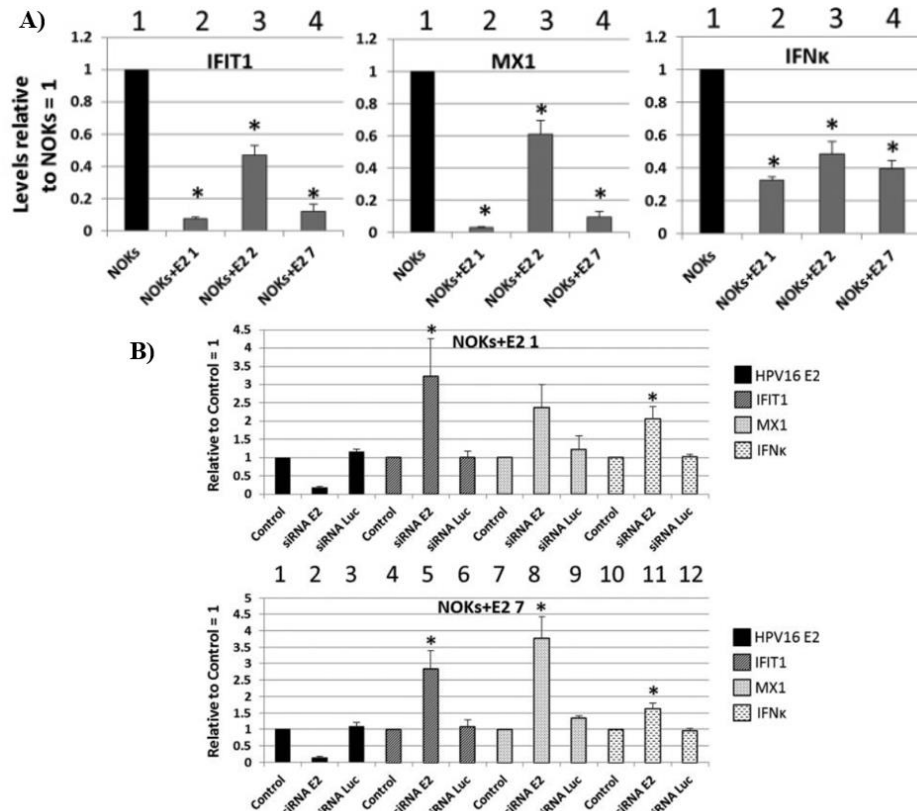
WNT con 28 genes regulados negativamente y 15 regulados positivamente. Esta vía celular es un punto de convergencia para regular la expresión de genes involucrados en diversos procesos celulares como: apoptosis, proliferación y diferenciación celular.

Los resultados de Ramírez Salazar y colaboradores indican que E2 de VPH16, tiene una tendencia a ser un represor transcripcional, sobre la expresión del genoma de la célula huésped. Bajo esta premisa otros grupos de investigación han analizado el papel que desempeña E2 como un regulador transcripcional del genoma de la célula huésped.

En el 2014, Gauson y colaboradores publicaron un trabajo sobre el papel que E2 desempeña a nivel de expresión génica y empalme de exones en la célula huésped, sugiriendo que E2 pueda programar el genoma del huésped durante la infección ya que, a pesar de que la expresión de E2 se pierde después de la integración del genoma viral en la célula huésped, es posible que E2 establezca un marcador epigenético en los genes, que favorece que se retenga su regulación incluso cuando se pierde la expresión de la proteína E2 (Gauson et al., 2014).

Las funciones principales de E2 son la replicación, transcripción y segregación del genoma viral. En el 2019 Evans y colaboradores, propusieron que la regulación del genoma del huésped es la cuarta función que E2 desempeña durante el ciclo de vida del VPH16, además de que esta función es relevante para el desarrollo del cáncer (Evans et al., 2019). En dicho estudio expresaron a E2 por medio de una infección lentiviral en queratinocitos orales inmortalizados, encontrando que E2 regula genes como IFIT1, MX1 y IFN $\kappa$  a la baja (Figura 10, panel A). Utilizando un siRNA contra E2, encontraron que la represión instaurada por E2 no es totalmente reversible (Figura 10, panel B), ya que el tratamiento con el siRNA aumentó la expresión de mRNA de IFIT1, MX1 e IFN- $\kappa$ , pero la expresión de IFIT1 y MX1 solo se recuperó en un 40%. Esto puede atribuirse a los niveles residuales de E2 presentes después del tratamiento con el siRNA o al hecho de que se requiere más tiempo para el alivio completo de la represión transcripcional.

En los genes IFIT1 y MX1 se analizó el efecto del fármaco 5-aza-2-deoxicidina que revierte la metilación del DNA. Cuando se dio el tratamiento con este fármaco, los niveles de mRNA de IFIT1 y MX1 mostraron un incremento en presencia de E2, sugiriendo que E2 puede promover la metilación de ciertos genes, pero también se especula que puede deberse a que E2 induzca marcas epigenéticas permanentes en los genes que resultan en una represión constante independientemente de los niveles de E2.



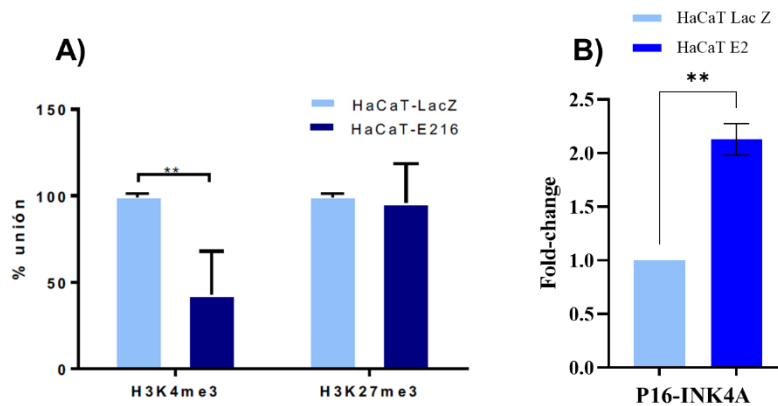
**Figura 10.** Efectos de E2 sobre la expresión genes implicados en procesos de inmunidad de queratinocitos A) Efecto de E2-VPH16 sobre la expresión de IFIT1, MX1, IFNκ, en diversas clonas de NOK's. B) Uso de un siRNA contra E2 invierte parcialmente la represión de los genes del huésped por parte de E2. Se determinaron los niveles de expresión de los genes E2, IFIT1, MX1 e IFN-κ en células tratadas con los siRNAs indicados. Los resultados se expresan como cambio de veces con respecto a los observados en cada muestra de control y representan los promedios de tres experimentos independientes. Modificada de: (Evans et al. 2019)

En el trabajo de Evans y colaboradores también se realizó un análisis de la base de datos The Cancer Genome Atlas (TCGA), con datos de expresión de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSC) mediante RNA-seq, catalogando tumores positivos a VPH16, con expresión o con ausencia de E2, reportando que aquellos que son positivos para VPH16 y tienen la expresión de E2, comparados con

los VPH negativos para E2, tienen una sobre expresión de los genes CDKN2B-AS1 y CDKN2A.

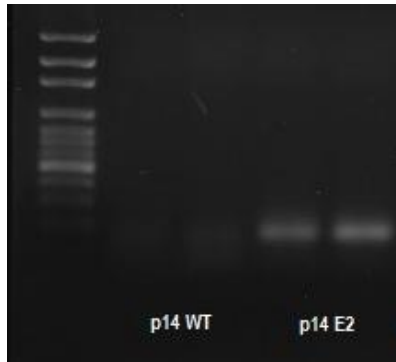
En nuestro grupo de investigación se evaluó el efecto de E2 sobre la maquinaria epigenética celular, utilizando un sistema lentiviral que permite la expresión estable de E2 de VPH16. En este trabajo, se encontró que en células HaCaT que expresan E2, los niveles de mRNA de los genes EZH2, KAT2A y DNMT3B, que están implicados en distintas maquinarias de regulación epigenética, se encuentran disminuidos, lo que sugiere su represión transcripcional (De León B.K. et al. 2019).

Resultados preliminares de nuestro grupo de investigación indican que la expresión de E2 altera la abundancia de la trimetilación en H3K4 y en H3K27 en los sitios de inicio de la transcripción de p16-INK4A, favoreciendo la disminución de la abundancia de marcas de activación transcripcional, pero curiosamente se favorece la expresión de p16-INK4A a nivel de mRNA, sugiriendo que muy posiblemente otro mecanismo de regulación como la metilación de DNA, podría estar involucrado.



**Figura 11. A)** Análisis del porcentaje de unión de H3K4me3 y H3K27me7 mediante CHIP al sitio de inicio de la transcripción del gen p16 en las células HaCaT-LacZ y HaCaT-E216. Los valores de porcentaje de unión son calculados por el método de fold-enrichment y posteriormente se muestra como el porcentaje de unión de cada marca con respecto a HaCaT-LacZ. Los resultados son representativos de cuatro ensayos independientes expresados como la media  $\pm$ SD. \*\*significancia  $p < 0.005$  **B)** valor de fold-change es calculado con el método  $\Delta\Delta CT$  utilizando como control endógeno TBP. Los resultados son representativos de dos ensayos independientes expresados como la media  $\pm$ SD, \* significancia  $p < 0.005$ . Modificada de: (De León B.K. et al. 2019)

Por otro lado, en 2020 en nuestro grupo de trabajo se determinó mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativa (en punto final), la sobreexpresión de p14-ARF en células RKO que expresaban a E2 de VPH16 (Ramírez Venegas, M. de A., 2020), dando indicios de que esta proteína afecta la transcripción del locus CDKN2A/B.

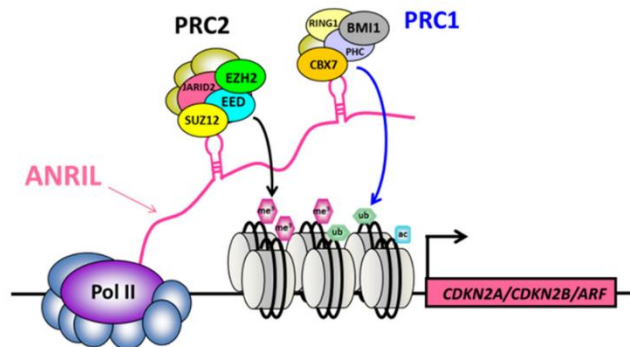


**Figura 12.** Expresión de p14-ARF, por PRC en punto final, gel de agarosa 1.5% en células RKO que expresan E2-VP16. Tomada de: Ramírez Venegas, M. de A. 2020

Aún no se conoce con claridad la manera en que E2 regula la expresión del genoma del huésped, pero dados los conocimientos que se tienen sobre esta proteína viral, pudiera ser que uno de los mecanismos sea por una interacción directa con el genoma del huésped debido a la existencia de E2BS. Sin embargo, aunque se ha demostrado que algunos tipos de E2 pueden interactuar con algunos de estos sitios en el genoma celular, en la mayoría

de los casos su interacción resulta en una alteración nula o no significativa en la expresión transcripcional del genoma del huésped (Võsa, Sudakov, Remm, Ustav, & Kurg, 2012).

Por otro lado, el hecho de que E2 pueda interactuar con muchos elementos celulares que tienen un rol importante en la regulación de la expresión del genoma celular, como factores transcripcionales o remodeladores de la cromatina, apoya fuertemente la idea de que E2 ejerce una regulación de manera indirecta sobre el genoma humano. Es decir, que la proteína E2 interactúa con elementos celulares responsables de la regulación transcripcional y del mantenimiento y remodelación de la cromatina, alterando su correcta función y expresión de los elementos celulares que deberían estar controlando; por ejemplo, modulando la función de RNAinc que reclutan a proteínas del grupo *Polycomb* (PcG) y a proteínas del grupo Trithorax (TrxG). Estas proteínas son vitales para los patrones de expresión génica por lo que, al



**Figura 13.** Interacciones entre el ARN no codificante largo (lncRNA) ANRIL y los complejos represivos polycomb PRC2 / PRC1 en el locus p16-CDKN2A / p15-CDKN2B / p14-ARF. Tomada de: (Drak Alsibai et al., 2019)

estudiar si modifican su expresión o regulación en presencia de E2 de VPH16, se podría establecer una conexión directa, si dicha proteína es capaz de causar modificaciones epigenéticas estables y repercutibles en el genoma del huésped.

ANRIL es un ejemplo de un RNAinc que puede reclutar a PRC1 y 2 y modificar la regulación transcripcional de los ST que se transcriben en el *locus*, donde ANRIL se localiza (ver figura 13) (Drak Alsibai et al., 2019). Los antecedentes de que p16 y p14 se ven afectados por la presencia de E2, nos invita a investigar si la proteína viral afecta de igual forma a los demás elementos del *locus* CDKN2A/B, ANRIL y a p15.



### III. Justificación

La proteína E2 del Virus del papiloma humano (VPH), se caracteriza por estar muy conservada entre la familia viral. Su función es diversa, ya que actúa como reguladora transcripcional de los genes virales E6 y E7, pero además repercute en los perfiles de expresión génica que pueden llevar a la célula huésped a la proliferación celular, a la diferenciación o a la apoptosis (Muller M., 2012). Dicha función se ha asociado con su capacidad de interactuar con proteínas celulares que regulan la expresión génica, como factores de transcripción, y muy posiblemente con reguladores epigenéticos como DNA metiltransferasas, ya que se ha reportado que otras proteínas virales pueden hacerlo, por ejemplo, E7 que forma un complejo con la DNMT1A y afecta el promotor de Ciclina A (Chalertpet, Pakdeechaidan, Patel, Mutirangura, & Yanatatsaneejit, 2015).

En reportes anteriores de nuestro grupo de investigación se ha establecido que la proteína E2 del VPH16 (E2-VPH16), reprime transcripcionalmente a los genes EZH2, KAT2A y DNMT3B, que son parte de la maquinaria epigenética de la célula, e induce la expresión transcripcional de diversos genes involucrados en la progresión y arresto del ciclo celular, como p16-INK4A y p14-ARF; importantes supresores tumorales del *locus* CDKN2A/B (De León Barrera, K.I., 2019; Ramírez Venegas, M. de A., 2020). El *locus* CDKN2A/B transcribe un RNAnc llamado ANRIL que tiene la capacidad de reclutar a las proteínas del grupo *polycomb*. Ambos complejos *polycomb* (PRC1 y PRC2) son represores epigenéticos, que juegan un papel crítico durante varios procesos del desarrollo, como el mantenimiento de la identidad celular y la diferenciación de células madre, y de manera importante en el desarrollo del cáncer. El esclarecer si E2-VPH16 afecta la transcripción de ANRIL y de los ST del *locus* CDKN2A/B, ayudara a comprender como es que E2 afecta el arresto y progresión del ciclo celular.

Por otro lado, se ha reportado que la expresión de E2 altera las marcas epigenéticas (H3K27me3, H3K4me3) propias de genes con cromatina bivalente, y p16-INK4A es uno de ellos; la disminución de la marca activadora y aumento en la represora repercute en el estado transcripcional del gen.

Todo indica que la expresión de E2-VPH16 no favorece la pérdida de la marca epigenética represiva H3K27me3 colocada normalmente por EZH2, a pesar de que los niveles de mRNA y proteicos de EZH2, se encuentran disminuidos en presencia de la proteína E2-VPH16.

Los precedentes de investigación invitan a pensar que la proteína E2 podría realizar una programación a nivel epigenético en las células del huésped, que repercute directamente en la regulación transcripcional de la célula, aun cuando sus niveles sean muy bajos o incluso cuando su expresión se haya perdido, como lo han sugerido varios autores (Evans et al. 2017 y Gauson et al. 2014), uno de los mecanismos que E2 podría estar afectando es la metilación de DNA.

Lo mencionado anteriormente invita a continuar evaluando el estado transcripcional del *locus* CDKN2A/B en presencia de E2 VPH-16, ya que E2 podría estar vinculada de forma directa o indirecta en la regulación transcripcional del *locus* CDKN2A/B, que repercute directamente en la regulación del ciclo celular y procesos como la apoptosis y la senescencia celular en las etapas iniciales de la infección por VPH.

## IV. Hipótesis

E2 de VPH-16 modifica la expresión de los genes CDKN2A, CDKN2B y CDKN2B-AS1 localizados en el *locus* CDKN2A/B.

## V. Objetivos

### V. I. Objetivo general

Evaluar el efecto de la presencia de E2-VPH 16 sobre la regulación transcripcional del *locus* CDKN2A/B

### V. II. Objetivos específicos

- 1.1. Identificar la expresión de E2 en las células C33A-E2.
- 1.2. Determinar los niveles de expresión de p16-INK4a, p15, p14-ARF y ANRIL en células que expresan a E2-VPH16 de manera estable, por medio de RT-qPCR.
- 1.3. Analizar la correlación estadística entre la expresión de ANRIL y la expresión de p14-ARF, P15 INK4B y P16-INK4A.
- 1.4. Evaluar los niveles proteicos de p16 mediante western blot en células que expresan E2-VPH16 de manera estable.
- 1.5. Realizar una revisión sobre el estado transcripcional del *locus* CDKN2A/B con la presencia de E2-VPH16 en la base de datos GEO.
- 1.6. Predecir los sitios de metilación cercanos o dentro del promotor de los genes pertenecientes al *locus* CDKN2A/B cuya expresión se ve modificada por la presencia de E2-VPH16.

## VI. Metodología experimental

### Cultivo celular

- Se cultivaron y expandieron células C-33A (ATCC HTB-31) derivadas de carcinoma cervicouterino, de tipo epitelial y con un crecimiento adherente. Las células fueron obtenidas por N. Auersperg (Auersperg & Hawryluk, 1962) a partir de una biopsia de cáncer de cuello uterino perteneciente a una mujer caucásica de 66 años, estas células expresan a la proteína retinoblastoma (pRB), pero de un tamaño anormal; a su vez la expresión de p53 está elevada y hay una mutación puntual en el codón 273 que da como resultado una sustitución de Arginina por cisteína.

Estas células son negativas para la presencia de DNA y RNA del virus del papiloma humano. En 2016, en nuestro grupo de trabajo, López Vázquez I, A. las transfectó con el plásmido p-TRACER-CMV/Bsd-3xHAE216, que contiene el transgén que codifica para la proteína E2 de VPH 16, estableciendo así la línea celular C-33A E2-VPH16.

Las líneas celulares C-33A WT y C-33A E2-VPH16 se cultivaron y expandieron en placas utilizando las técnicas estándares de cultivo celular utilizando Dulbecco's Modified Eagle Medium-Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12 (GIBCO®), al cual se le agregó 29 mM de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>, SIGMA®), 10 mM de HEPES (SIGMA®) y se ajustó a pH 6.8-6.9. Posteriormente, se suplementaron con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO®), L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina y estreptomina 100 µl/ml. Ambas líneas celulares se mantuvieron en incubadora a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

- Las células SiHa (ATCC HTB-35) derivadas de carcinoma cervicouterino expresan p53 y pRB, y a su vez presentan una a dos copias del genoma de VPH-16 integradas al genoma celular.

- Las células RKO (ATCC CRL-2577) derivadas de carcinoma de colon no expresan la proteína p16 debido a una metilación del *locus* CDKN2A/B.

- Las células de carcinoma hepatocelular Hep 3B2.1-7 [Hep 3B, Hep-3B, Hep3B] (ATCC HB-8064) sobre expresan el RNAinc de ANRIL y se ha asociado como marcador tumoral del carcinoma hepatocelular.

Todas las líneas celulares antes mencionadas se cultivaron en placas con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco Thermo Fisher Scientific) al cual se le agregó 4 mM de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>, SIGMA®), 10 mM de HEPES (SIGMA®) y se ajustó a pH 6.8-6.9. Posteriormente se suplementaron con 10% de SFB (GIBCO®), L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina y estreptomicina 100 µl/ml. Todas las líneas celulares se mantuvieron en incubadora a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

## **Extracción de RNA**

Se sembraron y cultivaron células C-33A WT, C-33A E2-VPH16, SiHa, HepG2, Hep3B y RKO en cajas p60, cuando alcanzaron un 80% de confluencia fueron despegadas con tripsina 0.5x (Calsson) y recuperadas en PBS 1X (Phosphate-Buffered Saline) para posteriormente obtener el botón celular y resuspenderlo en 600µl de TRIzol® Reagent a 4°C (Ambion, Life Technologies). Esta suspensión/lisado se almacena a -70°C para el posterior aislamiento de RNA total de alta calidad.

Para extraer el RNA de los lisados celulares resuspendidos en TRIzol, se dejaron descongelar en hielo durando 15 minutos (min) y posteriormente se siguieron las instrucciones del fabricante del estuche comercial Direct-Zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research). El RNA se eluyó con 30µl -50µl de agua libre de RNAasas y DNAasas, dependiendo de la muestra.

Las muestras de RNA se cuantificaron con en el equipo NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific™ Número de catálogo: ND-2000), corroborando que las muestras tuvieran una concentración optima que abarcaban desde los 200ng/µl a los 900ng/µl con un índice de pureza A260/A280 de 1.99-2.02 y A260/A230 de 2.00-2.20 lo cual indica un índice de pureza optimo.

Posteriormente, el RNA se migro electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5% para verificar su integridad, y para finalizar se realizó un tratamiento adicional con DNAasa para eliminar cualquier contaminación con DNA genómico. Se utilizo la DNAasa RQ1 RNase-Free DNase (PROMEGA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Así mismo para la confirmación de la ausencia de contaminación de DNA genómico se realizó una reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en ingles PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en punto final de un gen de expresión constitutiva

( $\beta$ -2 microglobulina) a partir del RNA tratado con DNAasa y se verifico la ausencia de amplificación.

El RNA se utilizó inmediatamente o se almaceno a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **Síntesis de cDNA (Reverso-Transcripción (RT))**

A partir de las muestras de RNA de las líneas celulares de interés, se generó cDNA, ya que este templado es de mayor estabilidad y favorece la reproducibilidad de resultados. Para ello se tomaron  $1.6\mu\text{g}$  de RNA previamente tratados con DNAasa y se retrotranscribió a cDNA , utilizando como *primer* para la retro-transcripción de RNA poliadenilados (como el mRNA) al Oligo (dT) 15 (PROMEGA). Posteriormente, se llevó a cabo la RT con ayuda de la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (PROMEGA) siguiendo las recomendaciones del fabricante, a excepción de que se utilizaron  $1.6\mu\text{g}$  de RNA y se dejó actuar la enzima por 90 min a  $42^{\circ}\text{C}$  (en lugar de  $60^{\circ}\text{C}$ ), para garantizar una mayor eficiencia de reacción. Para verificar la integridad y funcionalidad del cDNA, siempre se corrió una PCR de confirmación de un gen de expresión constitutiva, en este caso  $\beta$ -2 microglobulina y se verifico la amplificación de un solo producto a 101 pb.

El cDNA obtenido fue usado inmediatamente o almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se consideró que tenía una vida útil máxima de 7 días.

### **PCR en punto final**

La PCR se llevó a cabo adicionando  $5\mu\text{l}$  del buffer 5X Go Taq Flexi,  $1.5\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM,  $1\mu\text{l}$  de upstream y downstream primer 10mM,  $1\mu\text{l}$  de mix de dNTP's 10mM,  $2\mu\text{l}$  de cDNA muestra y  $0.2\mu\text{l}$  de la enzima Go Taq Flexi DNA Polymerase (PROMEGA) llevándose a un volumen final de  $25\mu\text{l}$  con  $13.3\mu\text{l}$  de agua libre de ácidos nucleicos, RNAasas y DNAasas.

Los productos de la reacción se migraron electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5%

## **Identificación de la expresión de E2-VP16**

Para identificar la expresión de E2 de VP16, se extrajo RNA de las líneas celulares C-33A WT y C-33A E2-VP16 con el protocolo antes descrito y se corrió un ensayo de PCR en punto final para amplificar a E2 de VP16 con el siguiente set de primers E2AAcFwQPCR 5' TGC GGG TGG TCA GGT AAT 3', E2AAcRvQPCR 5' TGG TCG CTG GAT AGT CGT 3', que amplifican el dominio de transactivación de la proteína E2. Las condiciones utilizadas fueron 10 min de desnaturalización a 94°C con 40 ciclos de amplificación compuestos por 45 seg - 94°C, 45 seg- 60°C, 60 seg- 72°C, y un ciclo final a 72°C por 5 min. Los productos se migraron electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5% y se corroboró la presencia de un amplicón de 163 pb en las células de interés. Este ensayo se realizó siempre que se obtuvo nuevo material biológico.

También se realizó la detección del transcrito de E2 por tiempo real por duplicado con las condiciones descritas en la siguiente sección.

## **Análisis de expresión génica por PCR cuantitativa (PCR en tiempo real o qPCR)**

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



Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Oligos para PCR en punto final y qPCR.

NOMBRE	GEN	ALIAS	GEN ID		Secuencia (5' - 3')	Tm °C	Size pb
GPMRT2P14ARF	CDKN2A	P14ARF	1029	Fw	TGCTCACCTCTGGTGCCAAA	60	138
				Rv	TGAACCACGAAAACCCCTCAC		
GPMqPCRCDKN2B	CDKN2B	P15	1030	Fw	GGAATGCGCGAGGAGAACAA	55	171
				Rv	CATCATCATGACCTGGATCG		
EGGPRTp16	CDKN2A	P16INK4	1029	Fw	ATGGAGCCTTCGGCTGACT	58.3	143
				Rv	CATCATCATGACCTGGATCG		
EGRTANRIL2	CDKN2B-AS1	ANRIL	100048912	Fw	TTGTGAAGCCCAAGTACTGC	58.5	146
				Rv	TCTACTGTGGAGACGTTGGT		
E2AAcQPCR	E2	E2-16	HPV16_E2	Fw	TGC GGG TGG TCA GGT AAT	60	163
				Rv	TGG TCG CTG GAT AGT CGT		
β-2 M (Control endógeno)	β-2 microglobulina	β-2 M	567	Fw	ACCCCCACTTGAAAAAGATGAGTA	60	101
				Rv	ATGATGCTGCTTACATGTCTCGA		

Set de oligos utilizados para qPCR

## Preparación de lisados celulares y western blot

Las líneas celulares C-33A WT, C-33A E2-VPH16 y RKO se cultivaron y expandieron en las condiciones antes descritas. Se obtuvieron lisados celulares con buffer RIPA (Tris-HCl 25 mM pH 7.0, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Nonidet P-40 1%, Deoxicolato de sodio 1%, SDS 0.1%) que contenía inhibidores de proteasas (Complete al 2X, ROCHE) y de fosfatasas (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 200 mM, NaF 500 mM, Na<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub> 400 mM) para la extracción de proteínas. Posteriormente, los lisados fueron sonicados por tres ciclos de tres pulsos de 20 segundos (seg) y 20 seg de reposo entre cada pulso y 60 seg de reposo entre cada ciclo, utilizando el equipo VWR Branson Sonifier 450 (Marshall Scientific) (10% Duty cycle, Output control 2). Las proteínas fueron recuperadas del sobrenadante de la sonicación y se cuantificaron usando el método de Lowry por espectrofotometría a 655nm.

La integridad de las proteínas extraídas se analizó mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) y posteriormente se tiñó el gel con Azul de Coomassie. La detección de la proteína de interés p16 fue mediante inmunodetección en fase solida o western blot (WB) con 50µg de proteína y utilizando como control de carga actina. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con SDS (Duodecil sulfato sódico), posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF de 0.2µm con una corriente de 90 volts a 4 ° C por 2h. Se realizó la estandarización de WB para los anticuerpos p16 INK4A (F-12): sc-1661 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) anti-

actina (donación del Dr. José Manuel Hernández Hernández, del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV).

Las membranas para realizar el WB de p16 fueron bloqueadas 1 hora (h) a temperatura ambiente con el buffer de bloqueo (una mezcla de tris-buffer salino (TBS) al 1X con leche al 5% (leche descremada en polvo, Svelty Nestle)). Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario en el buffer TBS 1X con leche al 2.5% toda la noche a 4°C, utilizando una dilución de anticuerpo primario 1:600. Como solución de lavado se utilizó TBS a 1X con Polisorbato 20 (TW), conocido como Tween 20 al 0.1%. Las membranas para realizar WB de actina fueron bloqueadas 1 h a temperatura ambiente con el buffer de bloqueo (una mezcla de TBS 1X, TW al 0.05%, leche al 5%), posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario a una dilución de 1:6000 con una mezcla de TBS 1X y TW 0.05% a 4° C toda la noche. Como solución de lavado se utilizó una mezcla de TBS 1X con TW 0.05%.

El anticuerpo secundario utilizado fue Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories), se usó a una dilución 1:3000 en TBS 1X con 2.5% de leche. La detección quimioluminiscente se realizó utilizando el estuche comercial Merck Millipore Sustrato de HRP quimioluminiscente Western Immobilon™ (ECL).

El nivel de expresión relativa fue normalizado comparando con la actina, usando el programa ImageJ. Las comparaciones estadísticas entre cantidades de proteínas por líneas celulares fueron realizadas usando la prueba estadística ANOVA de una vía mediante el programa GraphPad Prism v.9.0.

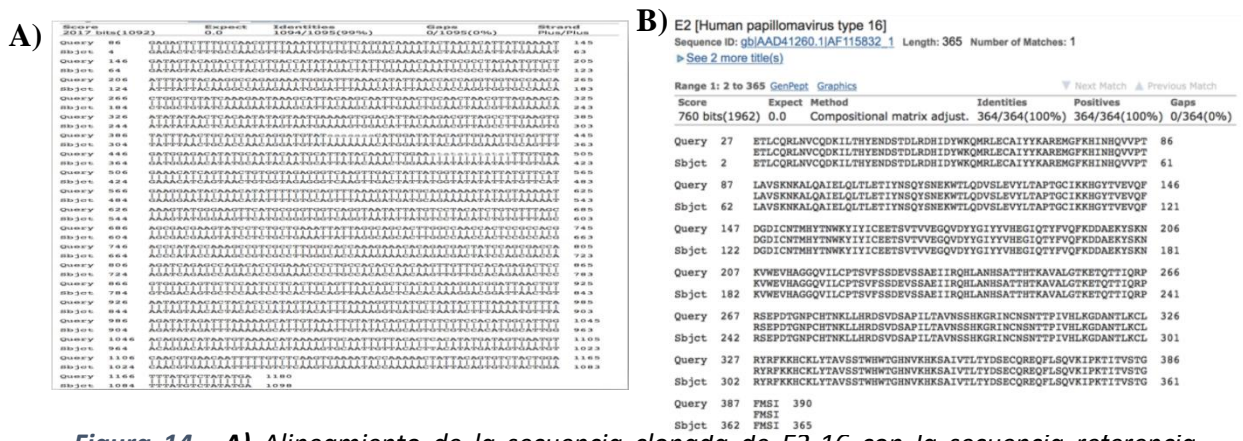
## VII. Resultados

### VII.I. Selección del modelo de estudio y confirmación de la expresión de E2-VPH16.

Considerando que el objetivo general del trabajo es determinar el efecto de la presencia de la proteína E2 del VPH 16 sobre el *locus* CDKN2A/B, se seleccionó una línea celular que expresara exitosamente el transgén de 1107pb correspondiente al gen E2-VPH16.

En 2016, López Vázquez I.A. realizó la transfección estable del transgén de E2-VPH16 en las células C-33A, con el plásmido pTracer™-CMV/Bsd. Este plásmido tiene diversas ventajas entre las que destacan, la producción de líneas celulares estables, un promotor de alta expresión constitutiva (CMV) para el transgén de interés, que en este caso es E2-VPH16 y un promotor para una expresión constitutiva alta del gen de selección (EF-1) que contiene el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) fusionado con el de resistencia a blasticidina.

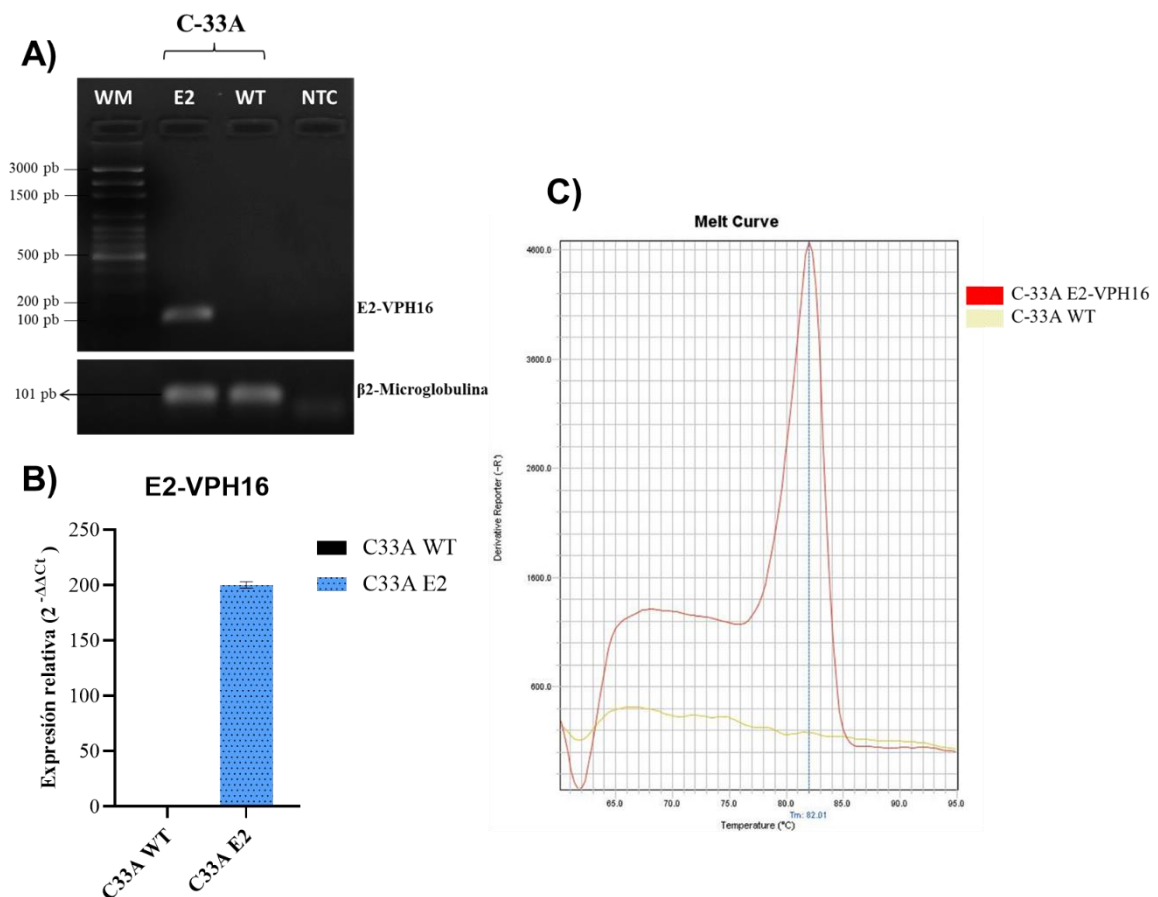
López Vázquez corroboró la identidad del transgén de E2-VPH16, mediante la secuenciación del fragmento liberado resultante de la restricción que flanqueaba al transgén de las colonias candidatas de interés. Se realizó la alineación correspondiente a nivel de nucleótidos y de aminoácidos con la herramienta BLAST, confirmando así que la secuencia de interés correspondía a E2-VPH16 y que no tenía ningún cambio (ver figura 14).



**Figura 14.** A) Alineamiento de la secuencia clonada de E2-16 con la secuencia referencia mediante BLAST B) Alineamiento de la secuencia aminoacídica de E2-16 con la secuencia de referencia mediante BLASTp. Modificada de: López Vázquez I.A. 2016.

Para este trabajo de investigación se seleccionaron las células C-33A debido a que son de linaje epitelial derivadas de carcinoma cervicouterino, con la particularidad de ser nulas a la infección por VPH, por lo tanto, no expresan a ninguna proteína viral, además, los datos en la literatura indican que el *locus* CDKN2A/B no está silenciado, por lo que representan un modelo muy pertinente para evaluar los efectos de la expresión de E2 mediante su expresión estable en las células C-33A E2-VPH16, sobre la regulación de este *locus* génico.

Se cultivaron y expandieron células C-33A E2-VPH16 y C-33A WT con la finalidad de confirmar la expresión del transgén E2. Se extrajo RNA y se retrotranscribió a cDNA con los protocolos establecidos, posteriormente, se corrió un ensayo de PCR en punto final con oligonucleótidos específicos que permiten amplificar el dominio TAD de E2-VPH16. Los productos de PCR se corrieron en un gel de



**Figura 15.** Confirmación de la expresión del transcrito de E2-VPH16 en células C-33A E2-VPH16. **A)** Producto de PCR en punto final de E2-VPH16 en células C-33A E2-VPH16 y C-33A WT en un gel de agarosa al 1.5%. **B)** qPCR de E2-VPH16 en células C-33A E2-VPH16 y C-33A WT,  $n=2$ , cuantificación mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $mean \pm SEM$  **C)** Curva melt de la qPCR que indica la presencia de un solo producto de disociación.

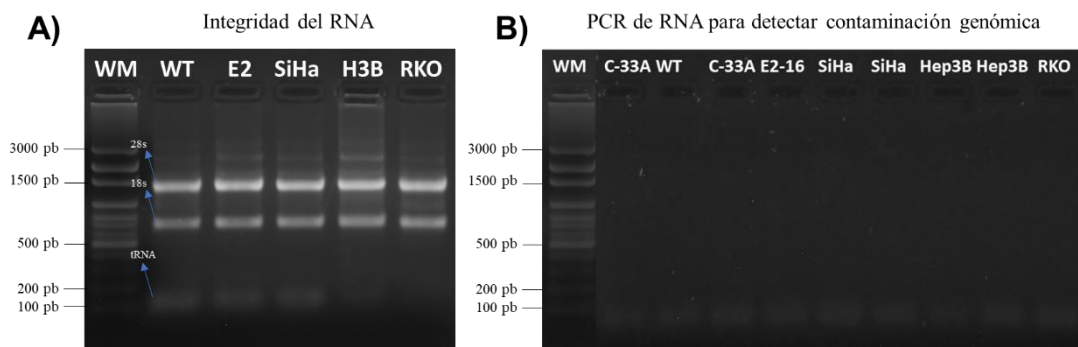
agarosa al 1.5%, obteniendo una banda específica a 163pb correspondiente a la región TAD del transgén de E2-VPH16 (Figura 15A).

Se determinaron los niveles de expresión del transcrito de E2-VPH16 por qPCR, mediante los protocolos ya establecidos, encontrando que la cantidad de expresión de E2 en las células C-33A E2-VPH16 no tiene un alto grado de varianza entre los dos pases celulares evaluados, concluyendo que la expresión de E2 en las células C-33A se mantiene estable.

Como era esperado, las células C33A WT muestran nula expresión del transgén de E2-VPH16, evaluado ya sea por PCR en punto final, como por qPCR (Figura 15).

## VII.II. Efecto de la expresión de E2-VPH16 sobre el *locus* CDKN2A/B en células C-33A.

Con la finalidad de saber cómo la expresión de E2-VPH16 afecta la transcripción del *locus* CDKN2A/B, se extrajo RNA de las líneas celulares de interés, con el protocolo ya establecido y se comprobó su integridad en un gel de agarosa al 1.5% como se observa en la figura 16A; adicional a esto, el RNA fue sometido a una PCR en punto final para verificar la ausencia de contaminación por DNA genómico (ver figura 16B). Solo se utilizaron los RNA's que tenían los parámetros óptimos: ausencia de contaminación con DNA genómico e integridad.

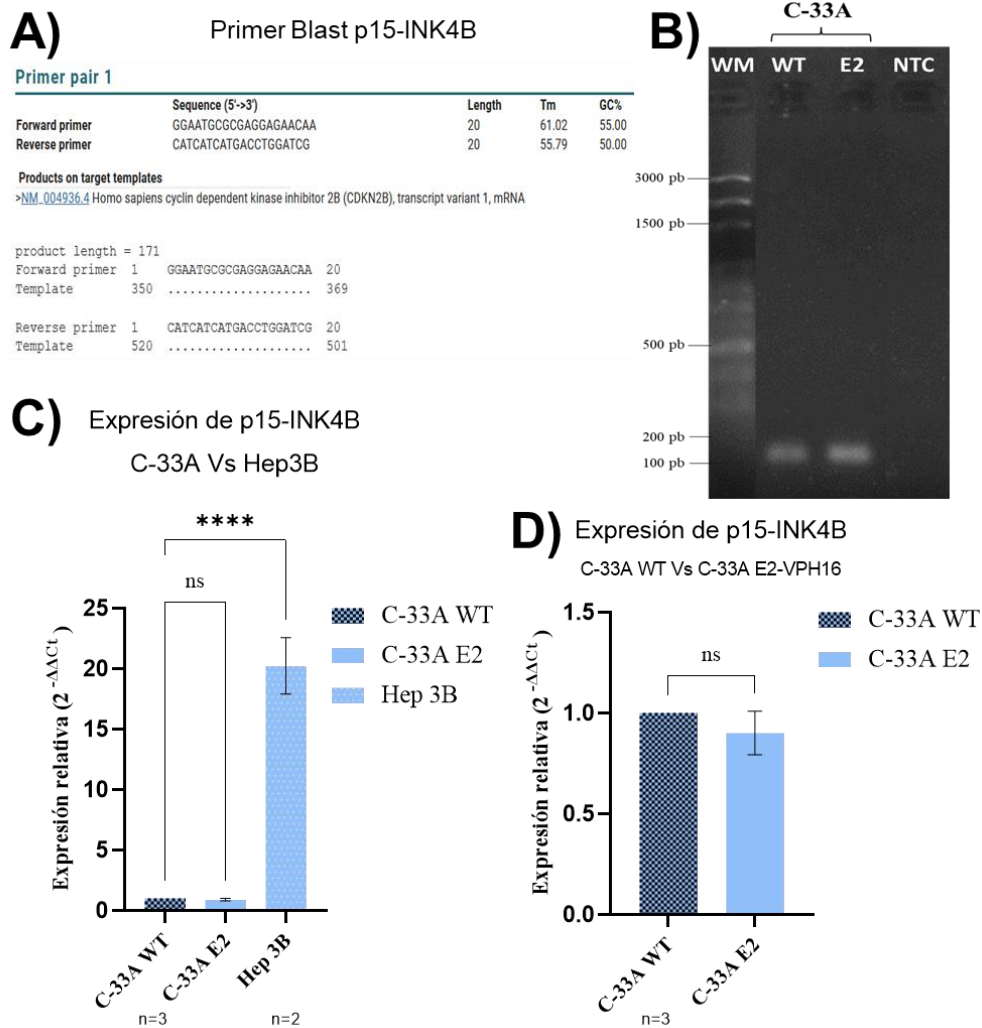


**Figura 16.** Optimización de material genómico utilizado. **A)** Integridad del RNA usado, C-33A WT (WT), C-33A E2-VPH16 (E2), Hep3B (H3B). **B)** PCR para amplificar  $\beta$ -2 microglobulina, utilizando el RNA de interés. Gel de agarosa 1.5%.

El RNA se procesó a cDNA, posteriormente se prosiguió a realizar los análisis de expresión génica de cada uno de los transcritos de interés por qPCR obteniendo los resultados que a continuación se mostrarán.

## VII.II. I. El gen CDKN2B no es afectado por la presencia de E2-VPH16

Con el objetivo de determinar si la presencia de E2-VPH16 en las células C-33A, afectaba la expresión del gen CDKN2B que codifica para el supresor tumoral p15-INK4B, se realizó un análisis de expresión mediante los protocolos que a continuación serán mencionados. En primera instancia, se corroboró que el par de oligonucleótidos cebadores usado para el análisis amplificara el transcrito de p15-INK4B; para esto se realizó un análisis de *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) con su secuencia,



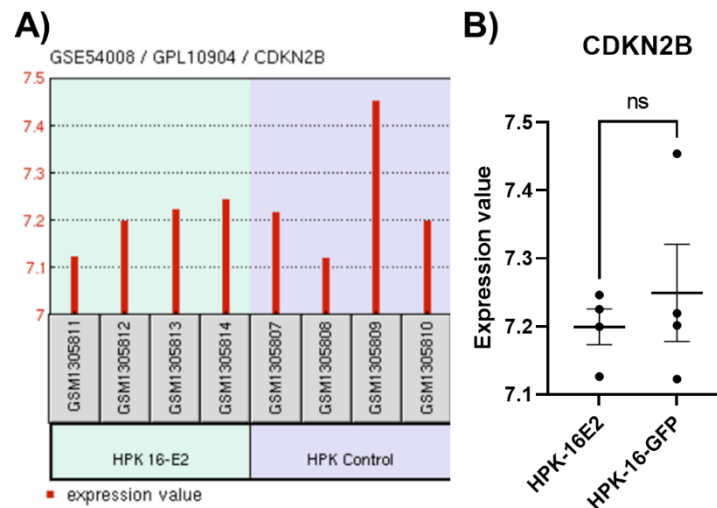
**Figura 17.** Análisis de expresión de p15-INK4B en células C-33A E2-VPH16.

**A)** Primer blast del set de primers utilizados para amplificar el gen de interés. **B)** Producto de PCR en punto final en un gel de agarosa al 1.5%, con un amplicón correspondiente a p15-INK4B a 171pb. **C)** Cuantificación relativa mediante qPCR de p15-INK4B de células C33A vs Hep3B. **D)** Cuantificación relativa mediante qPCR de p15-INK4B en células C-33A que expresan o no E2-VPH16. Anova de una vía  $p < 0.0001$ , método de cuantificación  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ,  $mean \pm SEM$ .

mediante el programa *Primer-BLAST* (Ye et al., 2012), encontrando que efectivamente permite amplificar parte del transcrito 1 del gen CDKN2B (Figura 17A).

Con la finalidad de garantizar que los oligonucleótidos cebadores generarían un solo producto de PCR, se realizó un ensayo de PCR en punto final, obteniendo un único amplicón de 171pb, correspondiente al gen de interés (Figura 17B).

El análisis de expresión de p15-INK4B en presencia de E2-VPH16 en células C-33A, se llevó a cabo mediante qPCR, para lo cual se decidió utilizar a las células Hep 3B de hepatocarcinoma celular como control positivo de la expresión de p15-INK4B, ya que se ha reportado que, debido a una mutación en la vía de señalización de la senescencia celular, este gen se encuentra sobre expresado en dicha línea celular (Figura 17C). Por su parte, las células C-33A E2-VPH16 no presentan el mismo nivel de expresión del gen CDKN2B, en comparación con las células C-33A WT que no expresan a E2-VPH16 (Figura 17D).



**Figura 18.** Estado transcripcional del gen CDKN2B en datos de microarreglos recuperados de la base de datos GEO. **A)** Datos crudos del valor de la expresión de CDKN2B en los ocho microarreglos. **B)** análisis estadístico del grupo control y el grupo que expresa E2-VPH16, t student, ns=no significativo

Posteriormente, con ayuda de la base de datos GEO de NCBI que se encarga de recabar datos crudos de microarreglos, se logró recuperar el resultado de ocho microarreglos; cuatro de queratinocitos humanos immortalizados (HPK) transfectados con E2-VPH16 y cuatro de HPK sin la expresión del transgén. Se tomaron los datos,

se recuperaron los correspondientes al valor de la expresión de CDKN2B y se sometieron a un análisis estadístico de *t* de *Student*, encontrando concordancia con nuestros resultados, el gen CDKN2B no sufre una afectación por la expresión de E2-VPH16.

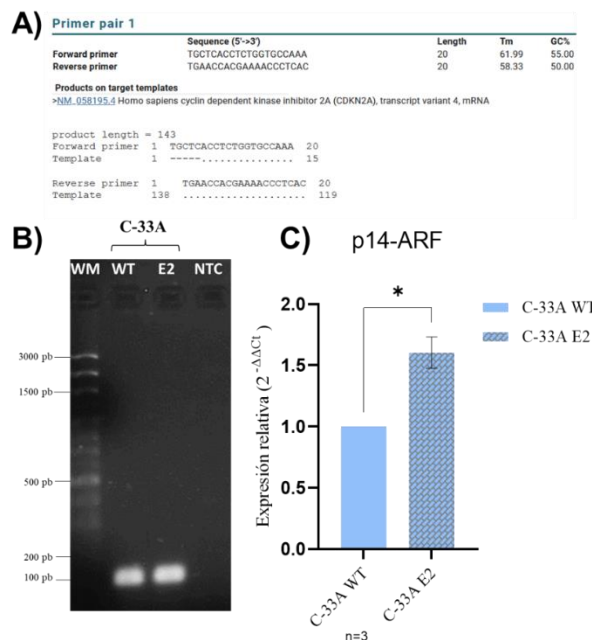
El número de acceso a los datos en la base de datos GEO es GSE54008, y los microarreglos fueron realizados por Sunthamala N. y colaboradores en el 2014.

## VII.II. II. El gen CDKN2A es regulado positivamente por la presencia de E2-VPH16 en células C-33A

Con el objetivo de determinar el efecto que E2-VPH16 causa sobre la expresión en el gen CDKN2A, se dividió el análisis de expresión en los dos productos principales de la transcripción, p14-ARF y p16-INK4A.

- p14-ARF

Como ya se ha mencionado p14-ARF es un supresor tumoral de suma importancia, debido a la capacidad que tiene de interactuar con Mdm2 y así permitir la función de p53 ante un estímulo oncogénico, además de esto, se asocia con la



**Figura 19.** Análisis de expresión de p14-ARF en presencia de E2-VPH16 en células C-33A. **A)** Primer blast del set de primers seleccionado que amplifica para p14-ARF. **B)** Producto de PCR en punto final de p14 ARF a 143 pb, en un gel de agarosa al 1.5% en células C-33A E2-VPH16 y C-33A WT, NTC: No template Control. **C)** Cuantificación relativa de p14-ARF mediante qPCR en células C-33A E2-VPH16 y C-33A WT. P<0.0421, t student con corrección de Welch, método de cuantificación 2-ΔΔCt, mean±SEM.



detención del ciclo celular en la fase G1, como un importante inhibidor de Cdks. En este trabajo, se determinó su sobre-expresión en presencia de E2-VPH16 de manera significativa (Figura 19C).

En primera instancia, al igual que en los ensayos anteriores, se realizó un análisis de *Primer BLAST* del set de oligos seleccionado para corroborar que amplificaría la variante transcripcional 4 del gen CDKN2A, correspondiente a p14-ARF que es el producto de interés (Figura 19A). Posteriormente se realizó un ensayo preliminar de expresión con una PCR en punto final, encontrando que la amplificación de p14-ARF, se llevaba a cabo tanto en las células C-33A WT como en las C-33A E2-VPH16, generando un amplicón a 143pb, como se puede observar en la figura 19B.

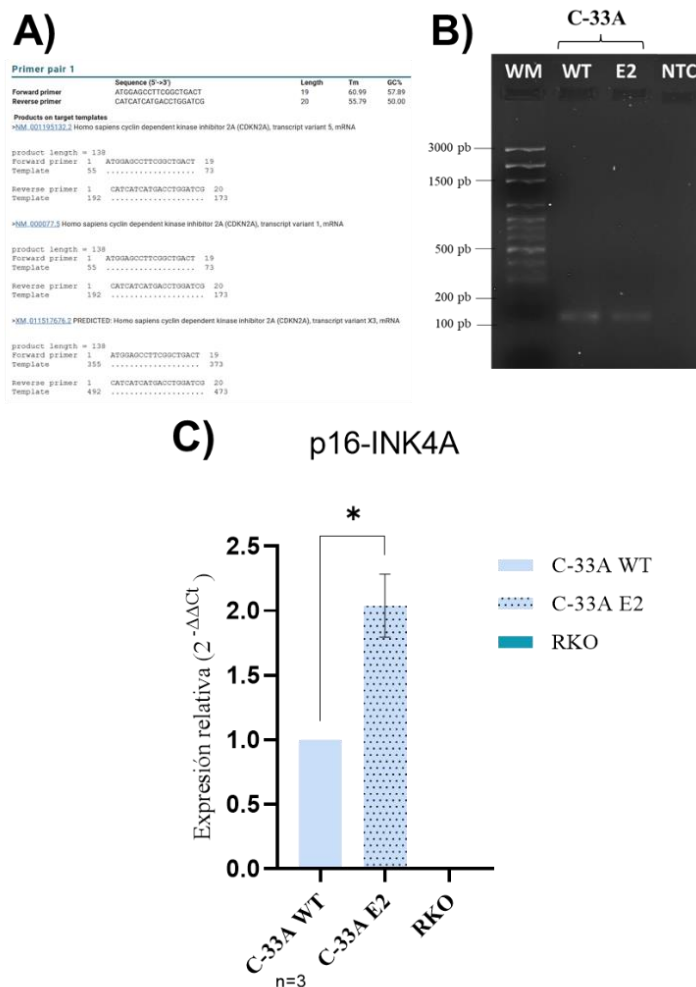
Para el análisis de expresión cuantitativo mediante qPCR se encontró que las células C-33A E2-VPH16, favorecían la expresión al alta de este gen en comparación con las células C-33A WT (Figura 19C).

- **p16-INK4A**

Para llevar a cabo el análisis de expresión génica de p16-INK4A en presencia de E2-VPH16, se realizó un análisis de *Primer BLAST* del par de oligonucleótidos cebadores seleccionado, encontrando que permitiría amplificar tres productos de 138pb; en primera instancia la variante transcripcional 1 del gen CDKN2A, que corresponde a p16-INK4A y a su vez, a la variante transcripcional 5 que incluye un exón extra en el extremo carboxilo terminal; esta es una isoforma de la proteína p16-INK4A llamada p16 gamma (Figura 20A), pero a ambas se le atribuye la misma función, solo varía su abundancia, por lo tanto, se confirmó que el set de primers sería específico y permitiría la cuantificación del transcrito de p16-INK4A en células C-33A WT y C-33A E2-VPH16.

En primera instancia, se realizó una PCR en punto final, cuyo producto de PCR se migró electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5%, se corroboró la amplificación de p16-INK4A en ambas líneas celulares a 138pb aproximadamente, como se muestra en la figura 20B.

Para determinar si la presencia de E2-VPH16 modifica la expresión del transcrito de p16-INK4A, se realizó un análisis de expresión génica mediante qPCR con el protocolo ya establecido. Se realizó la cuantificación relativa por el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , de tres replicas técnicas y tres replicas biológicas, encontrando que la presencia de E2-VPH16 en las células C-33A, favorecía la sobre-expresión de este transcrito de manera significativa, lo que se puede observar en la figura 20C. En dicho análisis, se utilizó como control negativo a las células RKO de carcinoma de colon, ya que la literatura indica que dicha línea celular tiene el promotor de p16 metilado y por lo tanto la expresión del transcrito es nula. Estos datos fueron corroborados en nuestro análisis de



**Figura 20.** Expresión de p16-INK4A en células C-33A E2-VPH16 en comparación con células C-33A WT. **A)** Primer Blast del set de primers seleccionado para la amplificación de p16-INK4A. **B)** Producto de PCR en punto final en un gel de agarosa al 1.5% que muestra la amplificación de p16-INK4A a 138 pb en células C-33A E2-VPH16 y C-33A WT. **C)** Cuantificación relativa mediante qPCR de p16-INK4A.

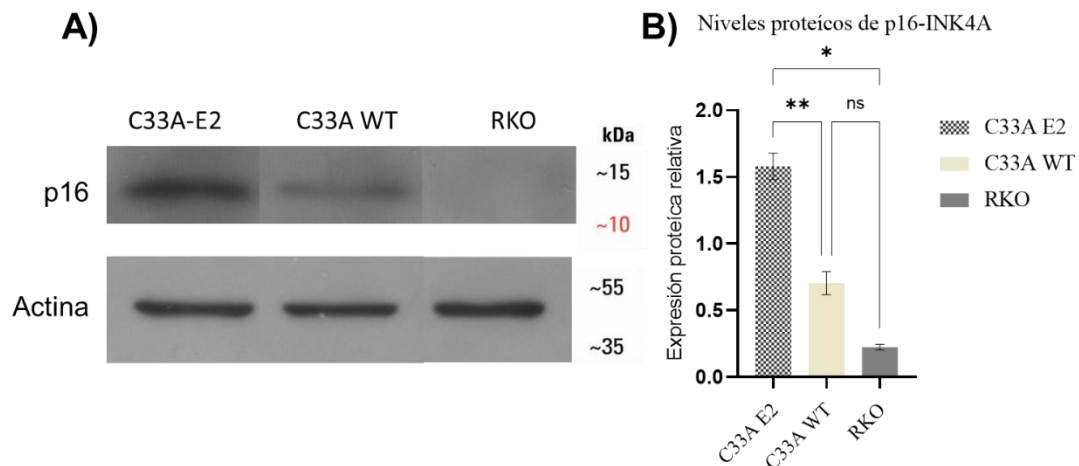
$P < 0.0257$ , t student con corrección de Welch, método de cuantificación  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $mean \pm SEM$ .

expresión, ya que no fue detectable la expresión de p16 en el ensayo de qPCR como se muestra en la figura 20C.

Al encontrar a p16-INK4A regulado positivamente a nivel del mensajero en células C-33A E2-VPH16, se decidió analizar el nivel proteico mediante western blot para determinar si la regulación al alta que estaba favoreciendo la presencia de E2-VPH16, solo se ejercía a nivel de mRNA o también a nivel de la proteína.

Se realizó el análisis de tres muestras biológicas por western blot, encontrando que efectivamente en las células C-33A E2-VPH16, se sobre expresaba la proteína p16-INK4 A de manera significativa, en comparación a las células C-33A WT, como se puede observar en la figura 21A, B. Se utilizó de igual manera a las células RKO como un control negativo de la expresión de p16-INK4A.

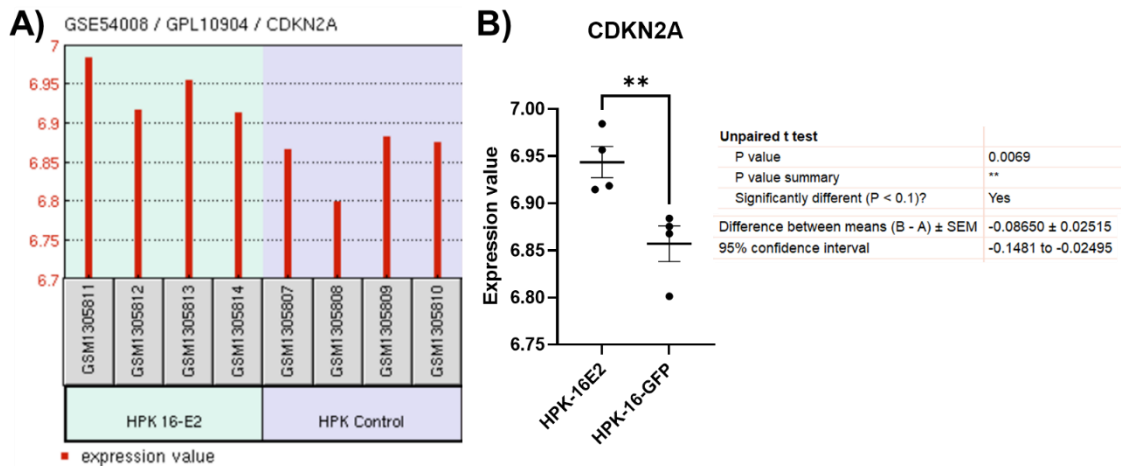
Se concluye que la presencia de E2-VPH16 en células C33A favorece la regulación al alta de la transcripción y traducción de p16-INK4A.



**Figura 21.** Western Blot p16-INK4A en células C-33A WT y C-33A E2-VPH16. **A)** Western blot P16-INK4A en C-33A WT y C-33A E2-VPH16 y RKO. **B)** Densitometría de western blot de p16-INK4A mediante image J.

*n=3, Anova de una vía; \*\*= 0.0069, \*=0.0118 ns=no significativa, graficado con mean ±SEM*

Con el fin de sustentar nuestros resultados, se utilizó una recopilación de datos existentes sobre el análisis de expresión génica en microarreglos de HPK que expresan y no a E2-VPH16. Se recuperaron los datos correspondientes al estado de expresión del gen CDKN2A, de ocho microarreglos depositados en la base datos GEO, registrados con la clave de acceso GSE54008, como se muestra en la figura 22A.

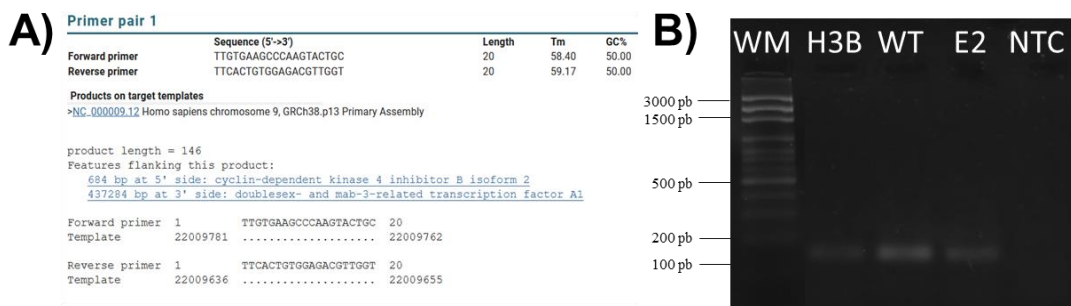


**Figura 22.** Estado transcripcional de CDKN2A, en datos de microarreglos de HPK que expresan y no a E2-VPH16. **A)** Datos crudos de ocho microarreglos depositados en la base de datos GEO por Sunthamala N. y colaboradores en el 2014. **B)** Análisis estadístico del grupo control y el grupo que expresa E2-VPH16.

Dichos datos se procesaron y se sometieron a un análisis estadístico de t de *Student* encontrando que, la expresión del gen CDKN2A se ve regulado al alta en HPK que expresan a E2-VPH16, en comparación con el grupo control. Estos datos respaldan nuestros hallazgos anteriormente mencionados.

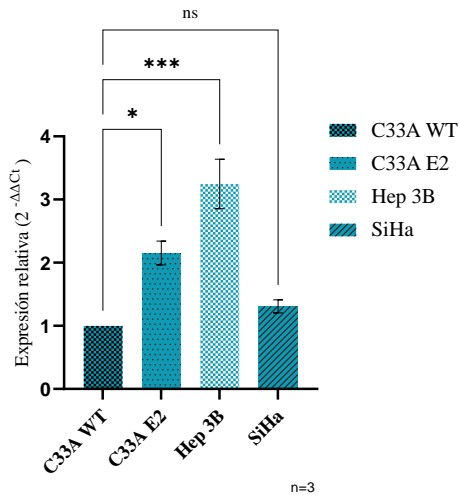
### VII.II. III. El RNAinc ANRIL es regulado al alta por la presencia de E2-VPH16 en células C-33A.

El gen CDKN2B-AS1 como ya se ha mencionado, codifica para un RNAinc llamado ANRIL, al cual se le han atribuido funciones en cis como un represor transcripcional, así como funciones en trans como andamiaje para reclutar reguladores epigenéticos. En los últimos años se ha demostrado que los RNAinc cumplen con funciones de regulación transcripcional muy importantes, es por ello que es interesante



**Figura 23.** Detección de ANRIL. **A)** Primer blast del set oligos seleccionados para la amplificación de ANRIL. **B)** Producto de PCR en punto final de ANRIL en un gel de agarosa al 1.5%, evaluado en células Hep3B (H3B), C33A WT(WT) y C33A E2-VPH16 (E2), No Template Control (NTC) Weight Marker (WM)

**Expresión relativa del lncRNA ANRIL**

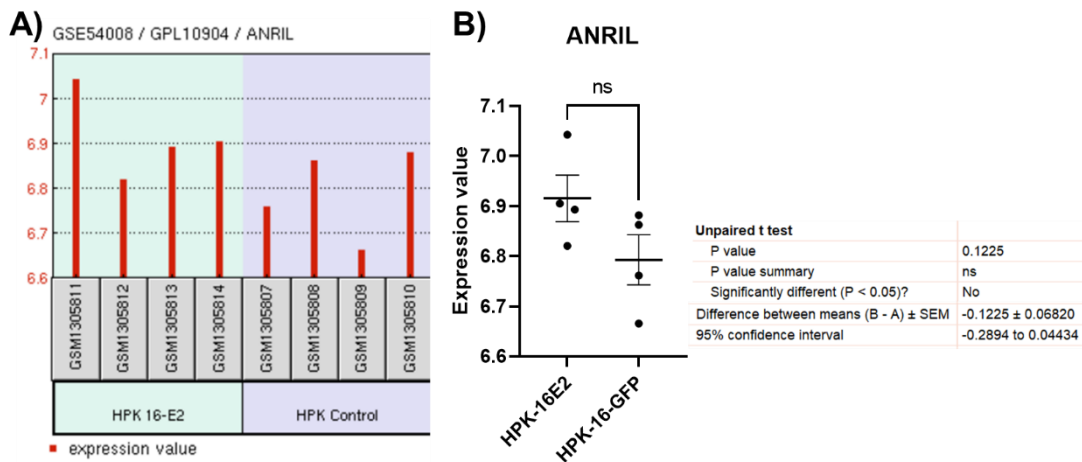


**Figura 24.** Expresión de ANRIL. Cuantificación relativa de qPCR de la expresión de ANRIL. Anova de una vía, \*=0.0160 \*\*=0.0003, método de cuantificación 2-ΔΔCt, mean±SEM

de dilucidar si la presencia de E2-VPH16 en células C33A favorece o reprime la abundancia de este RNAInc.

Se selecciono un par de oligonucleótidos cebadores que hibridara con la región sentido que amplifica para ANRIL y que mostrara buena detección por PCR en punto final (ver figura 23A, B). Al no encontrar reportes en la bibliografía que indicaran que las células C-33A expresaban buenos niveles de ANRIL, se decidió utilizar a dos líneas celulares como control de expresión; Hep 3B y SiHa, ya que son líneas celulares en las que ya se ha reportado la expresión de ANRIL, principalmente en Hep 3B se ha reportado una expresión elevada de ANRIL.

El análisis de expresión de este RNAInc se realizó mediante qPCR con los protocolos ya establecidos, encontrando que efectivamente Hep3B tenía expresión elevada de ANRIL comparada con las otras líneas celulares y que la presencia de E2-VPH16 favorece la transcripción de ANRIL hasta dos veces más en comparación con las células C-33A WT que no expresan al transgén E2, esto de manera significativa



**Figura 25.** Estado transcripcional de CDKN2B-AS1, en datos de microarreglos de HPK que expresan y no a E2-VPH16. **A)** Datos crudos de ocho microarreglos depositados en la base de datos GEO por Sunthamala N. y colaboradores en el 2014. **B)** Análisis estadístico del grupo control y el grupo que expresa E2-VPH16.

como se puede observar en la figura 24. En las células SiHa, que también son de carcinoma cervicouterino, pero VPH positivas, no se encontró una expresión significativa de ANRIL comparada con la que existe en las células C-33A WT.

Con el fin de confirmar que efectivamente E2-VPH16 favorece la expresión de este RNAinc, se realizó una recopilación de datos de ocho microarreglos de HPK que expresan E2-VPH16 y HPK control, en la base de datos GEO, posteriormente se recuperaron los datos crudos de expresión del gen CDKN2B-AS1 y se sometieron a un análisis estadístico, encontrando que en este sistema (HPK) E2-VPH16 no favorece la regulación al alta de ANRIL como se puede observar en la figura 25 A y B, aunque notoriamente se observa una tendencia de regulación al alta de CDKN2B-AS1, aunque no estadísticamente significativa.

### VII. III. Correlación positiva entre la expresión del RNAinc ANRIL y p16-INK4A.

Con la finalidad de establecer si el RNAinc ANRIL se expresaba de manera concomitante con los demás elementos del *locus* CDKN2A/B en presencia de E2, se reunieron los datos de cinco análisis de expresión mediante qPCR del *locus* completo en células C-33A E2-VPH16, realizados con los protocolos ya establecidos. Con ayuda del programa GraphPad Prism Versión 9.0.0, se agruparon los datos y se sometieron a un análisis de normalidad con las pruebas de Anderson-Darling, D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov; aprobando todas ellas, los datos se clasificaron entonces como normales.

A pesar de que los datos eran normales, no se podían considerar paramétricos ya que la n no era suficiente para poder llevar a cabo una correlación de Pearson, por lo tanto, se decidió realizar el análisis de correlación de Spearman que es óptimo para datos con distribución normal y pocas muestras.

**Tabla 2.** Análisis de correlación de Spearman del *locus* CDKN2A/B

	p14-ARF		p15-INK4B		p16-INK4A		ANRIL	
	r Spearman	ρ value	r Spearman	ρ value	r Spearman	ρ value	r Spearman	ρ value
<b>p14-ARF</b>	1	-	0	0.5250	0.3	0.3417	0.6	0.1750
<b>p15-INK4B</b>	0	0.5250	1	-	-0.2	0.3917	-0.4	0.2583
<b>p16-INK4A</b>	0.3	0.3417	-0.2	0.3917	1	-	0.9	0.0417
<b>ANRIL</b>	0.6	0.1750	-0.4	0.2583	0.9	0.0417	1	-

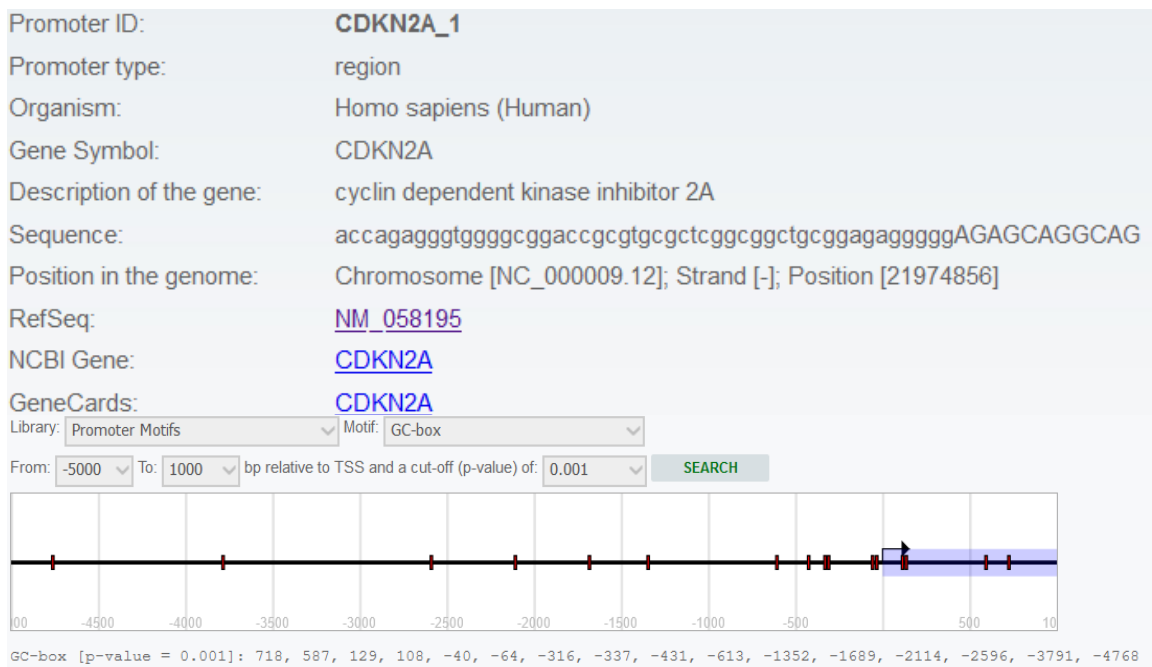
El análisis de correlación de Spearman busca establecer sí cuando ANRIL se expresa al alta, los demás elementos del *locus* también lo hacen, o a la inversa. La *r* de Spearman establece que en cuanto el valor sea más cercano a 1 existe una correlación más estrecha y esta puede ser positiva o negativa.

Los resultados del análisis establecieron que ANRIL y p16-INK4A se correlacionan en su expresión de manera significativa ( $p < 0.05$ ); es decir que tienden regularse transcripcionalmente de manera conjunta. No existe una asociación entre la expresión de ANRIL y los demás elementos del *locus* o bien entre ellos mismos de manera significativa.

#### VII. IV. Sitios CpG que engloban al promotor p16<sup>INK4A</sup>

Se realizó la predicción de los sitios de metilación cercanos o dentro del promotor de p16<sup>INK4A</sup>, ya que se reporta que esta región en particular es susceptible a sufrir regulación por metilación de DNA.

En primera instancia se analizaron las regiones promotoras del gen CDKN2A, con ayuda de la base de datos *The Eukaryotic Promoter Database: expansion of EPD new and new promoter analysis tools*, se seleccionó el promotor que codifica para la

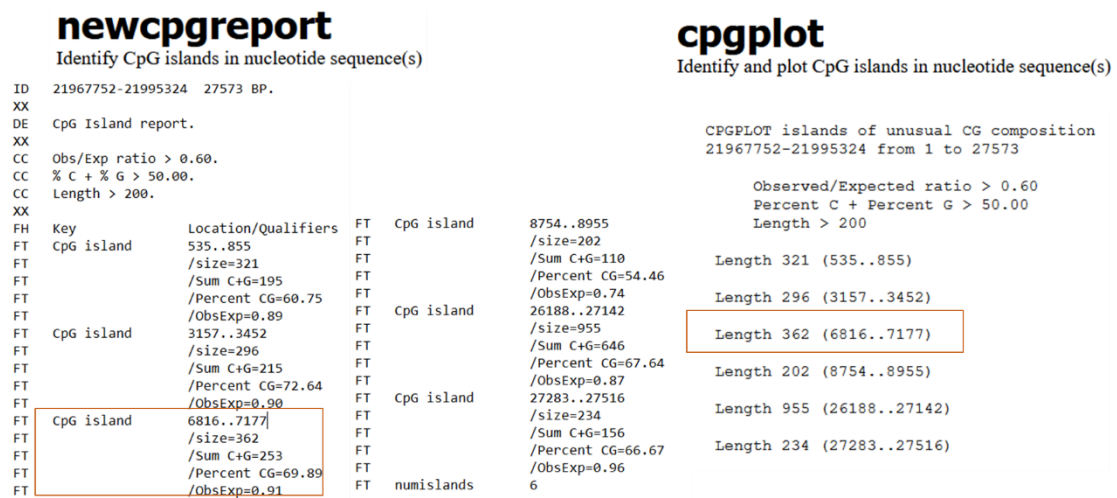


**Figura 26.** Análisis del promotor de p16-INK4A con ayuda de la base de datos EPD.

variante 1, que transcribe a p16<sup>INK4A</sup>, el cual se ubica en la posición 21974856 de la hebra negativa, en el cromosoma 9. El análisis de dicho promotor se muestra en la figura 26.

En primera instancia, se seleccionó una región de análisis de 5000pb upstream y 1000 pb downstream, en base al sitio de inicio de la transcripción (TSS), se programó a la base de datos para que remarcara las regiones ricas en CG, encontrando dieciséis regiones ricas en dCpG. La información bibliográfica consultada indica, que solo las regiones a 1000pb upstream y 500 downstream del TSS son cruciales para albergar regiones críticas para la regulación transcripcional.

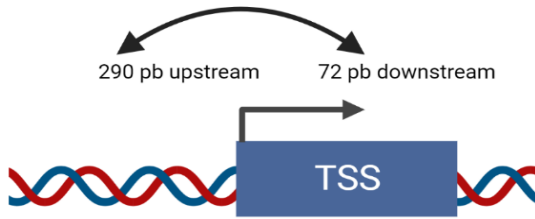
El gen CDKN2A se sometió a un análisis de predicción de islas CpG con ayuda de dos herramientas bioinformáticas de la plataforma de EMBOSS, NewCpGReport y CpGPlot, arrojando la presencia de seis islas CpG, con un porcentaje de CpG mayor al 50% y una longitud mayor a 200 pb, como se puede observar en la figura 27.



**Figura 27.** Reporte de la predicción de las islas CpG existentes en el gen CDKN2A.

En base a la enumeración que arrojaron los programas (de 1 a 27573 que es la longitud en pb del gen), el TSS se encuentra en la posición 7105 correspondiente a la posición cromosómica 21974856, según EPD. El análisis de islas CpG nos arrojó una isla de 362 pb, encontrada a 72 pb downstream y 280 pb upstream del TSS, es una buena isla candidata ya que está conformada por 69.89% de dCpG, no es un porcentaje mayor al 80% y por lo tanto su análisis de secuenciación no será complicado.





**Figura 28.** Localización de la isla CpG candidata a analizar según el análisis *in silico*.

(Gonzalez-Zulueta et al., 1995). La región de DNA que ellos estudiaron para determinar lo antes mencionado, es una región de la isla CpG candidata obtenida a partir de nuestro análisis *In silico*, corroborando así que esta isla CpG es susceptible a sufrir regulación por metilación de DNA.

En 1995 González y colaboradores, publicaron un trabajo en el cual puntualizaban que los cambios en la metilación del promotor de p16<sup>INK4A</sup>, se llevan a cabo en el exón 1 principalmente; la metilación de este exón favorece el silenciamiento génico de p16<sup>INK4A</sup>

## VIII. Discusión

### VIII.I. E2-VP16 favorece un estado de sobre regulación del *locus* CDKN2A/B

Los resultados obtenidos en el presente trabajo reflejan que E2-VP16, en células C33A, favorece la regulación positiva de la expresión de mRNA de p16-INK4A, p14-ARF y a nivel de transcrito al RNAinc ANRIL, de manera significativa. Solamente p15-INK4B no tiene cambios significativos en su transcripción referente al grupo control que son las células C-33A WT. En 2014, Sunthamala y colaboradores realizaron un microarreglo de expresión de queratinocitos humanos primarios, que fueron infectados con un sistema de expresión adenoviral para transcribir E2-VP16 y E2-VP18. Al recuperar los datos de expresión de los genes CDKN2A, CDKN2B y CDKN2B-AS1 pertenecientes al *locus* CDKN2A/B, se encontraron resultados similares a los nuestros obtenidos por qPCR; es decir que E2-VP16 promueve la regulación positiva del gen CDKN2A y de sus transcritos; p16-INK4A y p14-ARF de manera significativa.

El gen CDKN2B-AS1 que transcribe al RNAinc ANRIL, de acuerdo a nuestros resultados, se regula al alta en presencia de E2-16, pero los resultados de Sunthamala y colaboradores los marca con tendencia a la alta pero no de manera significativa. Para el caso de CDKN2B los resultados del microarreglo de Sunthamala y colaboradores arrojan que este gen que codifica para p15-INK4B, no se ve afectado por la presencia de E2-VP16; acorde a nuestros resultados (Sunthamala et al., 2014).

En el trabajo de Sunthamala analizan el RNA 48 hrs post-infección y utilizan un sistema de expresión adenoviral, que con el tiempo es susceptible a perderse y por lo tanto, la expresión de E2 por periodos largos no es posible; sin embargo, para evaluarla en periodos tempranos es un buen sistema ya que, garantiza una expresión fuerte del transgén. Nuestro modelo, por otro lado, es un sistema de expresión estable generado a través de la transfección con un plásmido que se ha integrado al genoma celular. La expresión constante y fuerte del transgén, en este caso E2-VP16, se asegura gracias a la presencia del promotor de citomegalovirus que promueve muy eficientemente la

transcripción del gen, además de la presencia de un gen de resistencia al antibiótico blastidina, que favorece la selección de las células.

Los tiempos de expresión de E2-VPH16 parecen ser cruciales para determinar los cambios de expresión que causa en la célula huésped, lo que puede ser la razón por la que a diferencia del reporte de Sunthamala, nosotros encontramos una sobreexpresión de manera significativa en el gen CDKN2B-AS1. Un análisis bioinformático realizado por Evans y cols., con ayuda de la base de datos The Cancer Genome Atlas (TCGA) que contiene perfiles de expresión de carcinoma de cabeza y cuello, en el que procesaron los datos de lecturas no mapeadas de 60 pacientes positivos para VPH16 y positivas para E2, arrojó resultados que indican que los tumores positivos para VPH16 que aun conservaban la expresión de E2, también tienen una regulación al alta de los genes CDKN2A y CDKN2B-AS1 (Evans et al., 2019).

#### ANRIL y p16; una expresión coordinada favorecida por la presencia de E2-VPH16

Encontramos que E2-VPH16 afecta la transcripción de tres de los elementos del *locus* CDKN2A/B (p16<sup>INK4A</sup>, p14<sup>ARF</sup> y ANRIL) al alta, además, reportamos una correlación positiva y significativa de expresión entre ANRIL y p16<sup>INK4A</sup> en presencia de E2-VPH16. Este *locus* tiene la peculiar característica de estar sujeto a diversos mecanismos de regulación, algunos de ellos, como se abordó en la introducción de este trabajo, dependen de estímulos externos o aberrantes de la célula, como respuesta a daño celular o a estímulos por oncogenes.

Reportamos a su vez que el incremento de la expresión de p16<sup>INK4A</sup>, también se ve reflejado en los niveles de esta proteína, ya que el análisis por western blot, evidencia que en presencia de E2 el nivel proteico de p16<sup>INK4A</sup> aumenta hasta dos veces, en comparación con las células C33A-WT. Hasta el momento, no se han reportado trabajos que indiquen que E2-VPH16 afecte la traducción de la célula huésped.

En 2019, Drak Alsibai y colaboradores publicaron un trabajo, en el cual establecían que en diversos tejidos tumorales, entre ellos el de cérvix, se da una correlación fuertemente positiva, entre el aumento en la expresión de los ST del *locus*

CDKN2A/B y ANRIL, postulando como posible mecanismo una desregulación del promotor bidireccional que activa la transcripción de ANRIL y p14-ARF, provocando que ANRIL no pudiera reclutar a las proteínas del grupo Polycomb e instaurar la represión transcripcional del *locus* (Drak Alsibai et al., 2019).

La expresión alterada de ANRIL se reporta en muchos tipos de enfermedades metabólicas y procesos cancerígenos (Drak Alsibai et al., 2019), sin embargo, los datos sobre la expresión de los ST del *locus* CDKN2A/B en la literatura son contradictorios, ya que pareciera que siguen diversos patrones de regulación, en dependencia del tejido celular y la enfermedad, pero de manera comun suelen perder su función a pesar de estar expresados positivamente. Los resultados obtenidos en nuestra investigación no concuerdan del todo con los de Alsibai y colaboradores, ya que para el caso particular de p15-INK4B, su expresión no va en correlación con los demás elementos del *locus*. Por lo tanto, la presencia de E2-VP16 parecería no estar afectando las funciones en cis o trans de este RNAinc.

En el 2018 Ying Gan y colaboradores publicaron un trabajo, en el cual evidencian un mecanismo de regulación del *locus* CDKN2A/B, en diversas líneas celulares que responde a metilación de DNA. Con ayuda de la base de datos “Enciclopedia de líneas celulares de cáncer Broad-Novartis” y por medio de cromatografía líquida de alta resolución, analizaron el metiloma del *locus* CDKN2A/B en doce líneas celulares humanas de diferentes estirpes celulares, encontrando que la metilación del promotor p16 en sí mismo, pero no la regulación negativa del transcrito de p16, conduce a la represión transcripcional de ANRIL (Gan et al., 2018). Al encontrar nosotros una correlación positiva entre la expresión de ANRIL y p16<sup>INK4A</sup>, creemos que el mecanismo propuesto por Gan y colaboradores es el que E2-VP16 podría estar afectando en el *locus* CDKN2A/B.

En el análisis *in silico* de predicción de islas CpG del gen CDKN2A, se encontró una región rica en dinucleótidos CpG de una longitud de 362pb que se ubica a 289 pb upstream y 73pb downstream del TSS de p16<sup>INK4A</sup>. La isla CpG anteriormente mencionada es una excelente candidata para análisis, ya que engloba el promotor de

INK4A y como lo reporta Gan y colaboradores en el 2018, el estatus de metilación del promotor de p16 afecta la transcripción de ANRIL.

Lamentablemente, en este trabajo no se realizó el análisis de metilación del *locus* CDKN2A/B, pero de acuerdo con nuestros resultados, sí la presencia de E2-VPH16 está afectando la transcripción del *locus*, la regulación por metilación del promotor de p16<sup>INK4A</sup> sería muy posiblemente el mecanismo candidato a evaluar, para definir con certeza la manera en que E2-VPH16 afecta este *locus*. En 2012 Leonard, Wei y colaboradores transfectaron queratinocitos primarios de prepucio humano con el genoma completo de VPH-16 (en su estado episomal), dicho estado fue comprobado mediante la evaluación de la integridad del gen E2 y posteriormente realizaron un análisis de metilación del genoma mediante microarreglos, reportando 5607 regiones con incremento de metilación del DNA y 3568 con un decremento. Interesantemente, entre los genes que evaluaron por qPCR para corroborar sus datos se encuentra CDKN2A y se reporta una expresión al alta en la presencia de VPH16 en forma episomal (Leonard et al., 2012).

Un dato importante a resaltar es que en 2018 Carestiatto y colaboradores, establecieron que el estatus de metilación de p16<sup>INK4A</sup> es independiente del grado de lesión por VPH, es decir que desde etapas tempranas de la infección, el estatus de metilación del promotor se ve afectado (Carestiatto, Amaro-Filho, Moreira, & Cavalcanti, 2018), lo que sugiere una potencial participación de E2.

#### E2-VPH16 no afecta la transcripción de p15 INK4B

Como se ha mencionado, el gen CDKN2B codifica para p15<sup>INK4B</sup>, que es un supresor tumoral que tiene la misma función que p16<sup>INK4A</sup>. Nosotros reportamos que la presencia de E2-VPH16 no afecta de manera significativa la transcripción de INK4B, ya que solo pudo observarse una ligera tendencia de regulación negativa, pero sin significancia estadística.

La represión transcripcional de p15<sup>INK4B</sup> está asociada con la función en trans de ANRIL, ya que se ha demostrado que este RNAInc lo regula mediante el reclutamiento de las PcG. Interesantemente, mientras que el silenciamiento de ANRIL aumenta

fuertemente la expresión de INK4B, no afecta significativamente la transcripción de INK4A y ARF (Kotake et al., 2011).

El silenciamiento de INK4B, es natural en condiciones normales, ya que solo se activa en procesos de senescencia celular, o cuando p16<sup>INK4A</sup> no puede realizar su función. Aunque la presencia de E2-VPH16 suele favorecer la senescencia celular, se puede descartar que dicho proceso sea llevado a cabo mediante la activación de p15<sup>INK4B</sup>, ya que la expresión de E2-VPH16 no parece inducir un cambio importante en la transcripción de este gen. (Jie et al., 2015)

### Mecanismos de regulación del *locus* CDKN2A/B que pueden ser afectados por la presencia de E2-VPH 16

ANRIL es transcrito a partir de la hebra antisentido del gen CDKN2B y comparte un promotor bidireccional con p14<sup>ARF</sup>. En nuestros resultados encontramos que la expresión de p14<sup>ARF</sup> y ANRIL se ven sobre reguladas, en presencia de E2-VPH16 de manera significativa. p14ARF contiene tres sitios de respuesta a E2F1, que es un factor de transcripción involucrado en la progresión del ciclo celular. En 2010 Sato y colaboradores reportaron que ANRIL se ve afectado cuando E2F1 interactúa con los sitios de respuesta de p14<sup>ARF</sup>, denotando una expresión concomitante de ambos productos génicos (Sato, Nakagawa, Tajima, Yoshida, & Inoue, 2010). Este mecanismo podría ser afectado de manera directa o indirecta por la presencia de E2, ya que se sabe que E2 puede afectar la función, mediante la interacción con diversos factores de transcripción del genoma del huésped.

La metilación del promotor p16<sup>INK4A</sup>, está ligada a una alta tasa de error de la polimerasa cerca del TSS, debido a la fuerte susceptibilidad de la región a sufrir daño en el DNA (Tramontano et al., 2020). Es por lo que, la presencia de E2-VPH16 podría estar favoreciendo cambios en el perfil de metilación, debido a que este favoreciendo mutaciones puntuales en sitios cercanos al TSS de p16<sup>INK4A</sup>.

La metilación del DNA no es el único mecanismo de regulación epigenética que E2-VPH16 podría estar modificando, ya que, se ha comprobado que ANRIL funciona como andamiaje para reclutar a las PcG, que favorecen la represión transcripcional en

*cis* por medio de H3K27me3 y así mismo, se demostró que puede reclutar a las acetiltransferasas de histona WDR5, KAT2A y HDAC3 (Chengxin Zhang et al., 2020), favoreciendo así marcas de activación transcripcional. En el trabajo experimental de León Barrera, se denoto que la presencia de E2-VPH16 regula negativamente a EZH2 y a KAT2A, lo que podría ser evidencia de que E2-VPH16 no está favoreciendo la función de andamiaje de ANRIL, para reclutar a reguladores epigenéticos, tanto en *cis* como en *trans* (BARRERA, 2019).

Ramírez Salazar y colaboradores postularon a la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, como la vía de señalización con más genes afectados por la presencia de E2-VPH16, en células C33A. Se sabe que esta vía controla la pluripotencia de células madre mesenquimales (mESC) a través del efector de Wnt Tcf3, y en 2017, De Jaime-Soguero y colaboradores demostraron que esta vía de señalización controla el ciclo celular de las mESC, mediante el efector Tcf1, que activa la transcripción del *locus* CDKN2A/B de manera dependiente de Wnt (De Jaime-Soguero et al., 2017). Este mecanismo de regulación podría ser el afectado, motivo por el cual se está dando una sobreexpresión en los elementos del *locus* CDKN2A/B.

Se necesita un análisis más completo, que incluya el estudio del estatus de metilación de las regiones cercanas a los TSS del *locus*, entre otros experimentos que ayudarían a esclarecer la regulación que E2-VPH16 incide en el *locus* INK4/ARF y poder concluir algo más puntual, ya que hasta el momento solo se puede decir con certeza que E2-VPH16 favorece la transcripción de ARF, INK4A y de ANRIL. La represión instaurada en INK4B por las PcG no se ve afectada por la presencia de E2-VPH16.

## IX. Conclusiones

Encontramos que en células C-33A, la presencia de E2-VPH16 regula positivamente y de manera significativa al gen CDKN2A que codifica para p16<sup>INK4A</sup> y p14<sup>ARF</sup>, información corroborada mediante en la bibliografía. También se demostró que P16<sup>INK4A</sup> no solo se ve regulado positivamente a nivel transcripcional, sino también a nivel proteico.

No se encontró que E2-VPH16 afectara la expresión de p15<sup>INK4B</sup> de manera significativa, por lo tanto, E2-VPH16 no está involucrado en la vía de senescencia celular mediada por p15<sup>INK4B</sup>.

E2-VPH16 regula positivamente a el RNAinc ANRIL, al mismo tiempo que regula positivamente a p16<sup>INK4A</sup> y p14<sup>ARF</sup> en células C-33A-E216.

Existe una correlación positiva entre la expresión de ANRIL y p16<sup>INK4A</sup>, además se encontró una isla CpG de 362 pb que engloba el TSS de INK4A, sugiriendo que E2-VPH16, afecta el patrón de metilación del promotor de p16<sup>INK4A</sup> favoreciendo la desmetilación de este.



## X. Perspectivas

- ✓ Analizar el estatus de metilación de la isla CpG de 362pb que engloba el TSS de p16-INK4A.
- ✓ Realizar inmunoprecipitaciones de cromatina para los factores de transcripción tcf1, tcf3, E2F1, CTCF y ZNF304, para determinar si están ejerciendo su función sobre el *locus* CDKN2A/B.
- ✓ Establecer un sistema de silenciamiento de ANRIL y evaluar a los elementos del *locus*, para establecer si la represión de INK4B, se ve afectada por la ausencia de ANRIL en células C-33A-E216.
- ✓ Generar un sistema de expresión controlada de E2-VPH16, para lograr determinar si E2 está induciendo cambios epigenéticos, a pesar de que su expresión se haya perdido.

## XI. Bibliografía

- Achour, C., & Aguilo, F. (2018). Long non-coding RNA and Polycomb: an intricate partnership in cancer biology. *23*(11), 2106-2132. doi:10.2741/4693
- Achour, C., & Aguilo, F. (2018). Long non-coding RNA and Polycomb: an intricate partnership in cancer biology. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *23*, 2106-2132. doi:10.2741/4693
- Auersperg, N., & Hawryluk, A. P. (1962). Chromosome observations on three epithelial-cell cultures derived from carcinomas of the human cervix. *J Natl Cancer Inst*, *28*, 605-627.
- Bahrami, A., Hassanian, S. M., Khazaei, M., Gharib, M., Rahmani, M., Fiuji, H., . . . Avan, A. (2018). The 9p21 locus as a potential therapeutic target and prognostic marker in colorectal cancer. *Pharmacogenomics*, *19*(5), 463-474. doi:10.2217/pgs-2017-0096
- BARRERA, K. I. D. L. (2019). *Análisis de la participación de la proteína E2 de HPV16 en la regulación de la maquinaria epigenética*. (Master), CINVESTAV, CD.MX.
- Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., & de Villiers, E. M. . (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, *401*(1), 70-79. doi:https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002
- Blakaj DM, F.-F. N., Chen Z., Hegde R., Fiser A., Burk RD, Brenowitz M. . (2009). Relaciones evolutivas y biofísicas entre las proteínas del virus del papiloma E2. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, *14*, 900-917. doi:https://doi.org/10.2741/3285
- Cáceres-Durán, M., Ribeiro-Dos-Santos, Â., & Vidal, A. F. (2020). Roles and Mechanisms of the Long Noncoding RNAs in Cervical Cancer. *Int J Mol Sci*, *21*(24). doi:10.3390/ijms21249742
- Carestiato, F. N., Amaro-Filho, S. M., Moreira, M. A. M., & Cavalcanti, S. M. B. (2018). Methylation of p16 ink4a promoter is independent of human papillomavirus DNA physical state: a comparison between cervical pre-neoplastic and neoplastic samples. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *114*, e180456-e180456. doi:10.1590/0074-02760180456
- Centeno, F. R.-S., E. García-Villa, E. Gariglio, P. Garrido, E. (2008). TAF1 Interacts with and Modulates Human Papillomavirus 16 E2-Dependent Transcriptional Regulation. *Intervirolgy*, *51*(2), 137-143. doi:10.1159/000141706
- Cha, S., & Seo, T. (2011). hSNF5 is required for human papillomavirus E2-driven transcriptional activation and DNA replication. *Intervirolgy*, *54*(2), 66-77. doi:10.1159/000318871
- Chalertpet, K., Pakdechaidan, W., Patel, V., Mutirangura, A., & Yanatatsaneejit, P. (2015). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein mediates CCNA1 promoter methylation. *106*(10), 1333-1340. doi:https://doi.org/10.1111/cas.12761
- Congrains, A., Kamide, K., Ohishi, M., & Rakugi, H. (2013). ANRIL: molecular mechanisms and implications in human health. *Int J Mol Sci*, *14*(1), 1278-1292. doi:10.3390/ijms14011278
- De Jaime-Soguero, A., Aulicino, F., Ertaylan, G., Griego, A., Cerrato, A., Tallam, A., . . . Lluís, F. (2017). Wnt/Tcf1 pathway restricts embryonic stem cell cycle through activation of

- the Ink4/Arf locus. *PLoS genetics*, 13(3), e1006682-e1006682. doi:10.1371/journal.pgen.1006682
- DeSmet Marsha, J. L., Isaq Nasro, Androphy Elliot J. (2019). Phosphorylation of a Conserved Tyrosine in the Papillomavirus E2 Protein Regulates Brd4 Binding and Viral Replication. 93(10), e01801-01818. doi:10.1128/JVI.01801-18 %J Journal of Virology
- Drak Alsibai, K., Vacher, S., Meseure, D., Nicolas, A., Lae, M., Schnitzler, A., . . . Bieche, I. (2019). High Positive Correlations between ANRIL and p16-CDKN2A/p15-CDKN2B/p14-ARF Gene Cluster Overexpression in Multi-Tumor Types Suggest Deregulated Activation of an ANRIL-ARF Bidirectional Promoter. *Noncoding RNA*, 5(3). doi:10.3390/ncrna5030044
- Egawa N, E. K., Griffin H, Doorbar J. . (2015). Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*, 7, 3863–3890. doi:https://doi.org/10.3390/v7072802
- Eileen M. Burd, C. L. D. (2015). Human Papillomavirus. *Microbiology Spectrum*, 4(4). doi:10.1128/microbiolspec.DMIH2-0001-2015
- Evans, M. R., James, C. D., Bristol, M. L., Nulton, T. J., Wang, X., Kaur, N., . . . Morgan, I. M. (2019). Human Papillomavirus 16 E2 Regulates Keratinocyte Gene Expression Relevant to Cancer and the Viral Life Cycle. *Journal of virology*, 93(4), e01941-01918. doi:10.1128/JVI.01941-18
- Ezhkova, E., Pasolli, H. A., Parker, J. S., Stokes, N., Su, I. h., Hannon, G., . . . Fuchs, E. (2009). Ezh2 Orchestrates Gene Expression for the Stepwise Differentiation of Tissue-Specific Stem Cells. *Cell*, 136(6), 1122-1135. doi:10.1016/j.cell.2008.12.043
- Gan, Y., Ma, W., Wang, X., Qiao, J., Zhang, B., Cui, C., . . . Deng, D. (2018). Coordinated transcription of ANRIL and P16 genes is silenced by P16 DNA methylation. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*, 30(1), 93-103. doi:10.21147/j.issn.1000-9604.2018.01.10
- Gauson, E. J., Windle, B., Donaldson, M. M., Caffarel, M. M., Dornan, E. S., Coleman, N., . . . Morgan, I. M. (2014). Regulation of human genome expression and RNA splicing by human papillomavirus 16 E2 protein. *Virology*, 468-470, 10-18. doi:10.1016/j.virol.2014.07.022
- Gonzalez-Zulueta, M., Bender, C. M., Yang, A. S., Nguyen, T., Beart, R. W., Van Tornout, J. M., & Jones, P. A. (1995). Methylation of the 5' CpG Island of the <em>p16/CDKN2</em> Tumor Suppressor Gene in Normal and Transformed Human Tissues Correlates with Gene Silencing. 55(20), 4531-4535.
- Hawley-Nelson P., A. E. J., Lowy D. R., Schiller J. T. . (1988). The specific DNA recognition sequence of the bovine papillomavirus E2 protein is an E2-dependent enhancer. . *The EMBO journal*, 7(2), 525-553.
- Hirosue, A., Ishihara, K., Tokunaga, K., Watanabe, T., Saitoh, N., Nakamoto, M., . . . Nakao, M. (2012). Quantitative assessment of higher-order chromatin structure of the INK4/ARF locus in human senescent cells. 11(3), 553-556. doi:https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00809.x
- Jang, M. K., Anderson D. Eric, van Doorslaer Koenraad, & McBride, A. A. (2015). A proteomic approach to discover and compare interacting partners of papillomavirus E2

- proteins from diverse phylogenetic groups. *Proteomics*, 15(12), 2038-2050. doi:10.1002/pmic.201400613
- Jie, B., Weilong, C., Ming, C., Fei, X., Xinghua, L., Junhua, C., . . . Xiaoming, S. (2015). Enhancer of zeste homolog 2 depletion induces cellular senescence via histone demethylation along the INK4/ARF locus. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 65, 104-112. doi:https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.05.011
- Johannsen E., L. P. F. (2013). Epigenetics of human papillomaviruses. . *Virology*, 445(1-2), 205–212. doi: https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.016
- Kong, Y., Hsieh, C. H., & Alonso, L. C. (2018). ANRIL: A lncRNA at the CDKN2A/B Locus With Roles in Cancer and Metabolic Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 405. doi:10.3389/fendo.2018.00405
- Kotake, Y., Nakagawa, T., Kitagawa, K., Suzuki, S., Liu, N., Kitagawa, M., & Xiong, Y. (2011). Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene*, 30(16), 1956-1962. doi:10.1038/onc.2010.568
- Krimpenfort, P., Ijpenberg, A., Song, J.-Y., van der Valk, M., Nawijn, M., Zevenhoven, J., & Berns, A. (2007). p15Ink4b is a critical tumour suppressor in the absence of p16Ink4a. *Nature*, 448(7156), 943-946. doi:10.1038/nature06084
- Lee A. Y., C. C. M. (2009). Chromatin adaptor Brd4 modulates E2 transcription activity and protein stability. *The Journal of biological chemistry*, 284(5), 2778-2786. doi:doi.org/10.1074/jbc.M805835200
- Leonard, S. M., Wei, W., Collins, S. I., Pereira, M., Diyaf, A., Constandinou-Williams, C., . . . Woodman, C. B. (2012). Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. *Carcinogenesis*, 33(7), 1286-1293. doi:10.1093/carcin/bgs157
- Mallory E. Harden, K. M. (2017). Human papillomavirus molecular biology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 722, 3-12. doi:https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.07.002
- Muller M., D. C. (2012). The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions: A Complex Hijacking of the Cellular Network. *The open virology journal*, 6, 173–189. . doi:https://doi.org/10.2174/18743579012060101732
- Ramírez-Salazar, E., Centeno, F., Nieto, K., Valencia-Hernández, A., Salcedo, M., & Garrido, E. (2011). HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. *Virology journal*, 8, 247-247. doi:10.1186/1743-422X-8-247
- Rehtanz, M., Schmidt, H.-M., Warthorst, U., & Steger, G. (2004). Direct interaction between nucleosome assembly protein 1 and the papillomavirus E2 proteins involved in activation of transcription. *Molecular and cellular biology*, 24(5), 2153-2168. doi:10.1128/mcb.24.5.2153-2168.2004
- Rivandi, M., Khorrami, M. S., Fiuji, H., Shahidsales, S., Hasanzadeh, M., Jazayeri, M. H., . . . Avan, A. (2018). The 9p21 locus: A potential therapeutic target and prognostic marker in breast cancer. *J Cell Physiol*, 233(7), 5170-5179. doi:10.1002/jcp.26332

- Robinson, A. K., Leal, B. Z., Chadwell, L. V., Wang, R., Ilangoan, U., Kaur, Y., . . . Kim, C. A. (2012). The growth-suppressive function of the polycomb group protein polyhomeotic is mediated by polymerization of its sterile alpha motif (SAM) domain. *The Journal of biological chemistry*, 287(12), 8702-8713. doi:10.1074/jbc.M111.336115
- Ruiz, P. A., Ponce, E. C. L., & Ávila, M. H. (2005). *Cáncer Cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control. (Incluye Cd-rom) (2 ed.)*. México.: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Sato, K., Nakagawa, H., Tajima, A., Yoshida, K., & Inoue, I. (2010). ANRIL is implicated in the regulation of nucleus and potential transcriptional target of E2F1. *Oncol Rep*, 24(3), 701-707. doi:10.3892/or\_00000910
- Schuettengruber, B., Bourbon, H.-M., Di Croce, L., & Cavalli, G. (2017). Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell*, 171(1), 34-57. doi:10.1016/j.cell.2017.08.002
- Serra, R. W., Fang, M., Park, S. M., Hutchinson, L., & Green, M. R. (2014). A KRAS-directed transcriptional silencing pathway that mediates the CpG island methylator phenotype. *eLife*, 3, e02313-e02313. doi:10.7554/eLife.02313
- Sherr, C. J. (2012). Ink4-Arf locus in cancer and aging. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 1(5), 731-741. doi:10.1002/wdev.40
- Sunthamala, N., Pang, C. L., Thierry, F., Teissier, S., Pientong, C., & Ekalaksananan, T. (2014). Genome-wide analysis of high risk human papillomavirus E2 proteins in human primary keratinocytes. *Genomics data*, 2, 147-149. doi:10.1016/j.gdata.2014.06.013
- Tramontano, A., Boffo, F. L., Russo, G., De Rosa, M., Iodice, I., & Pezone, A. (2020). Methylation of the Suppressor Gene p16INK4a: Mechanism and Consequences. *10(3)*, 446.
- Tsin-Wah, L., S., L. S., C.Y., L. R., M.Y., C. M., N.Y., C. A., & Y.S., N. H. (2015). HPV 16 E2 binding sites 1 and 2 become more methylated than E2 binding site 4 during cervical carcinogenesis. *87(6)*, 1022-1033. doi:10.1002/jmv.24129
- Tyler, E. J., Gutierrez Del Arroyo, A., Hughes, B. K., Wallis, R., Garbe, J. C., Stampfer, M. R., . . . Bishop, C. L. (2021). Early growth response 2 (EGR2) is a novel regulator of the senescence programme. *Aging Cell*, 20(3), e13318. doi:10.1111/accel.13318
- Võsa, L., Sudakov, A., Remm, M., Ustav, M., & Kurg, R. (2012). Identification and analysis of papillomavirus E2 protein binding sites in the human genome. *Journal of virology*, 86(1), 348-357. doi:10.1128/jvi.05606-11
- Yajid AI, Z. M., Mat Zin AA y Othman NH. . (2017). Potential Role of E4 Protein in Human Papillomavirus Screening: a Review. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 18(2), 315-319. doi:https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.2.315
- Yap, K. L., Li, S., Muñoz-Cabello, A. M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., . . . Zhou, M. M. (2010). Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell*, 38(5), 662-674. doi:10.1016/j.molcel.2010.03.021

- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *13*, 134. doi:10.1186/1471-2105-13-134
- Yim E. K., P. J. S. (2005). The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. . *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association*, *37*(6), 319-324. doi:https://doi.org/10.4143/crt.2005.37.6.319
- Zhang, C., Ge, S., Gong, W., Xu, J., Guo, Z., Liu, Z., . . . Ge, S. (2020). LncRNA ANRIL acts as a modular scaffold of WDR5 and HDAC3 complexes and promotes alteration of the vascular smooth muscle cell phenotype. *Cell Death Dis*, *11*(6), 435. doi:10.1038/s41419-020-2645-3
- Zhang, C., Ge, S., Gong, W., Xu, J., Guo, Z., Liu, Z., . . . Ge, S. (2020). LncRNA ANRIL acts as a modular scaffold of WDR5 and HDAC3 complexes and promotes alteration of the vascular smooth muscle cell phenotype. *Cell Death Dis*, *11*(6), 435-435. doi:10.1038/s41419-020-2645-3
- Zhi-Ming Zheng, C. C. B. (2006). PAPILOMAVIRUS GENOME STRUCTURE, EXPRESSION, AND POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, *11*, 2286-2302. doi:https://doi.org/10.2741/1971