



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

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“Análisis del efecto de la inactivación funcional de la proteína TAF1 sobre
la expresión génica inducida por E2 de VPH16 en células C-33A”

TESIS

Que presenta

Q.F.B. PATRICIA ELIZABETH ALVAREZ ORTIZ

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

Ciudad de México

Noviembre, 2021

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 llevarla a cabo, con número de CVU **998389**.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca para realizar mis estudios de posgrado.

Al CINVESTAV, en especial al departamento de Genética y Biología Molecular por mi formación académica.

Al Laboratorio 1 de Investigación en Biología Molecular y Celular del Cáncer, en especial al Dr. Efraín Garrido por compartir su conocimiento, tiempo, pláticas y su confianza.

A mis asesores el Dr. Bulmaro Cisneros y el Dr. Glustein Pozo por su apoyo y tiempo dedicado al proyecto.

A mis compañeros del laboratorio: en especial a Lili Diaz y al Biólogo Pedro Chávez por las enseñanzas impartidas.

A mis amigos de siempre y de todos lados, por ser un soporte en cada nuevo escalón.

A mi hermana Wendy, por cuestionarme y hacerme aprender.

A mi novio Héctor David por incitarme a ser mejor persona y por todo su amor.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis papás Patricia Ortiz y David Alvarez por su apoyo y amor incondicional en cualquier meta que me he propuesto.

A mis abuelos Hortencia y Francisco por incitar mi curiosidad.

A todos los maestros y profesores que han impactado positivamente en mi educación, ideales, objetivos y perspectivas de vida.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	8
1.1	Generalidades del desarrollo del cáncer y epidemiología	8
1.2	Cáncer cervicouterino	9
1.3	Virus del papiloma humano.....	9
1.4	Proteína viral E2	11
1.5	Ciclo celular	13
1.6	Proteína celular TAF1	15
1.7	Apigenina como regulador de TAF1	18
II.	ANTECEDENTES	19
2.1	E2 como regulador de procesos y genes celulares.....	19
2.2	Interacción de TAF1 y E2	20
2.3	Efectos de la interacción TAF1-E2	21
III.	JUSTIFICACIÓN	24
IV.	HIPÓTESIS	25
V.	OBJETIVO GENERAL	25
VI.	OBJETIVOS PARTICULARES	25
6.1	Seleccionar los genes dependientes de TAF1 y regulados por E2 para evaluar <i>in silico</i> y experimentalmente.....	25
6.2	Analizar la existencia de la secuencia E2BS en los promotores de los genes seleccionados para determinar la unión directa de E2.	25
6.3	Analizar el promotor de los genes seleccionados para determinar la unión de TAF1.	25

6.4	Determinar la concentración ideal de Apigenina para reducir la actividad quinasa de TAF1.	25
6.5	Reducir la actividad quinasa de la proteína TAF1 utilizando un agente farmacológico (Apigenina).	25
6.6	Evaluar la diferencia cuantitativa en la expresión de los genes seleccionados entre células C-33A WT, C-33A E216, y sus respectivos tratamientos con Apigenina (TAF1 disfuncional).....	25
VII.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y MATERIALES	26
7.1	Cultivo de células C-33A WT y C-33A-E216.	27
7.2	Comprobación de la expresión de E2.....	27
7.3	Ensayo de viabilidad en células C-33A y C-33A-E216 tratadas con Apigenina. 28	
7.4	Tratamiento a células C-33A WT y C-33A-E216 con Apigenina.....	28
7.5	Extracción de proteínas totales de C-33A WT y C-33A-E216.	29
7.6	Western Blot de P53 fosforilada.	29
7.7	Lisis celular y extracción de RNA.....	30
7.8	Síntesis de cDNA.....	31
7.9	PCR en tiempo real.....	31
VIII.	RESULTADOS	33
8.1	Un grupo de genes regulados por E2 son directamente dependientes de TAF1. 33	
8.1.1	<i>Selección de genes para analizar</i>	33
8.1.2	<i>Determinación de un posible mecanismo de regulación directa por parte de E2, en los promotores de los genes evaluados</i>	34
8.1.3	<i>Potencial regulación de los promotores génicos evaluados, por TAF1.</i> 36	

8.2	La Apigenina reduce la actividad quinasa de TAF1.	38
8.2.1	<i>Efecto de la Apigenina sobre la viabilidad celular.</i>	38
8.2.2	<i>Detección de P53 fosforilada.</i>	41
8.3	E2 modifica la expresión de genes celulares de forma dependiente de TAF1.	46
IX.	DISCUSIÓN	50
9.1	<i>Análisis de la selección de genes TAF1-dependientes, modificados por E2.</i>	50
9.2	<i>Modificación de la expresión génica de forma indirecta por parte de E2.</i>	51
9.3	<i>Regulación de los promotores de los genes evaluados por TAF1</i>	52
9.4	<i>Análisis del efecto distintivo de la Apigenina sobre la viabilidad celular en células en presencia y ausencia de E2 de VPH16.</i>	52
9.5	<i>Análisis de la reducción de la actividad quinasa de TAF1: reducción de P53 fosforilada</i>	54
9.6	<i>Análisis de la reducción de la actividad quinasa de TAF1: disminución de la expresión de ciclinas D y A.</i>	55
9.7	<i>Análisis de la modificación de la expresión génica por E2, dependiente de TAF1.</i>	55
X.	CONCLUSIONES	59
XI.	PERSPECTIVAS	59
XII.	BIBLIOGRAFÍA	60

RESUMEN

E2 de VPH es una proteína viral que tiene efectos sobre la expresión génica de la célula huésped a través de su interacción con proteínas y factores celulares; uno de ellos, el factor de transcripción TAF1 es esencial para la progresión del ciclo celular y puede activar a promotores de numerosos genes a través de su actividad quinasa. Previamente se ha demostrado que E2 puede unirse con alta afinidad al extremo N-terminal de TAF1 (donde se sitúa uno de los dominios quinasa), y que puede modificar la unión de este factor celular a promotores de genes TAF1-dependientes, afectando su expresión; sin embargo, aún se desconoce si la actividad quinasa de TAF1 es requerida por E2 para realizar sus funciones. En el presente estudio se realizaron una serie de análisis a través de herramientas bioinformáticas con los cuales se determinaron genes diana cuya transcripción depende de TAF1 y su expresión se modifica en presencia de E2. Este grupo de genes fue evaluado a través de RT-qPCR en dos microambientes celulares: uno con TAF1 funcional y otro con TAF1 disfuncional, el cual se consiguió por medio de un tratamiento farmacológico con Apigenina, con el cual se redujo la actividad quinasa de TAF1. El análisis se realizó en dos modelos celulares: C-33A-WT y C-33A-E216. Los resultados indicaron que E2 regula la expresión de genes implicados en procesos como reacción al estrés, muerte celular y progresión del ciclo celular, con un patrón distinto cuando TAF1 está activo en comparación a cuando se encuentra inactivo en ambas líneas celulares. Estos datos revelan que E2 requiere de la actividad cinasa de TAF1 para modificar la expresión de algunos genes, lo que contribuye en el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales E2 regula procesos celulares durante el ciclo viral.

ABSTRACT

E2 from human papillomavirus is a viral protein that has effects on host cell gene expression through its interaction with cellular proteins and factors; one of these, the transcription factor TAF1, is essential for cell cycle progression and can activate promoters of numerous genes through its kinase activity. It has previously been shown that E2 can bind with high affinity to the N-terminal end of TAF1 (where one of the kinase domains is located), and that it can modify the binding of this cellular factor to TAF1-dependent gene promoters, affecting their expression; however, it is still unknown whether the kinase activity of TAF1 is required by E2 to perform its functions. In the present study, a bioinformatics analysis were performed to determine target genes whose transcription depends on TAF1 and whose expression is modified in the presence of E2. This group of genes was evaluated through RT-qPCR in two cellular microenvironments: one with functional TAF1 and the other with dysfunctional TAF1, which was achieved by pharmacological treatment with Apigenin, which reduced the kinase activity of TAF1. The analysis was performed in two cell lines: C-33A-WT and C-33A-E216. The results indicated that E2 regulates the expression of genes involved in processes such as stress response, cell death and cell cycle progression, with a distinct pattern when TAF1 is active compared to when it is inactive in both cell lines. These data reveal that E2 requires the kinase activity of TAF1 to modify the expression of some genes, which contributes to the understanding of the mechanisms by which E2 regulates cellular processes during the viral cycle.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del desarrollo del cáncer y epidemiología.

El cáncer es un proceso multietapa que se origina cuando una célula pierde el control sobre la regulación del ciclo celular que puede resultar en el desarrollo de una patología (American Cancer Society, 2016). Actualmente, el estudio del cáncer es ampliamente abordado debido a que se sitúa como la segunda causa de muerte a nivel mundial (Organización mundial de la salud, 2021). El cáncer puede originarse casi en cualquier célula del cuerpo debido a cambios mutagénicos que le confieren características anormales como el crecimiento y proliferación celular acelerados, la evasión de procesos apoptóticos y la desregulación de la diferenciación (Alberts, 2010). Esta transformación se lleva a cabo generalmente debido a que la actividad de oncogenes y supresores de tumor se ve afectada por los cambios en el genoma (Stratton et al., 2009). En 2020 la Organización mundial de la Salud (OMS) estimó 19.2 millones de casos nuevos en todo el mundo, así mismo, en México se estimaron durante 2020, un total de 195 499 nuevos casos, entre los cuales destacan las neoplasias en mama, próstata y tejido colorrectal. Específicamente, en mujeres los tipos de cáncer con mayor incidencia fueron mama, cáncer cervicouterino y tiroides (Figura 1).

Estimated number of new cases in 2020, Mexico, females, all ages

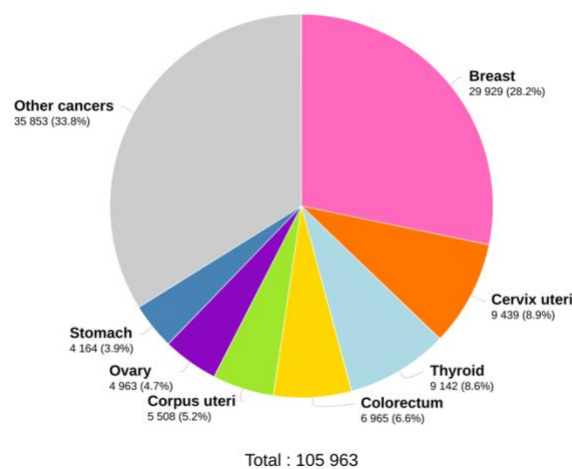


Figura 1. Número de casos nuevos en 2020 en mujeres mexicanas de todas las edades. GLOBOCAN, 2020

1.2 Cáncer cervicouterino

Las infecciones oncogénicas ocasionadas por virus originan el 25% de los casos de cáncer en países de ingresos medios y bajos (OMS, 2018). Particularmente, el cáncer cervicouterino se desarrolla debido a una infección persistente por alguno de los virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo que se propagan en las células del epitelio basal que recubren al cérvix (Hausen, 2009). La principal vía de transmisión del VPH es el contacto sexual y la mayoría de las lesiones no genitales en la piel son verrugas causadas por la hiperplasia de las células epiteliales (Cobo, 2012; Leto et al., 2011). Cuando la infección se vuelve persistente los cambios en las células pueden desencadenar una neoplasia intraepitelial cervical que puede progresar hasta un carcinoma *in situ* o invasivo; sin embargo, la infección por VPH no es suficiente para el desarrollo de cáncer, factores genéticos y epigenéticos están igualmente involucrados.

1.3 Virus del papiloma humano

Los VPH pertenecen a la familia *Papillomaviridae* conformada por 133 genotipos distintos que poseen DNA de doble cadena organizado de forma circular en una cápside icosaédrica no envuelta que mide alrededor de 600 Å de diámetro (Askoy et al., 2017; Tommasino, 2013). Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (CITV) se han establecido 53 géneros definidos por la homología en la secuencia del marco de lectura abierto de la proteína L1, el principal componente de la cápside. Los VPH's que poseen un potencial oncogénico, se agrupan dentro del género *Alphapapillomavirus* (Santos et al., 2017). Este género se encuentra dividido en 2 subgrupos principales: los llamados "VPH de bajo riesgo" comúnmente encontrados en lesiones orales, laríngeas y en verrugas genitales benignas (Miller y Stack, 2015) y los "VPH de alto riesgo" que pueden llegar a desarrollar neoplasias cervicales intraepiteliales y tumores cancerígenos. En este grupo se encuentran los VPH's tipo 18 y 16 siendo éste último el causante de aproximadamente 50% de los casos de cáncer cervicouterino (Yin et al., 2017; Muñoz et al., 2003).

El genoma del VPH mide alrededor de 8 kb y se encuentra dispuesto de forma episomal durante las primeras fases de la infección, no obstante, puede integrarse en el genoma de la célula huésped cuando está terminalmente diferenciada (Hausen, 2002); la organización genómica del VPH 16, compartida entre la familia *Papillomaviridae*, se muestra en la Figura 2.

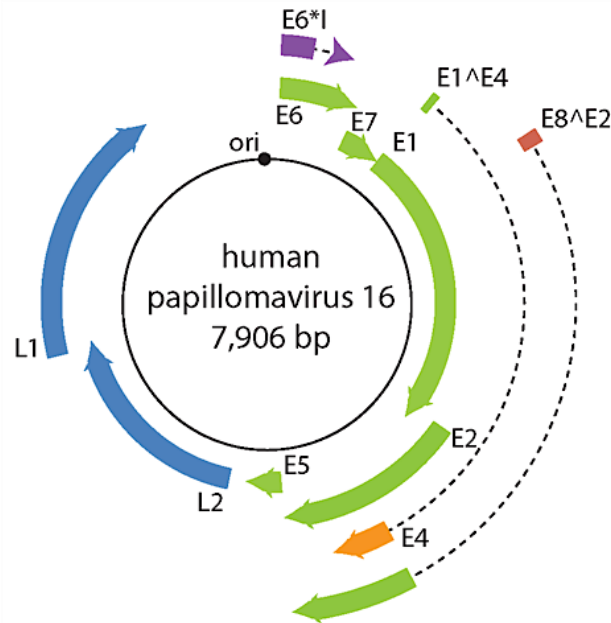


Figura 2. Organización genómica del VPH 16. Se observan en los recuadros los marcos de lectura abiertos codificantes para las proteínas de expresión temprana (E) y tardía (L), y en las líneas punteadas las secuencias intrónicas. (ICTV Report, 2021).

El genoma se distribuye en tres regiones funcionales. La región temprana en donde se encuentran 6 ORF's correspondientes a los genes que se expresan en las primeras etapas de la infección que son E1, E2 y E4 cuyos productos génicos se encuentran implicados en la regulación de la replicación y transcripción del genoma; por su parte, E1 es una helicasa de DNA y E2 es un regulador transcripcional de los oncogenes E5, E6 y E7 cuyo nivel de expresión depende del grado de diferenciación de las células epiteliales infectadas y de la integración del genoma viral al genoma celular y que además están relacionadas con la progresión del tumor; la proteína E5 promueve la proliferación celular y la persistencia del VPH; particularmente E6 promueve la proliferación celular a través de la degradación por ubiquitinación de p53; por su parte,

E7 inhibe la interacción entre el factor E2F y la proteína Rb lo que promueve la división celular. Por otro lado, se encuentra la región tardía integrada por los genes expresados en las últimas fases de la infección que son L1 y L2 cuyas proteínas son los componentes de la cápside viral además de que son requeridas para el correcto ensamblaje y empaquetamiento viral. La proteína viral L1 es el principal componente de la cápside y medía la interacción entre el virus y la membrana celular, mientras que L2 promueve la endocitosis viral. Finalmente, la región larga de control (LCR) es una región no codificante que contiene el origen de replicación viral además de secuencias que pueden ser reconocidas por factores de transcripción de la célula hospedera y del mismo virus con el fin de regular la transcripción, la amplificación viral y el tropismo celular (Harari et al., 2014; Doorslaer et al., 2018; Horvat et al., 2010; Zheng et al., 2006).

1.4 Proteína viral E2

Durante la infección viral por VPH es necesario un estricto control sobre los procesos de replicación y transcripción y mantenimiento del genoma que son ejecutados por la proteína E2, altamente conservada entre distintos miembros de la familia *Papillomaviridae* (Spalholz et al., 1985; Ustav y Stenlud, 1991).

E2 es una proteína dimérica que está conformada por tres regiones que se muestran en la Figura 3: la región carboxiterminal que es de naturaleza básica en donde se encuentra un dominio de unión al DNA (DBD), la región aminoterminal donde se localiza el dominio de transactivación (TAD) y la región llamada bisagra que es la encargada de unir a ambas regiones (Giri et al., 1988). Su longitud es de 365 aa y la masa molecular reportada es de 41.8kDa.

E2 se clasifica como una proteína de unión al DNA que reconoce específicamente la secuencia ACCGN₄CGGT que se conoce como sitio de unión a E2 (E2BS) localizado en la LCR del genoma de VPH (Androphy et al., 1987). El dominio de unión a DNA tiene homología estructural con varios factores regulatorios entre los papilomavirus este dominio contiene a los aminoácidos que hacen contacto con el DNA localizados en el

α -hélice (Muller y Demeret, 2012). Igualmente participa formando un complejo con E1 que se une con alta afinidad al origen de replicación para llevar a cabo la función de helicasa (Sedman y StenLund, 1995). Además, es un regulador transcripcional de las oncoproteínas virales E6 y E7 (Dowhanick et al., 1995).

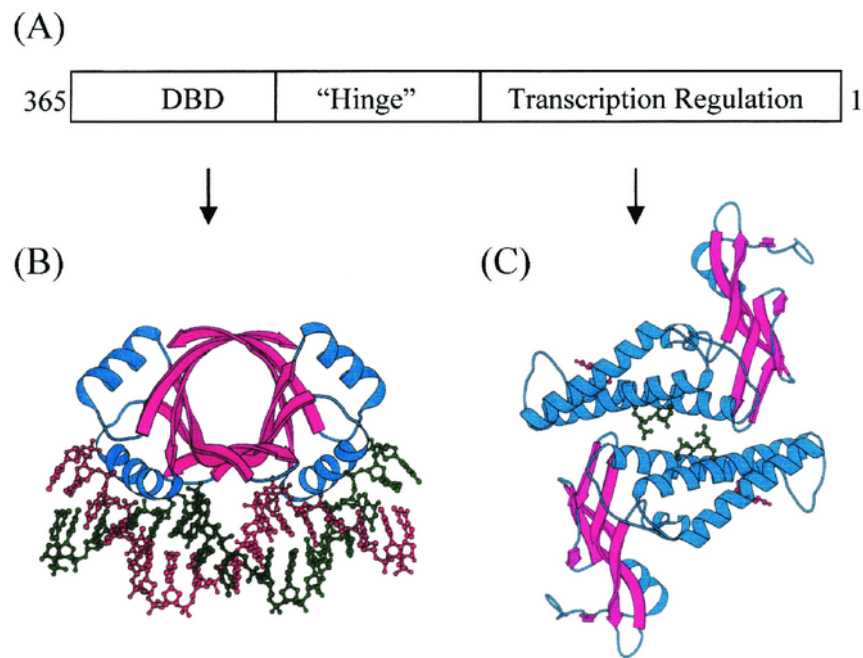


Figura 3. Dominios estructurales de E2. Se observa en A) las dos regiones principales de E2, en B) el modelo de su unión con el DNA (B) y en C) la adaptación cuando se encuentra unida a otras proteínas (Dell y Gaston, 2011).

E2 puede actuar como un activador o represor de la transcripción dependiendo de la distancia donde se une con respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS), dado que cuando se incorpora *upstream* la proteína actúa como un activador, no obstante, cuando se coloca pocas pares de base *upstream* del TSS, la proteína actúa como represor estérico debido a que impide que se unan factores de transcripción como TBP y SP1 (Bouvard et al., 1994). La afinidad de E2 sobre las regiones distales o proximales del promotor responde a la concentración de la proteína E2, debido a que en cantidades basales actúa generalmente como represor, sin embargo, cuando la cantidad es baja se une preferentemente en el sitio distal promoviendo la activación de la transcripción (Dong et al., 1994).

Así mismo, las concentraciones de E2 dependen de la etapa en la que se encuentre la infección y de la forma en la que esté dispuesto el genoma viral debido a que cuando la infección se mantiene en etapa de latencia, el genoma se encuentra en forma episomal (Ilves, et al., 1999) y la cantidad de E2 es alta por lo que los niveles de E6 y E7 permanecen bajos pues actúa como represor. Sin embargo, cuando el genoma se integra al DNA celular, se interrumpe el ORF de E2 resultando en la pérdida de la proteína, lo que incrementa la actividad transcripcional de E6 y E7 resultando en la desregularización del ciclo celular.

1.5 Ciclo celular

El ciclo celular es un proceso por el cual se regula el crecimiento, desarrollo y la proliferación celular durante el cual se llevan a cabo eventos altamente regulados que se pueden dividir en 4 fases: G₁, S y G₂ que componen a la interfase y son las de mayor duración y la fase M (Morgan, 2007; Cooper, 2000; Schafer, 1998). La fase G₁ se caracteriza por el crecimiento celular, el metabolismo activo y la preparación de enzimas y proteínas necesarias para la siguiente fase. Durante la fase S se lleva a cabo la replicación del material genético donde la célula pasa de la diploidía a la tetraploidía. La fase G₂ involucra la síntesis de proteínas requeridas para la fase M en donde finalmente se lleva a cabo la citocinesis.

La progresión de una fase a otra debe ser controlada de forma estricta por proteínas específicas llamadas quinasas dependientes de ciclinas (CDK) que poseen actividad serin/treonin quinasas que activan o desactivan a sus sustratos por fosforilación (Vermeulen, et al., 2003). Las quinasas que regulan la interfase son CDK4/CDK6, CDK2, y al final de G₂ y durante la fase M se sintetiza la CDK1 (Figura 4); éstas interactúan con 4 tipos de ciclinas que son Ciclina D, E, A y A/B respectivamente (Murray, 2004; Malumbres, 2009).

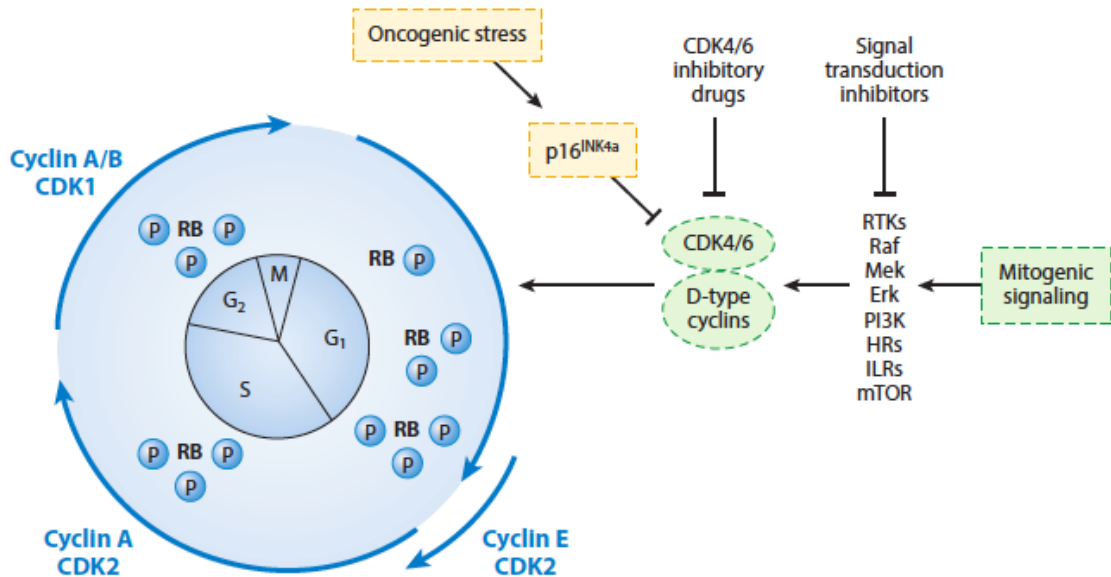


Figura 4. Dinámica del ciclo celular. Se muestran las distintas fases del ciclo celular, así como los complejos ciclina/CDKs presentes en cada transición (Sherr y Bartek, 2017).

Sin embargo, las quinasas también pueden ser bloqueadas por la unión de inhibidores de CDK (CKI) que se dividen en dos familias: el grupo de INK4 donde se encuentran las proteínas como p15, p16 y p18 que evitan la unión de las ciclinas a las quinasas. Por su parte, en la familia Cip/Kip se encuentran las proteínas p21, p27 y p57 que inactivan a los complejos de ciclina/CDK. A su vez, los CKI son controlados por señales internas o externas; un ejemplo es la proteína P53 que activa la transcripción de p21 o el TGF- β que activa la expresión de p15 y p27 (Vermeulen, 2003).

Las CDKs, ciclinas y CKI actúan durante los llamados puntos de control que son las etapas en donde se examina la integridad del genoma; cuando se reporta un daño mayor, se puede frenar la progresión del ciclo celular (Malumbres y Barbacid, 2009). Existen tres puntos de control que tienen lugar en las transiciones G1/S, S y G2/M. Las proteínas que pueden detectar los daños en el DNA son variadas y son relevantes en los estudios del cáncer. Por ejemplo, la proteína ATM se activa cuando hay rupturas en la doble cadena y actúa fosforilando a chk2 para que ésta pueda inhibir a cdc25A impidiendo así la interacción con CDK2/ciclina A, lo que frena la transición a la fase S. Así mismo, cuando el DNA se daña durante la fase de síntesis, la proteína que ejecuta

la actividad regulatoria es ATR que activa a Chk1 induciendo la degradación proteosomal de cdc25A y deteniendo el ciclo celular para que se lleve a cabo la reparación de DNA; sin embargo, cuando no puede ser reparado, la célula inicia la señalización dirigida para la activación de muerte por apoptosis (Visconti et al., 2016; Sherr y Bartek, 2017).

El análisis del ciclo celular y su relación con el cáncer va dirigido al estudio de inhibidores de ciclinas o de CDKs para lograr que las células cancerosas no proliferen descontroladamente y pueda regularse un proceso de muerte. Existen muchas moléculas de naturaleza distinta, como pueden ser los compuestos químicos aromáticos como los análogos de purina o pirimidina que han demostrado tener efectos antiproliferativos. Así mismo, otro tipo de compuestos con esta misma actividad son los de origen natural/biológico como la butirilactona proveniente de *Aspergillus* o los compuestos como flavonoides obtenidos de las plantas de las cuales se ha demostrado que poseen una actividad inhibitoria de quinasas (Vermeulen, 2003 y Sherr, 2017).

1.6 Proteína celular TAF1

TAF1 también conocido como TAFII250, es una proteína que posee actividad regulatoria sobre los genes esenciales que controlan la transición de la fase G1 a S del ciclo celular, es vital para los organismos, y se encuentra ampliamente conservado en secuencia y función. TAF1, llamado así por ser un factor asociado a TATA, es el componente principal de la subunidad TFIID que, junto a factores basales y otras proteínas, está involucrado en la formación del complejo de pre-inicio de la transcripción (PIC). El papel de TAF1 durante el proceso de transcripción es amplio; como factor de transcripción es necesario para el reconocimiento del promotor, además interactúa con TBP y con otros componentes del PIC como TFIIA y TFIIF.

La estructura de TAF1 se observa en la Figura 5; en ambos extremos N y C-terminal tienen dominios serin/treonin quinasa que pueden auto y transfosforilar a componentes de PIC y otras proteínas celulares. Adicionalmente, al dominio central

DUF3591 de TAF1 se le atribuye la actividad de HAT, necesaria para acetilar a las histonas H2A, H3 y H4 modificando la estructura de la cromatina para poder acceder al DNA; este es el dominio más conservado. Así mismo, cuenta con dos bromodominios; la longitud de la proteína es de 1878 aa y pesa 212.7 kDa (Wang et al., 2014).

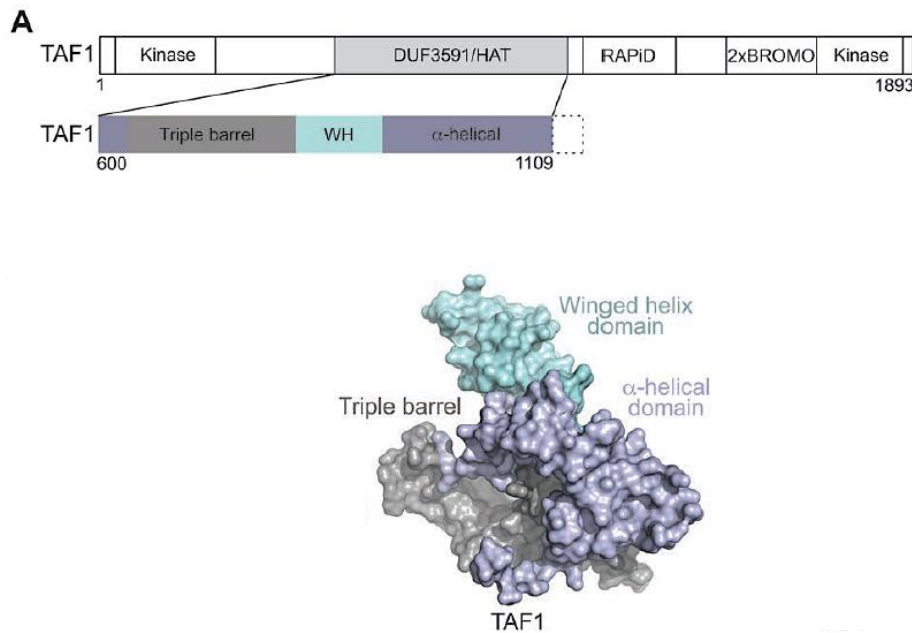


Figura 5. Organización de los fragmentos estructurales de TAF1. Wang et al., 2014

Una de las funciones de TAF1 en la regulación transcripcional es el reconocimiento del promotor debido a que al asociarse con la proteína TBP puede unirse a secuencias específicas en el DNA, lo que es uno de los primeros pasos en el ensamblaje del PIC (Verrijzer et al., 1995). Por otra parte, la interacción con proteínas como RAP74, el componente principal de TFIIIF, es importante durante la transición hacia la elongación (Disktein et al., 1996).

La función de TAF1 como regulador del ciclo celular está dado por la actividad que ejerce sobre los promotores de genes cuyos productos proteicos participan en la progresión de las fases. Específicamente, se ha visto que la actividad del dominio

quinasa N-terminal de TAF1, está involucrado en la transición de G1 a S, participando en la transcripción de genes esenciales como ciclina D1 y ciclina D3 (Kloet et al., 2012). Los niveles de transcrito de estos reguladores del ciclo celular disminuyen en las células tsBN462, que tienen una mutación en el gen codificante para TAF1 que desencadena la pérdida de la actividad de la proteína, cuando son expuestas a la temperatura de 39°C.

Además, se ha reportado que la actividad quinasa de TAF1 puede regular la expresión de ciclina A y cdc2 reclutando a factores para su transcripción y promoviendo la actividad de Cdc25 cuando se encuentra unida a ella (O'Brien y Tjian, 1998). Asimismo, TAF1 puede regular negativamente la transcripción de los inhibidores de CDK p21 y p27 y del proto-oncogen c-myc (Sekiguchi et al., 1996). Además, se ha mostrado que TAF1 puede interactuar con p53 endógena fosforilándola específicamente en la treonina 55 (T55), lo que promueve su degradación vía mdm2, ejecutando así la progresión del ciclo celular (Heng et al., 2004).

La actividad quinasa de TAF1 es además importante para que pueda realizar su función de HAT sobre los promotores de los genes que promueven el ciclo celular, esto debido a que TAF1 puede fosforilar a su regulador negativo, el factor TAF7. La fosforilación promueve la disociación de TAF7 del TFIID y permite la correcta transcripción de ciclina A y ciclina D1 (Kloet et al., 2012).

1.7 Apigenina como regulador de TAF1

La actividad quinasa de TAF1 puede verse disminuida en ciertas condiciones, por ejemplo, en las células tsBN462 que al estar en una temperatura de 39 °C se expresa la forma mutada de la proteína y las células se arrestan en la fase G1 del ciclo celular (Sekiguchi et al., 1996). Además, la actividad de TAF1 puede ser regulada de forma negativa por TAF7 endógeno, sin embargo, recientemente se ha descrito un compuesto natural al cual se le ha atribuido la capacidad de disminuir la actividad quinasa de TAF1, la apigenina (Figura 6). La apigenina es un flavonoide que se encuentra en los tejidos de las plantas y ayudan a la protección de la radiación solar, defensa contra patógenos y regulación del metabolismo. Se le atribuyen múltiples propiedades como: arresto del ciclo celular, inducción de apoptosis y actividad anti-inflamatoria (Salehi et al., 2019). Existe evidencia de que la fosforilación del residuo de T55 de p53, blanco de TAF1, disminuye cuando distintos tipos de células son tratadas con apigenina (Cai & Liu, 2008). Además, los cambios ejercidos por la apigenina sobre los genes celulares se relacionan directamente con disfunción de TAF1; por ejemplo, la expresión de reguladores positivos del ciclo celular como la ciclina D y la ciclina A disminuyen, en contraste, la expresión de los reguladores negativos del ciclo celular se ve aumentada, por ejemplo, p21, p27 y p53 (Eun Jeong & Gun-Hee, 2008).

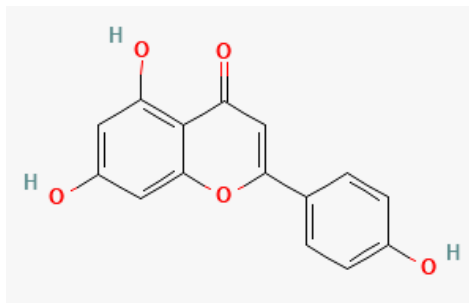


Figura 6. Estructura química de la Apigenina. Pubchem, 2021

II. ANTECEDENTES

2.1 E2 como regulador de procesos y genes celulares

Además de ser una proteína que puede regular los propios genes de VPH, se ha demostrado que E2 también puede interactuar y regular genes celulares. Específicamente, se ha estudiado el efecto que tiene sobre los genes que participan en la progresión normal del ciclo celular. En un estudio reportado por Dowhanick y colaboradores en 1995 se demostró que la inducción de la expresión de E2 en células HeLa (que poseen genomas de VPH tipo 18), resulta en el arresto del ciclo celular. Además, se analizaron los niveles de reguladores negativos del ciclo celular como p53, p21 y Rb hipofosforilada en donde se demostró que la expresión de E2 aumenta sus niveles de expresión; esta información se relaciona directamente con el análisis de la expresión de CDK2 donde se demostró que E2 reduce su expresión.

Esto coincide con las observaciones reportadas por Desaintes y colaboradores en 1997 donde muestran que la expresión transitoria de la proteína E2 puede desencadenar apoptosis en células HeLa a través de la represión de la expresión de los genes virales E6 y E7, presentes en las copias integradas de los genomas virales, y la activación transcripcional de P53, lo que conduce al arresto del ciclo celular en G1.

Más adelante, en 2011 en nuestro grupo de trabajo, Ramírez y colaboradores realizaron un análisis por microarreglos de transcritos expresados en células C-33A encontrando que cuando expresaban E2 de VPH16 mediante infección con Adenovirus recombinantes, 581 genes se encontraban regulados positivamente; sin embargo, la regulación negativa fue más significativa ya que se encontraron 1048 genes cuya expresión estaba reducida, lo que sugiere que la proteína E2 actúa principalmente como un represor. El análisis de las vías de señalización en las que los genes diferencialmente expresados pudieran estar implicados indicó que la vía WNT es la que está más severamente afectada; esta vía está relacionada con el desarrollo de procesos cancerígenos.

Los cambios que realiza E2 sobre la expresión de genes celulares se han atribuido en parte a los complejos que puede formar con proteínas celulares que participan en procesos como apoptosis, procesamiento del RNA, transcripción y ciclo celular (Muller y Demeret, 2012). En 2008 Olejnik-Schmidt y colaboradores realizaron un estudio en donde se evaluaron las proteínas que interactúan con E2 mediante un sistema de doble híbrido, encontrando que E2 se une a diversas proteínas, entre las cuales se encuentran algunas que son muy importantes en diferentes procesos celulares, incluyendo la transcripción. Por ejemplo, se une a BTBD1 y BTBD2 que interactúan con la topoisomerasa y que participan en la replicación del DNA y en la transcripción de ciertos genes; también se puede unir a CCHCR1 que promueve la proliferación y diferenciación celular; además, se une con TMF1 que es otro factor de transcripción que se puede unir a la caja TATA y que inhibe la activación transcripcional por TBP. Además, se mostró que E2 también puede interactuar con NR4A1 cuyo nivel se ve incrementado en las fases tempranas de la apoptosis. Finalmente, en lo que concierne a la transición del ciclo celular, se observó que E2 puede interactuar con BRD4 que regula específicamente la transición de la fase G2 a M y que puede unirse a cromosomas mitóticos; al mismo tiempo se demostró que E2 interactúa con TAF1 *in vivo* que es esencial para la transición de G1 a M.

2.2 Interacción de TAF1 y E2

Para conocer más acerca del mecanismo de regulación que realiza E2, en 2003 Carrillo y colaboradores en nuestro grupo de investigación analizaron la interacción entre E2 y Factores Asociados a TBP (TAFs) debido a su importancia durante la regulación de la transcripción. Los ensayos de *pull-down* realizados en este estudio demostraron que E2 de BPV1 (Papilomavirus Bovino 1) y E2 de VPH18 pueden unirse a TAF1 con alta afinidad. Además, se estableció que el enlace entre E2 y TAF1 es un enlace iónico en el que la región carboxilo-terminal de E2 de BPV1 es más afín por TAF1, mientras que en E2 de VPH-18, la región C-terminal fue la única que demostró que podía unirse a TAF1. Con el fin de estudiar más a fondo la interacción entre TAF1 y E2, en el 2008 Centeno y colaboradores en nuestro grupo de trabajo evaluaron mediante ensayos de *pull down*

la interacción de los dominios estructurales de TAF1 y E2 de VPH16. Se obtuvieron 5 mutantes distintas de TAF conteniendo variaciones de los dominios NTK, AT, RAP y CTK y se observó que solo aquellas que contenían la región amino intacta, eran capaces de interactuar con E2. Igualmente se caracterizaron los dominios de interacción de E2, para lo que fueron construidas 5 mutantes de los dominios TAD, Bisagra y DBD de esta proteína viral; de este análisis se obtuvo que TAF1 se une más fuertemente con las mutantes que contienen a la región DBD, sin embargo, también se muestra la interacción con las que conservan la región bisagra, por lo que se concluye que ambas son necesarias para la interacción con la región NTK de TAF1.

Finalmente, se demostró la funcionalidad de la unión E2 y TAF1 utilizando dos construcciones para la expresión de un gen reportero que tuvieran un promotor dependiente de E2: En la primera construcción los sitios E2 se colocaron 50pb río arriba de la caja TATA, para analizar el posible efecto de TAF1 sobre la función de E2 como activador transcripcional, mientras que, para la segunda construcción, los sitios E2 se colocaron 5pb río arriba de la caja TATA, para analizar el posible efecto de TAF1 sobre la función de E2 como represor transcripcional. Los resultados obtenidos definieron que, para la primera construcción, la expresión de TAF y E2 elevó hasta 5 veces la expresión del gen reportero, mientras que para el segundo la represión mediada por E2, disminuyó cuando se aumentaron mediante transfección los niveles de TAF1.

2.3 Efectos de la interacción TAF1-E2

En un trabajo realizado por García-Venzor en nuestro grupo de investigación en 2013 se evaluó el impacto de la interacción de E2 con TAF1 sobre la unión de este factor a los promotores y la expresión de genes celulares. Para realizar el análisis se seleccionaron 14 genes cuya expresión estuviera condicionada por la actividad de TAF1 y E2; 10 de ellos están implicados en la regulación de proliferación y crecimiento celular, y el resto en diversas vías de señalización. Se realizaron 2 tipos de ensayos, el primero fue una inmunoprecipitación de la cromatina en donde se midió la unión relativa de TAF1 a los promotores de los genes evaluados, mientras que en el segundo ensayo se corroboró la actividad de TAF1 sobre los promotores midiendo la expresión

relativa mediante RT-qPCR. Se encontraron dos grupos de genes (Figura 7): aquellos en los que la expresión de E2 incrementa la unión de TAF1 a sus promotores y también la expresión de sus transcritos, que fueron: RhoA y Scr involucrados en la inducción de la proliferación, así como p27, GADD45A y 14-3-3t que regulan el arresto del ciclo celular.

El otro grupo de genes lo conformaron aquellos en los que se observó que la expresión de E2, disminuyó la unión de TAF1 al promotor, así como sus niveles de transcrito. Estos son genes que regulan positivamente la progresión del ciclo celular: ciclina A1 y topoisomerasa 1.

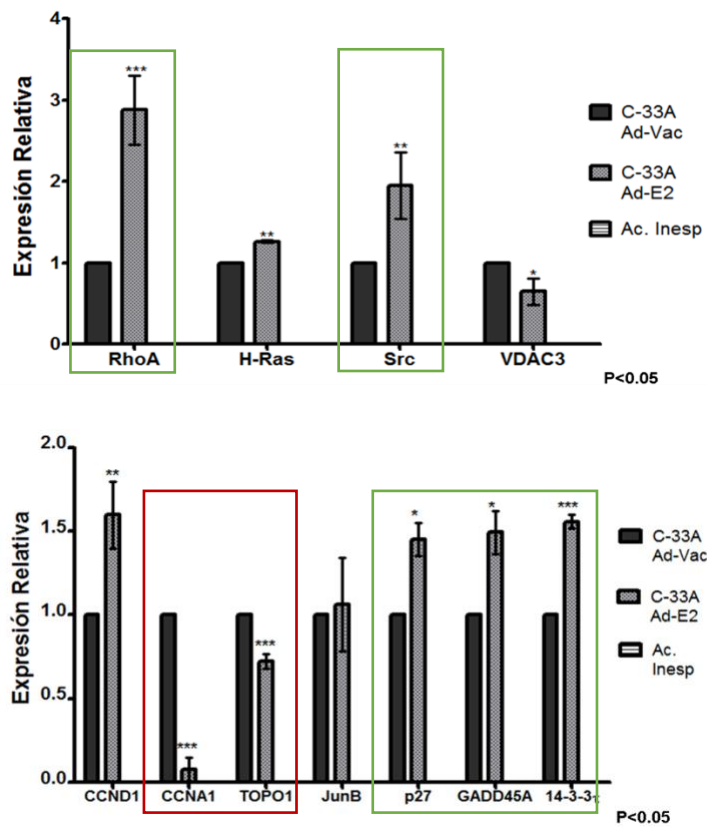


Figura 7. Expresión relativa de genes en células que expresan E2. Se muestra la expresión relativa de genes dependientes de TAF1. En verde se observa el efecto del incremento en la expresión, mientras que en rojo una disminución.

Con estos datos se concluye que E2 puede modificar la función de TAF1 al provocar cambios en la unión a los promotores de los genes evaluados. Así mismo, se observó que el cambio en los niveles de expresión de cada gen correspondía con el cambio en la unión de TAF1. Sin embargo, debido a que E2 puede interactuar con muchos otros factores de transcripción, aún se desconoce si el nivel de incremento y reducción de la transcripción está determinado solamente por la interacción entre E2 y TAF1. Es por esto que, como propuesta del presente estudio se planteó evaluar la función regulatoria de E2 sobre genes celulares en dos escenarios: con un ambiente celular con TAF1 activo y otro ambiente con TAF1 inactivo.

III. JUSTIFICACIÓN

La proteína E2 de VPH16 es un regulador de la replicación y transcripción del genoma del VPH, pero además puede modular la expresión de genes de la célula hospedera de manera directa interactuando con proteínas de la maquinaria transcripcional, con el fin de dirigir a la célula hacia condiciones favorables para la replicación del virus. La actividad de E2 regula principalmente de forma negativa la expresión de genes que controlan procesos como apoptosis y diferenciación celular, pero a la vez que puede inducir positivamente la expresión de genes involucrados en proliferación.

Se sabe que E2 puede interactuar con la proteína celular TAF1, la cual forma parte de la maquinaria basal de transcripción, y es un regulador transcripcional de genes involucrados en ciclo celular. Ambas proteínas pueden intervenir en vías celulares similares, lo que puede deberse a que regulan genes que pertenecen a una misma familia.

E2 puede interactuar con TAF1 y puede modular la expresión de los genes dependientes de TAF1, sin embargo, E2 también puede interactuar con otros factores de transcripción; es por esto que aún se desconoce si la regulación transcripcional de E2 sobre los genes celulares es independiente de TAF1. Elucidar la importancia de la participación de TAF1 en la regulación transcripcional de E2 puede contribuir a esclarecer el mecanismo que realiza durante el proceso infeccioso del VPH16.

IV. HIPÓTESIS

La proteína E2 del VPH16 regula a través de la proteína TAF1 la expresión de genes implicados en ciclo celular.

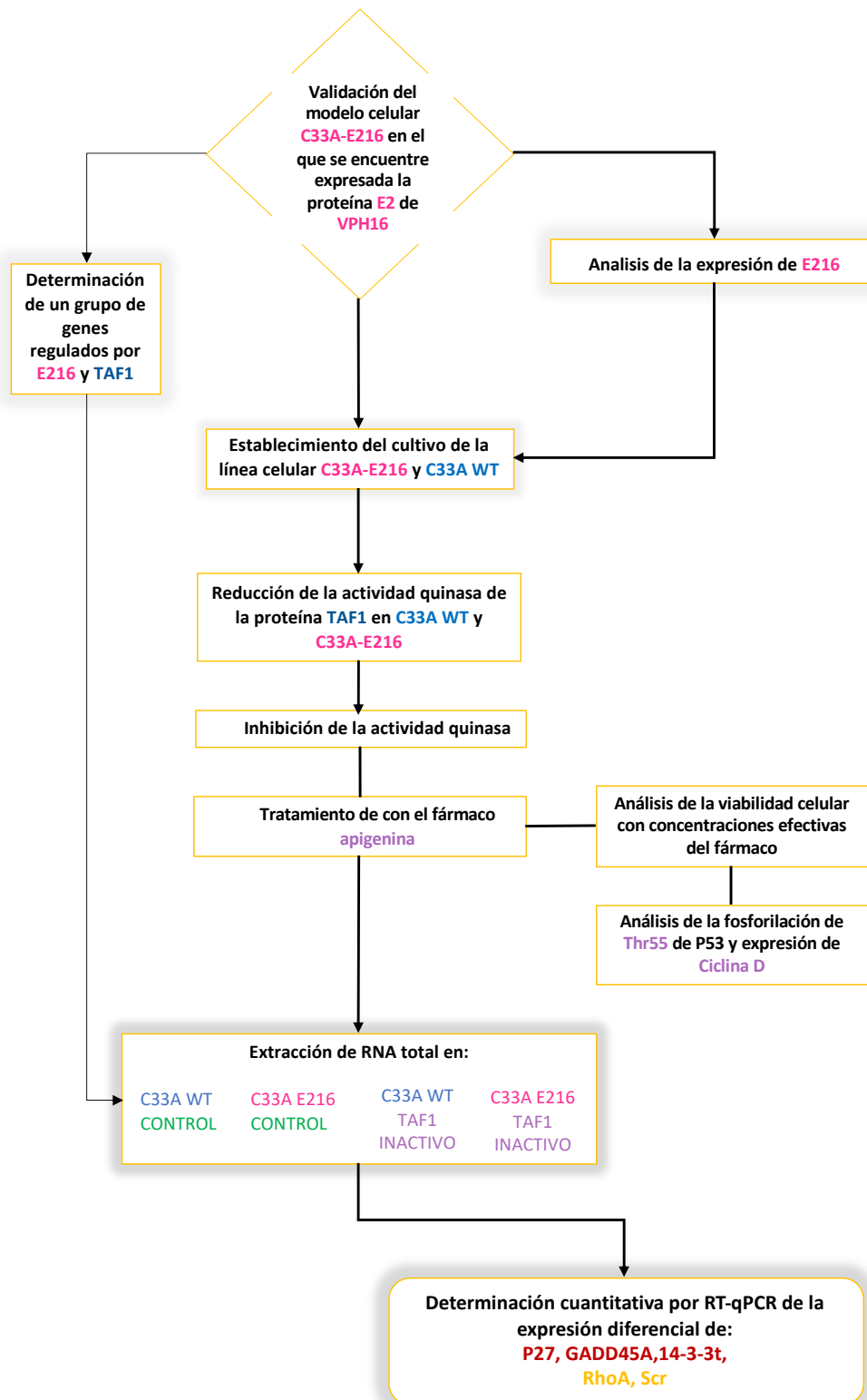
V. OBJETIVO GENERAL

Analizar el papel que desempeña la actividad quinasa de TAF1 en los procesos que realiza E2 de VPH16 para modificar la expresión de genes celulares.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- 6.1 Seleccionar los genes dependientes de TAF1 y regulados por E2 para evaluar *in silico* y experimentalmente.
- 6.2 Analizar la existencia de la secuencia E2BS en los promotores de los genes seleccionados para determinar la unión directa de E2.
- 6.3 Analizar el promotor de los genes seleccionados para determinar la unión de TAF1.
- 6.4 Determinar la concentración ideal de Apigenina para reducir la actividad quinasa de TAF1.
- 6.5 Reducir la actividad quinasa de la proteína TAF1 utilizando un agente farmacológico (Apigenina).
- 6.6 Evaluar la diferencia cuantitativa en la expresión de los genes seleccionados entre células C-33A WT, C-33A E216, y sus respectivos tratamientos con Apigenina (TAF1 disfuncional).

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y MATERIALES



7.1 Cultivo de células C-33A WT y C-33A-E216.

Las células C-33A son células humanas de linaje epitelial derivadas de un carcinoma cervical, son negativas para VPH y expresan de manera elevada al gen P53 en comparación con otras líneas celulares P53^{+/+}. La línea celular C-33A-E216, fue generada previamente en nuestro grupo de trabajo por López-Vázquez en 2016; en este sistema la expresión de E2 se mantiene debido a que el transgén de E2 fue incorporado a la línea celular mediante transfección estable utilizando el vector pTracer-CMV/Bsd el cual tiene un promotor de CMV que permite su alta expresión. El crecimiento de ambas líneas celulares se llevó a cabo en medio de cultivo DMEM-F12 (GIBCO), suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (By-Products), bicarbonato de sodio 29mM, Hepes 10 mM, además de glutamina 4mM, piruvato 1mM y 50U/mL de penicilina-estreptomicina. Las células se mantuvieron en cultivo a 37°C en una atmósfera húmeda con 95% O₂ y 5% CO₂.

7.2 Comprobación de la expresión de E2.

Para poder determinar si el mecanismo que realiza E2 sobre la expresión de genes celulares se lleva a cabo a través de TAF1, debía evaluarse en el sistema celular C-33A-E216 la expresión de E2, para comprobar su estabilidad. Para demostrar esto, a partir de cDNA obtenido del RNA extraído y purificado de cada línea celular (ver secciones abajo) se realizó una PCR en punto final para identificar el amplicón correspondiente a E2. Los componentes de la reacción fueron: 5µL de Buffer 5X Go-Taq Flexi, 1.5µL de MgCl₂ 25 mM, 1µL de dNTPs 10mM, 1µL de oligo forward, 1µL de oligo reverse, 2µL de RNA tratado con DNasa y 0.2µL de DNA polimerasa Go Taq Flexi (Promega); la reacción se llevó a un volumen final de 25µL con H₂O desionizada- esterilizada-filtrada. El perfil térmico de la reacción se determinó con tres diferentes etapas: Etapa 1: 94°C por 5 minutos; Etapa 2: desnaturalización 94°C por 45 segundos, alineamiento de 60°C por 45 segundos y elongación de 72°C por 90 segundos repetido por 30 ciclos; Etapa 3: 72°C por 5 minutos. Los productos de reacción se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5%.

7.3 Ensayo de viabilidad en células C-33A y C-33A-E216 tratadas con Apigenina.

Una vez establecido el cultivo de células, se procedió a determinar el efecto de la Apigenina sobre la viabilidad celular. Se fijaron 4 grupos de células según el tiempo de exposición al tratamiento con Apigenina: el grupo control de 0h, el de 24h, el de 48h y el de 72h; además se probó la Apigenina en las concentraciones de 5, 20, 40, 60 80 y 100uM con triplicados para cada concentración y cada grupo de células. Se sembraron 20,000 células por pozo en una placa de 48 pozos. Una vez pasadas 24h, el medio se retiró, se lavaron las células dos veces con PBS 1X y se procedió a colocar medio DMEM-F12 10% SBF con las concentraciones previamente definidas de Apigenina (Sigma 10798), que fue previamente resuspendida en DMSO (concentración final 0.1 M). Una vez pasado el tiempo correspondiente para cada grupo, (0, 24, 48 y 72h) se retiró el medio, se lavó una vez con PBS 1X y se añadió azul alamar (BIO-RAD) al 10% disuelto en medio Optimem (GIBCO). Las células se incubaron 4h a 37 °C. Finalmente, se recuperó el sobrenadante y se colocó en una placa blanca (Labsystems) para leer la fluorescencia en el Fluoroskan Ascent FL el cual se configuró con los siguientes parámetros: excitation → 544 Emission → 590. Los resultados de viabilidad se determinaron por regresión lineal utilizando el software de Graphpad Prism 8.

7.4 Tratamiento a células C-33A WT y C-33A-E216 con Apigenina.

Para obtener proteínas y RNA de las líneas celulares C33A WT y C-33A-E216, se sembraron en placas Petri de 60mm; a las 4h post-sembrado cuando el cultivo se encontraba entre el 80 – 85% de confluencia, se expuso a las células a diferentes concentraciones de Apigenina: 20, 40, 60, 80 y 100uM disuelta en medio DMEM-F12 suplementado con SBF al 10%; para las células control se utilizó 0.1% de DMSO disuelto en el mismo medio. Todos los tratamientos se realizaron por 24h.

7.5 Extracción de proteínas totales de C-33A WT y C-33A-E216.

Una vez que las células que no fueron sometidas a tratamiento habían alcanzado la confluencia del 90-95% o para el caso de las que, si lo recibieron, las 24h habían sido completadas, se extrajo la placa de la incubadora y se mantuvo en hielo. Se retiró el sobrenadante con el sistema de vacío y se lavaron dos veces con TBS 1X frío. Luego, se les añadió buffer RIPA (Tris HCl 25mM, NaCl 150mM, EDTA 5mM, Tritón X-100 1%, SDS 0.1% y desoxicolato de sodio 1%) suplementado con el cocktail de inhibidores de proteasas cOmplete 1X (ROCHE), así como otros inhibidores de fosfatasa, ATPasas y serin-treonin quinasas: fluoruro de sodio 25mM, molibdato de sodio 10mM y ortovanadato de sodio 2mM. Posteriormente las células se desprendieron del soporte con ayuda de un fragmento de hule y la solución se colectó en un microtubo. Enseguida, se inició la disrupción mecánica utilizando el sonicador Branson Sonifier 450 VW2 con las siguientes condiciones: duty cycle al 10% y output control 2; se realizaron 3 ciclos, cada uno con 3 etapas con 3 pulsos de 20 segundos (seg) con un descanso de 20 seg entre cada pulso y 60 seg entre cada etapa. Al finalizar la sonicación, la solución se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, las proteínas fueron cuantificadas utilizando el DC protein assay (BIO-RAD) partiendo de una curva estándar de BSA.

7.6 Western Blot de P53 fosforilada.

La finalidad del ensayo de western blot fue detectar la proteína p53 fosforilada en el residuo T55 en las células C-33A WT y C-33A-E216 tratadas con Apigenina. En primer lugar, se prepararon geles de poliacrilamida con una concentración del 10% para el gel separador. Se utilizaron 40µg de proteína y se diluyeron 1:1 con buffer Laemmli (Tris-HCl 50mM, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%, SDS 2% y 2-mercaptoetanol 100mM). Posteriormente, las muestras se calentaron a ~95 °C en un heat block por 5min. La mezcla proteica fue cargada en el gel sumergido en buffer de corrida 1X (Tris base 0.024 M, Glicina 0.191 M y SDS 0.1 M), se utilizó el marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein ladder (Thermo Scientific) y se corrieron a 90V durante

~ 2h. Concluido el tiempo, la membrana Immobilon-P PVDF 0.45 μm (Millipore-Merck) previamente activada con metanol absoluto por 1 min, se incubó junto con el gel en buffer de transferencia (Tris base, glicina, Metanol 20%) por 15 min. Posteriormente, se realizó la transferencia a 90V por 120 min a 4°C. Al terminar, la membrana se marcó, se lavó con H₂O desionizada y se secó con metanol 30 min; luego se reactivó con metanol y se bloqueó con Leche semidescremada baja en grasas (Svelty) al 5% disuelta en TBS. Las condiciones de incubación con el anticuerpo primario y secundario se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1: Condiciones de incubación con anticuerpos primario y secundario para P53, T55 y Actina.

Target	Incubación con anticuerpo primario	Incubación con anticuerpo secundario
T55 de p53	Anti-T55 de p53 (abcam EPR17729) 1:1500 en Leche 3% en TBS. Overnight 4 °C.	Anti-conejo 1:6000 en Leche 5% en TBST 0.1%
ACTINA	Anti-actina peroxidasa 1:50,000 en TBS. 1 h a temperatura ambiente.	----

Los lavados antes y después de la incubación con el anticuerpo secundario se realizaron con TBS-T al 0.1%. Para el revelado se utilizó luminol-peróxido de sustrato de HRP quimioluminiscente Western Immobilon ECL (Millipore-Merck) diluído 1:3 con agua desionizada.

7.7 Lisis celular y extracción de RNA

Las células se sembraron en placas Petri de 60mm para la extracción de RNA. Una vez que la confluencia había alcanzado el 70-75%, se retiró el medio de las placas, se

lavaron con PBS 1X y se añadió tripsina 1X (Caisson) para cosechar las células de la monocapa, las cuales fueron colectadas y centrifugadas. El botón celular se resuspendió en 1mL de PBS y se centrifugó nuevamente en la microcentrífuga a 5000rpm por 5min. Se retiró el sobrenadante y se añadió a la pastilla de células 600uL de TRIzol (Life Technologies) resuspendiendo completamente el botón celular, la muestra se reservó a -80°C. Después, se realizó la extracción de RNA utilizando el estuche comercial Direct-zol RNA MiniPrep de Zymo Research siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el RNA fue cuantificado con un equipo Nanodrop (Thermo-Fisher) y se realizaron diluciones del RNA total para crear una solución de trabajo de 200ng/μL. Para asegurar la calidad de la muestra, se tomaron 8μL de la solución (1.6μg) de RNA y se trataron con la DNasa RQ1 (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante.

7.8 Síntesis de cDNA

A la muestra de RNA tratado con DNasa se añadieron el *primer* Oligo dT de Promega y agua desionizada, esterilizada y filtrada y se calentó por 5min a 70°C. Después se añadió la mezcla de reacción (el máster mix) que contenía la retro-transcriptasa M-MLV (Promega) y su buffer, el inhibidor de ribonucleasas RNAsin de Promega y dNTPs en cantidades establecidas por el fabricante para luego llevarse al termociclador a 42°C por 90 min.

7.9 PCR en tiempo real

Una vez sintetizado el cDNA, se procedió a evaluar los cambios en la expresión por PCR cuantitativa. Los genes evaluados, así como los oligonucleótidos *primers forward* y *reverse* utilizados y sus características se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Genes analizados por q-PCR.

GEN	CÓDIGO INTERNO	SECUENCIA FW	tm	SECUENCIA RV	tm	Tamaño del amplicón
GADD4 5A	AGVRTGADD 45A	5' AAGGATGGATAAGGTGGG G 3'	55.7	5' ATGTTGATGTCGTTCTCGC 3'	56.0 6	225
1433T	AGVRT1433 T	5' CTCATACAAAGACAGCACC C3'	56.1 4	5' ATTTAGTTTTTCAGCCCTTC T3'	55.0 7	114
RhoA	AGVTRrhoA	5' GTCAAGCATTCTGTCCCAA 3'	56.2 4	5' ACCTCTCTCACTCCATCTTT 3'	55.1 6	203
Src	AGVRTSrc	5' TTCTACATCACCTCCCGCA 3'	58.0 1	5' ATCCACACCTCGCCAAAG 3'	57.2 8	215
P27	RTP27	5' TAA CTC TGA GGA CAC GCA T 3'	55.1 1	5' TTC TTC TGT TCT GTT GGC TC3'	55.6	148
Ciclina D	AGVRTCCND	5' AGGCGGAGGAGAACAAC 3'	56.8 8	5' TGAGGCGGTAGTAGGACA 3'	56.4 9	180
Ciclina A	AGVRTCCNA 1	5' AGACCCAAAGCACACTACA T 3'	56.7 5	5' TCCCTCTCAGAACAGACAT AC 3'	54.5 8	175
TAF1	TAF1	5' GATTGCAAGTTGATGCCTCC TCCACC 3'	66.0 9	5' TGCCTTCTCCATTTTCAGACA CACCAG 3'	65.0 3	99
B2	B2	5' ACCCCCACTTGAAAAAGAT GAGTA 3'	58.8 9	5' ATGATGCTGCTTACATGTCT CGA 3'	60.1 8	101
E2	E2	TGC GGG TGG TCA GGT AAT	56	TGG TCG CTG GAT AGT CGT	56	163

Para la reacción se empleó el estuche comercial Maxima SYBR Green/Rox qPCR Máster Mix 2X (Thermo Scientific); para cada reacción se tomaron 7.5µL del Máster Mix, 0.2µL de cada oligo, 2µL de cDNA y 5.1µL de H₂O. El perfil térmico que se determinó fue: 1 ciclo a 95°C durante 15 min, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 45 s, y 60°C durante 1min. Los resultados obtenidos se analizaron por el método de cuantificación comparativa $\Delta\Delta C_t$.

VIII. RESULTADOS

8.1 Un grupo de genes regulados por E2 son directamente dependientes de TAF1.

8.1.1 Selección de genes para analizar

A partir de un análisis por microarreglos realizado previamente en nuestro grupo de trabajo por Ramírez Salazar et. al., se demostró que la proteína viral E2 puede regular la expresión principalmente de forma negativa de genes celulares que participan en procesos como proliferación, diferenciación y apoptosis. De este trabajo se obtuvo una lista de genes cuya expresión fue modificada por E2 y que posteriormente fue abordada en el trabajo de García-Venzor, en el cual se consideraron 14 genes modificados por E2 y que además su promotor respondiera ante del factor de transcripción TAF1, con el objetivo de responder a la pregunta si E2 podría modificar la unión de TAF1 a los promotores y así modificar la expresión en el sistema celular C-33A. Los datos obtenidos señalan que E2 puede modificar la unión de TAF1 a los promotores de los genes evaluados y su expresión, evidenciando la influencia que tiene E2 sobre TAF1.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se analizó otro estudio de microarreglos realizado por Sunthamala et. al., donde obtienen información de cómo E2 de VPH16 modifica la expresión génica. El resumen del análisis realizado se observa en la Tabla 3. En base a los estudios de microarreglos revisados se eligieron 5 genes que tenían los cambios más significativos en su transcripción y unión a TAF1 en presencia de E2 y que además estuvieran involucrados en vías de regulación del ciclo celular: P27, SRC, RHOA, 14-33-t y GADD45A.

Tabla 3. Genes para analizar

PROTEÍNA	GEN	Modificación por E2 Ramírez-Salazar et. al	Modificación por E2 Sunthamala et. al.	Modificación por TAF1. O'Brien y Tijan et. al.
14-3-3-Tau	YWHAQ	2	1.01	0
Ciclina A1	CCNA1	2.9	1.03	2.9
Ciclina D1	CCND1	0.8	1.02	
Factor de arresto en crecimiento y de respuesta al daño en el DNA	GADD45A	10	1.05	2.25
Factor de transcripción asociado a TBP 1	TAF1	1.89	0.99	-
Inhibidor 1B de cinasas dependiente de ciclina P27	CDKN1B	1.39	1.06	-
Proteína homóloga a Ras	RhoA	5	0.99	-10
Proto-oncogén tirosina-proteína quinasa	SRC	-	1.03	-

8.1.2 Determinación de un posible mecanismo de regulación directa por parte de E2, en los promotores de los genes evaluados.

Partiendo de que E2 regula la expresión de los genes mencionados previamente, se planteó la idea de que pudiera existir una modulación directa, es decir, que E2 podría interactuar con los promotores sin la intervención de alguna proteína celular. Esto surge de los estudios que han descrito la existencia de E2BS (E2 *binding sites*) situados en la región LCR del VPH, lo que medía la regulación de la transcripción por esta proteína viral; además se han encontrado 34 sitios E2BS de alta afinidad en el genoma humano (Võsa et al., 2011) cuya secuencia es ACCGN₄CGGT. Para la búsqueda de estos sitios en los genes de interés, primero, se determinaron los promotores de cada uno haciendo uso de la base de datos RefSeq del NCBI y de la herramienta *Eukariotic Promoter Database*, donde se obtuvo la secuencia completa de cada uno de estos genes, el inicio de la región codificante CDS, las secuencias exónicas e intrónicas, así como el núcleo del promotor y el sitio de inicio de la transcripción o TSS. Por lo general, la región promotora se sitúa *upstream* del sitio del TSS, específicamente en el promotor

proximal, núcleo o *core* que se sitúa alrededor de 250 bp *upstream* del TSS, existen secuencias a las que se pueden unir factores de transcripción, mientras que en la región más distal del promotor existen elementos regulatorios que pueden activar o reprimir la transcripción de un gen. Sin embargo, también hay evidencia de que existen elementos regulatorios *downstream* del TSS (Satinder, et. al., 2014). En base a esta información, la búsqueda de la secuencia E2BS se realizó 1000 bp *upstream* y 1000 bp *downstream* del sitio de inicio de la transcripción para asegurar un buen rango de cobertura.

Con la finalidad de evaluar la regulación directa de E2 sobre TAF1, se realizó el análisis sobre el promotor de gen, encontrando que TAF1 tiene una secuencia E2BS con 100% de similitud localizada aproximadamente a 603 bp *upstream* del sitio de inicio de la transcripción (Figura 8).

>FP028987 TAF1_1 :+U EU:NC;

```
tcggcctctcaaagtgctggaattacaggcgtaagccaccgcgtcgggtcaaaaaatcaa  
tttctagggaaaaatgtcaactcaaaacaagtaacctgcatagctcgggaatgcctgtat  
aatttacgtcaagtcctccttgggacggaccgggtgaaattgcacgcagcacaaagaccg  
gctcttacccttacttccgggtattgtggtacaggaacccgaggttgcttgcgcgtaagc  
cacgtgactcgagcagctccttctgattggaggaagagccactgctctaattcgggtgccg  
tgagaaagctcgcgcgaggagcagtgaggagcgggaggactgaatatttctttgaccaa  
ccgctttccacatatccatcctcctgatcccgtagcgtcgaatcaaaagccgtagtaaa  
gtagttacttctttctttaggatagccggtctttccgggttttcccccccttccccctc  
cccttccccacttccccctccctttccccctctgttttgagcttccggtagaggctggta  
gggtaaggagctcagtaagtcacttctgggagactgttgttttatttccgggtctatggg|  
accggctgcgatttgctgctgcggacagcagctaccatcACTGCTGCCGCCATCATGTC  
AGACACGGACAGCGACGAAGATTCCGCTGGAGGCGGCCCATTTTCTTTAGCGGGTTTCCT
```

Figura 8. Localización de secuencia E2BS en el promotor de TAF1. Se muestra la secuencia ACCG N₄CGGT marcada en amarillo 603 bp *upstream* del sitio de inicio de la transcripción (con flecha roja) del promotor de TAF1.

Siguiendo esta metodología, se realizó la búsqueda en los promotores de los genes p27, Src, RhoA, 1433t y GADD45A encontrando que para ninguna de las secuencias hay una región ACCGN₄CGGT. Esto descarta una regulación directa por parte de E2 y abre la posibilidad a que la regulación se lleve a cabo a través de otros factores, entre ellos TAF1.

8.1.3 Potencial regulación de los promotores génicos evaluados, por TAF1.

Una vez establecido que los genes seleccionados no estaban siendo modulados por E2 de forma directa, se procedió a evaluar si TAF1 podría unirse a los promotores de los genes evaluados y así regular su expresión. Para eso, se utilizó la herramienta PROMO que detecta motivos en la secuencia del promotor a los cuales pueden unirse numerosos factores de transcripción. En primer lugar, se utilizó la herramienta *Eukariotic Promoter Database* para definir el sitio de inicio de la transcripción y el núcleo del promotor, con la finalidad de establecer la secuencia de búsqueda. Se sabe que TFIID se une cerca o en el núcleo del promotor, por ello, se buscó una secuencia dentro de la región comprendida entre 500 bp *upstream* y 500 *downstream*, respecto al TSS. Posteriormente, se analizó esa secuencia en PROMO donde se encontró que, para los 6 genes evaluados, había un sitio de unión para TFIID, el componente del PIC que contiene como subunidad a TAF1 (Figura 9). Se tomó en cuenta un porcentaje de disimilitud del 0%, lo que considera una similitud del 100% es decir, que la secuencia de unión a la que se puede unir el factor TFIID concuerda perfectamente con un sitio de la secuencia buscada.

Aunque la subunidad principal de TFIID que contacta con el DNA es la proteína TBP, la unión de TFIID a los promotores puede suceder directamente con TAF1, ya que todos los promotores de los genes evaluados carecen de caja TATA de modo que la unión con TBP es improbable. Esta información confirma que los promotores de los genes evaluados pueden ser modulados transcripcionalmente por TAF1.

CDKN1B= P27

6 TFIID [T00820] was predicted in:

Sequence TAAAAAA

	534	540
Dissimilarity	0.00%	
RE equally	0.33014	
RE query	0.03086	

32 BP DOWNSTREAM RELATIVE TO TSS
 TGTCAATATTTCTCTTCCTGCTGAGCCCTCCCTCCACCGCCATATTGGGCCACTAAAAAA
 AGGGGGCTGCTCTTTTGGGGGTGTTTTCTCCCTCCCTCCCTGTCGCCGCTGTGCTCACGGC

GADD45A

3 TFIID [T00820] was predicted in:

Sequence TTTTTTA TTTTAA TAGAAAA

	34	40 35	41 164	170
Dissimilarity	0.00%			
RE equally	0.33014	0.33014	0.33014	
RE query	0.13580	0.13580	0.13580	

399 - 270 bp UPSTREAM RELATIVE TO TSS
 GAGGTAACTTTGCCCGGAGGTCTGGAGCACCTGGTAACTGTAACCTGCTACTAATA
 ATTACTAGACTTCAGTGCATTAACCCCTGGAATATGATTTAATAGCCACCCTTAAACA
 AAAGCATGAAAAGATAAAGAAAAGTGGCAACTATTAAGAAACACTTGGCA
 GCCTGCTCAGCCAGCTAGGCCACTCTAGCTCTGTCTAAAGCCCCCACTCCCAAT
 GGTCCCGCCCAACCGGATAAGAGTGGCGGGGACCCGCTTCCCTCTCGGACCCGCC
 CCGCCCGCCCTCGGCTGCCCTCCCGGCTGGCTCCCTTTCCGCTCCTCAAC
 CTGACTCCAGGAGCTGGGTCAAATTGCTGGAGCAGGCTGATTGATAGCCCAATGGCC
 AAGCTGCATGCAATGAGCGGAAGGTGGTGGCTGAGGTTGGCAGGATAACCCCGAG
 AGCGGGCCCTTTGCTCTCTGGCTGGTGGCACTGGCTGGGAGGACGGCCCAATT

RHOA

7 TFIID [T00820] was predicted in:

Sequence TTTTATA

	287	293
Dissimilarity	0.00%	
RE equally	0.33014	
RE query	0.04266	

207 bp UPSTREAM RELATIVE TO TSS
 GCTTAAAGGATGAGTGACTCGGGGAGTACAAAATAGCAACCAGGTCCTTAATGCCCGG
 AGTTCCCGTGAATGCCCAAGCGGCTGCAATGATTGGTTAAGGTTTTGCTTTAGGGCCT
 GGACGGGCTCTGAGCAATAGTGGATGAGCTGTGATGCGCGCTGCGGGGGCCCG
 AGCTGTGCGCTCGAAGCCCTGCGGACTGAGAGCGGCACTGCTTCCCGCCCTCC
 GCGCGCGCCGCTCGCTCTGCGGCTAGCCCTCCGCGCGCCGCGGCTCCGCTCG

SRC

0 TFIID [T00820] was predicted in:

Sequence TCGAAAA

	68	74
Dissimilarity	0.00%	
RE equally	0.33014	
RE query	0.28666	

433 bp UPSTREAM RELATIVE TO TSS
 CCAGTTCCTCCAGAAATTTCTGTGACTCCTGGGGATGAGTTAGTATGATG
 CTGTAATATGAAATACCACTCTCTGGGAGAAAGAGGCTTATGGTACCGAT
 TCCGATGTCGAAGGGTAAATCTCCCACTGTGGCTGACATGGAGCTATCAGTGGACAT
 TCTGAATAGGAGTGGGAAGAATGAGCAGCTGGTCTTGAAGTGGTAAAGGGCC
 AGCTCCAGCTGCTCACTGGTAAATGCTCCCTGCCCTCCCGGAGCCAGTATGGCCAGT
 AAAGCCCTTAGACATGTTAAGGAATGGAAGGGGCTGAGAACTGCTCCTCAGCTG
 GGGCCCGCCCTGAGCCCTGGGAAGCTGCGGTTAATCTTAAAGCAGCTTGCAAAAG
 TCGGCCATTTACAGCCCTGGGCTTCTGCTTTGACTGGCTGGCACTCAAGC

YWHAQ = 1433T

0 TFIID [T00820] was predicted in:

Sequence TCTAAAA

	10	16
Dissimilarity	0.00%	
RE equally	0.33014	
RE query	0.02288	

484 bp UPSTREAM RELATIVE TO TSS
 CCCCCGTCCTCAGCTGAATATGTCACCCCTCCGAAGTCCAGCCTCGGCCAGAGCC
 CGTGAGATGCAATGCAACATCCGACGCGGAGACGACGCGCCCTAGGAGTCTGCGG
 CGCCTCTGGGCTCTGTCGCCACCCAGAAATGCCGGGTGGCGGGAGGCTGAGGGAGT
 TGGTAAAGGCATCGCATGGCAACAGTGAAGTCTTTACCTGGATCAATTGGAGGAA
 ACCCGTGGCCGAGCCGAGCCTGCCGCCAACCGAATTTCCCGTACCGACCCACCT
 CTTAGCCTCCGCTCCCTCCCTCCGCCCCCTGCGCCCTTCGGGGCTGGTCTC
 CATTGGCCAGCGCCGCTGGGGGGGAGCTCTCGGAGAAGCTCGGCGCATATTGGCC
 GGTGGACCCCTCGGCCCGGGGTAGCTGACACGGGAGGCTCAGCTAAAGCCAA
 AAGCAGATCAAATGGTGGCTCTGCGCTCGCGCCGCGGAGACGTGAAGGTGAGCCCTG

CCND1 = Ciclina D1

2 TFIID [T00820] was predicted in:

Sequence TTTTTTA TTTTAA TAAAAA TAAAAA TTTTGA TTTTCAA

	31	37 32	38 39	45 40	46 282	288 1493	1499
Dissimilarity	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
RE equally	0.82452	0.82452	0.82452	0.82452	0.82452	0.82452	0.82452
RE query	0.26984	0.26984	0.26984	0.26984	0.26984	0.26984	0.26984

970, 962 bp UPSTREAM and 492 DOWNSTREAM RELATIVE TO TSS

Figura 9. Predicción de sitios de unión de TFIID en los promotores de genes target. Se observa en cada panel: la secuencia de unión del TFIID a cada uno de los promotores, así como el porcentaje de disimilitud. Además, la secuencia de cada promotor, el TSS (marcado en rojo) y la secuencia y localización en donde se une TFIID.

8.2 La Apigenina reduce la actividad quinasa de TAF1.

8.2.1 *Efecto de la Apigenina sobre la viabilidad celular.*

Con relación al resultado obtenido sobre la importancia de TAF1 en la regulación de genes que también son modificados por E2, se propuso alterar el microambiente para observar los efectos de tener a E2 presente en el medio intracelular en un contexto en el que la proteína TAF1 se encontrara inactiva. De acuerdo con la literatura, varios autores han remarcado la importancia de la actividad quinasa de TAF1 para auto y transfosforilar proteínas y factores de transcripción del mismo TFIID y otros complejos formadores del PIC. Por esta razón se realizó una búsqueda para elegir un inhibidor de la actividad quinasa, encontrando que, la Apigenina, un polifenol derivado de plantas al que se le atribuyen actividades como arresto del ciclo celular, inducción de apoptosis y actividad anti-inflamatoria, tiene una fuerte represión sobre la actividad quinasa de TAF1.

Con la finalidad de elegir una concentración óptima de Apigenina para reducir la actividad quinasa de TAF1, pero que no fuera citotóxica para las células, se realizó un ensayo de viabilidad utilizando el reactivo de azul alamar que permite evaluar células metabólicamente activas.

En primer lugar, se estableció el cultivo de las líneas celulares C-33A WT y C-33A-E216 y se comparó la expresión de E2 mediante PCR en punto final y RT-qPCR. Los resultados se muestran en la Figura 10.

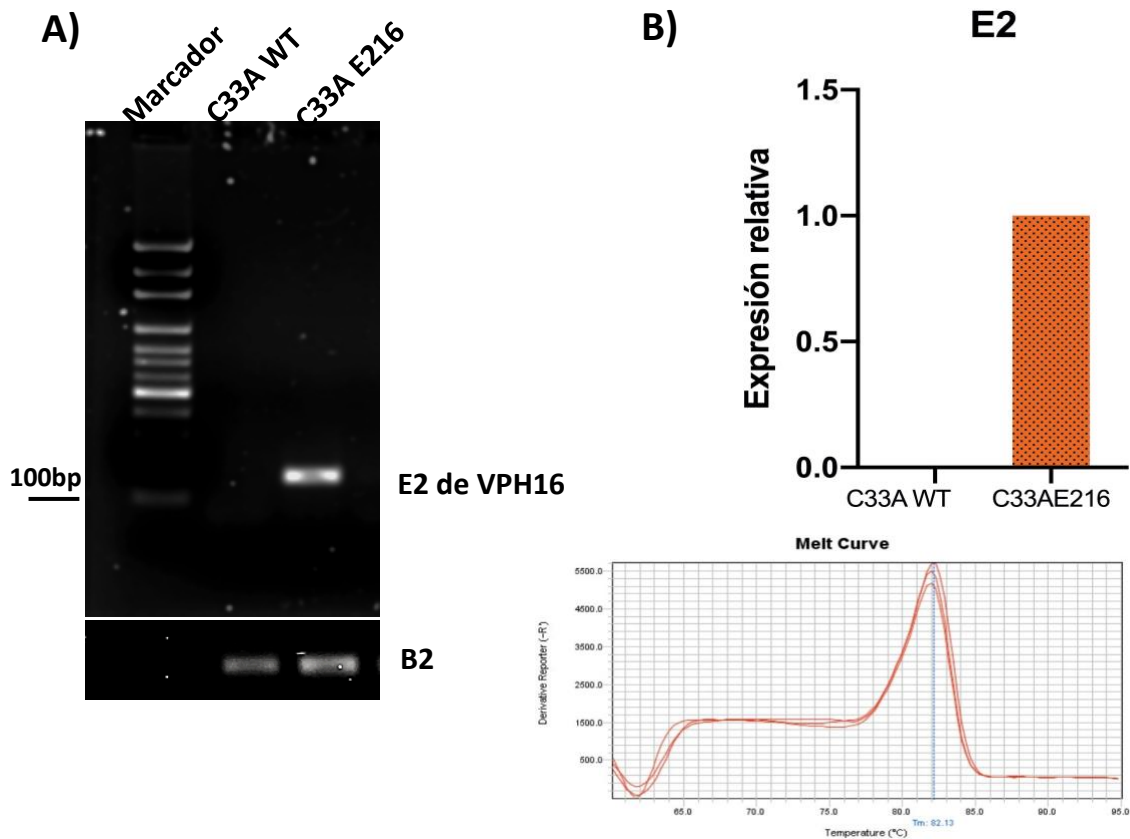


Figura 10. Detección de E2 en células C33AE216. A) PCR en punto final, se muestra en el carril 1 las células C-33A WT, en el carril 2 C-33A-E216. El amplicón de E2 se observa alrededor del marcador de 100bp. En la parte inferior se muestra la amplificación de B2-microglobulina como control endógeno. B) PCR en tiempo real para la amplificación de E2 en C-33A WT y C-33A E216, la curva de disociación muestra un solo producto de amplificación.

Una vez demostrada la presencia de E2 en la línea celular C-33A-E216, se procedió a realizar el ensayo de viabilidad. En éste se evaluaron concentraciones desde 5 a 100 μM de Apigenina disuelta en DMSO, además 0.01% de DMSO para las células control. El ensayo se realizó a 24, 48 y 72h en ambas líneas celulares C-33A y C-33A-E216 (Figura 11).

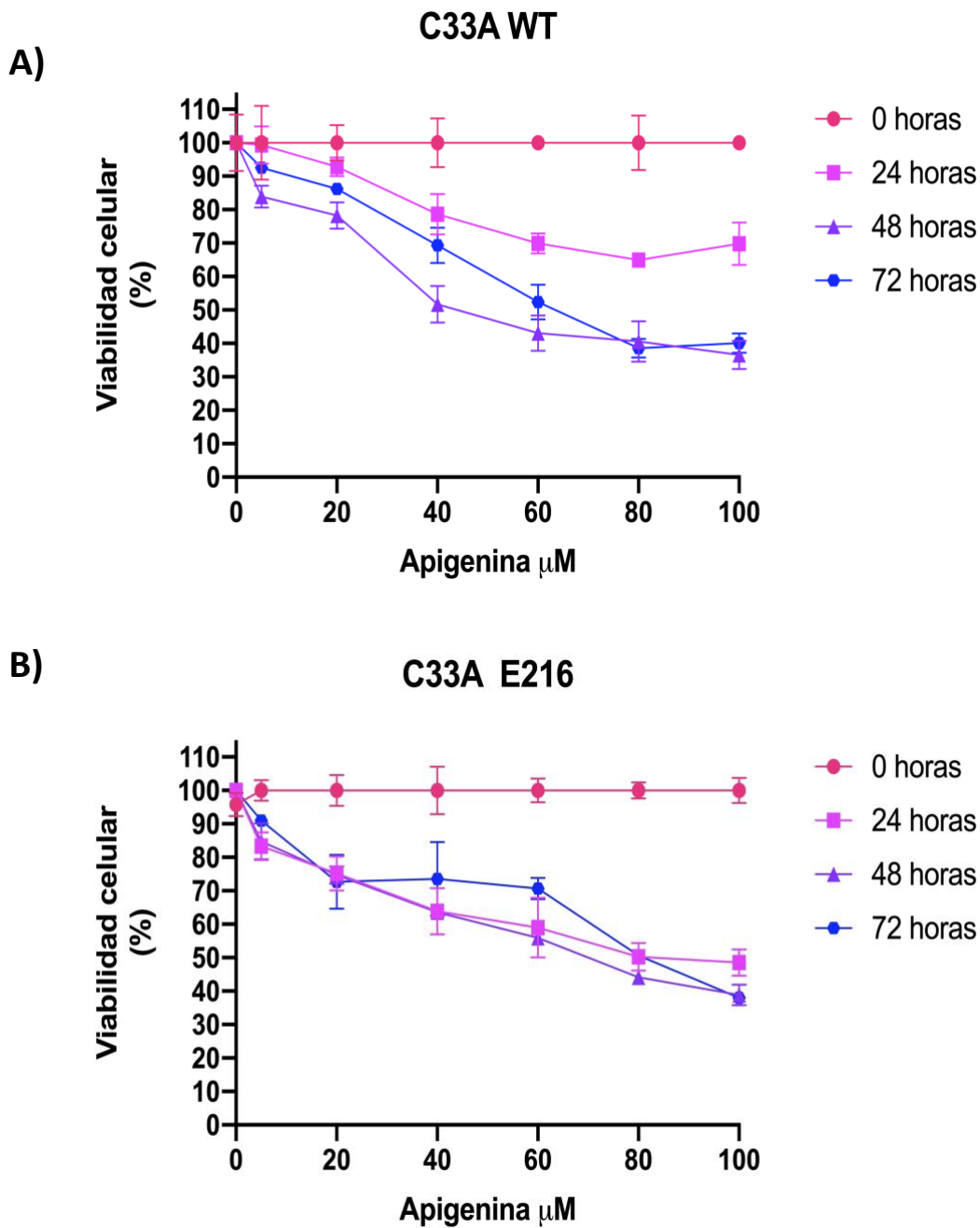


Figura 11. Evaluación de viabilidad celular en células C-33A WT (A) y C-33A-E216 (B) tratadas con Apigenina. El ensayo se realizó a 0, 24, 48 y 72h y se probaron concentraciones de 5, 20, 40, 60 80 y 100μM de Apigenina. Se observa un comportamiento dosis y tiempo-respuesta en ambas líneas celulares.

Los resultados muestran una respuesta dependiente de la concentración en ambas líneas celulares, sin embargo, el descenso en la viabilidad es más contundente en las células C-33A-E216. Por otra parte, en la evaluación de 72h en ambas líneas celulares se nota una reducción menor en la viabilidad comparado con el ensayo a 24h.

8.2.2 Detección de P53 fosforilada.

Dado que se había establecido el rango de concentraciones en el que se podía utilizar la Apigenina, lo siguiente fue determinar la concentración específica con la cuál disminuyera la actividad quinasa de TAF1. Para ello, se tomó en cuenta uno de los blancos de fosforilación de TAF1: P53 que es fosforilado específicamente en la Treonina 55 (T55), de modo que la disminución de la actividad cinasa de TAF1, se podría reflejar en una disminución en la fosforilación de este aminoácido en la proteína p53. Las células se trataron con 5 diferentes concentraciones de Apigenina y se extrajeron las proteínas totales para realizar el análisis por western blot. Los resultados del efecto de Apigenina sobre la fosforilación de p53 en células C-33A WT se muestran en la Figura 12.

Para este experimento fueron utilizados tres diferentes controles de líneas celulares con diferente estatus de p53: las células HepG2 que tienen a p53 WT, las Hep3B que tienen a p53 nulo y a C-33A-LacZ que, aunque posee a P53 mutado, tiene alta expresión. En la imagen se pueden observar varias bandas que corresponden a inespecificidades, sin embargo, la banda correspondiente en peso molecular (marcada con una flecha) se encuentra alrededor de 55 kDa. Los resultados indican una reducción significativa en la fosforilación de T55 utilizando concentraciones de 40 y 60 μ M.

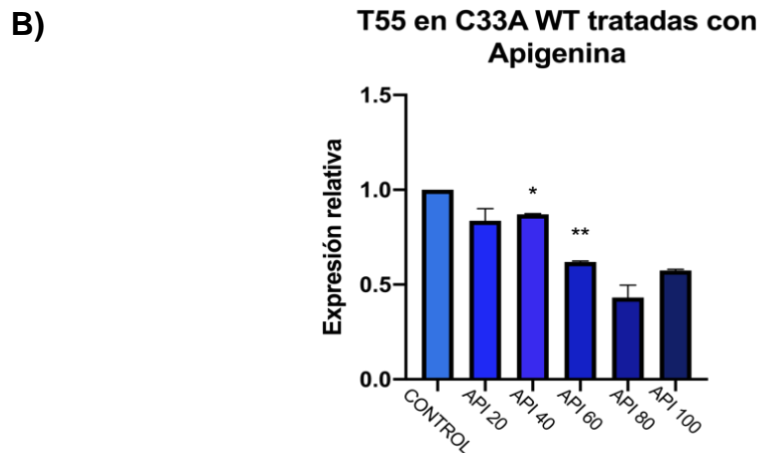
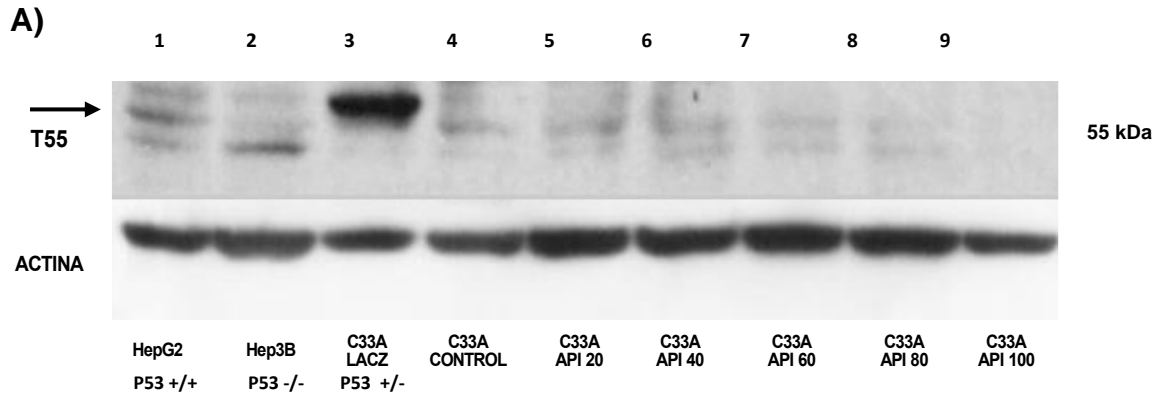


Figura 12. Detección de p53 fosforilada en la T55 en células C-33A WT tratadas con Apigenina. A) Se observa en los primeros tres carriles a T55 en células con diferente status de P53: WT, nulo y mutado respectivamente. En los carriles del 4 al 9, el resultado en las células C-33A-WT con diferentes concentraciones de apigenina. B) Análisis densitométrico. (n=2 ** p<0.05%).

Igualmente, el experimento se llevó a cabo en células C-33A-E216 y los resultados se muestran en la Figura 13.

De acuerdo con la figura, se puede apreciar que la banda correspondiente a p53 fosforilada (marcada con la flecha) para la línea celular C-33A-E216 se reduce de manera significativa utilizando la concentración de 80μM de Apigenina. Los datos de ambas figuras remarcan que para reducir significativamente la actividad quinasa de TAF1, en la línea celular C-33A se puede utilizar una concentración de 40 o 60μM de

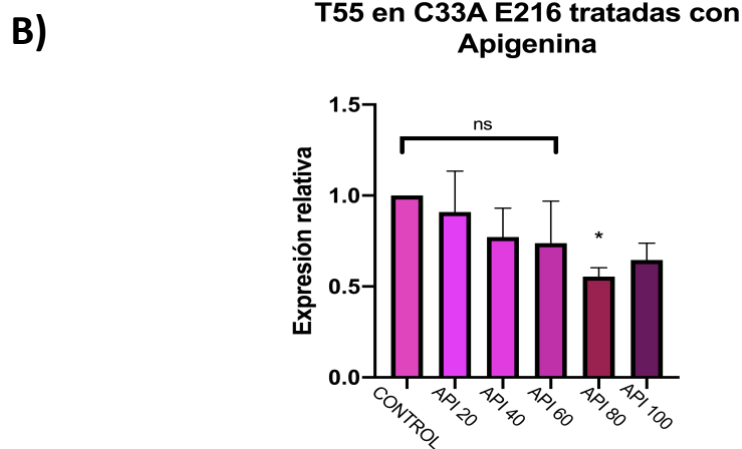
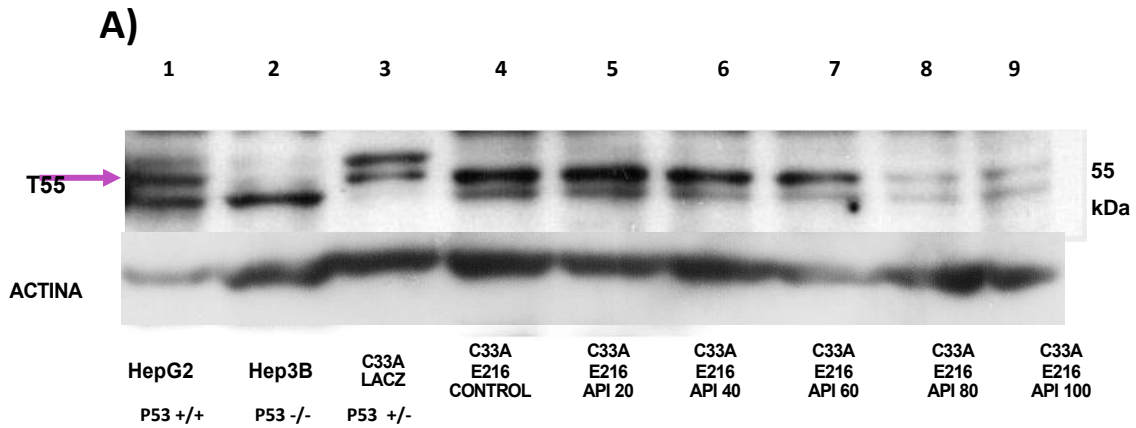


Figura 13. Detección de p53 fosforilada en la T55 en células C-33A-E216 tratadas con Apigenina. A) Se observa en los primeros tres carriles a T55 en células con diferente estatus de P53: WT, nulo y mutado respectivamente. En los carriles del 4 al 9, el resultado en las células C-33A-E216 con diferentes concentraciones de apigenina. B) Análisis densitométrico. (n=2 ** p<0.05%).

Apigenina, mientras que para las células C-33A-E216 es necesaria una concentración de hasta 80µM. No obstante, la concentración de 80µM en células C-33A-E216 ocasiona un descenso en la viabilidad celular del 50.7%, por lo que sería ideal utilizar una concentración de Apigenina que no induzca una toxicidad cercana a la dosis letal 50.

8.2.3 Evaluación de la expresión de ciclinas D y A.

En base a los resultados obtenidos del western blot donde se analizó la actividad de TAF1 sobre uno de sus blancos de fosforilación, se planteó utilizar una concentración de Apigenina para tratar las células que tuviera la capacidad de disminuir la actividad quinasa de TAF1 sin afectar tan significativamente la viabilidad en ambas líneas celulares, de modo que 60 μ M fue la concentración elegida; además reportes previos (Wu, et al., 2017; Heng-Hong et al., 2004; Cai, et al., 2008) señalan que concentraciones menores a 60 μ M son suficientes para reducir la actividad de TAF1. Con el fin de comprobar si el tratamiento con 60 μ M de Apigenina en ambas líneas celulares era suficiente para disminuir la actividad quinasa de TAF1, se realizó un análisis de expresión de genes TAF1 dependientes. De acuerdo con la literatura, la actividad quinasa de TAF1 es requerida para la transcripción de la Ciclina D y Ciclina A, por esto, se realizó un análisis de los niveles de mRNA por PCR en tiempo real, de Ciclina D (Figura 14) y Ciclina A (Figura 15) comparando a células sin tratamiento y células tratadas con 60 μ M de Apigenina.

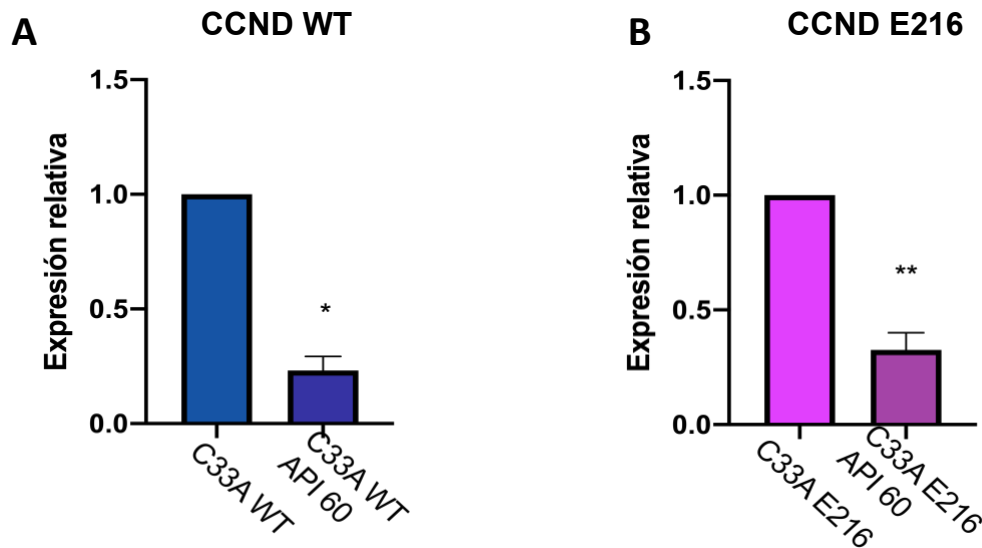


Figura 14. Expresión de Ciclina D en células C-33A-WT y C-33A-E216 tratadas con 60 μ M de Apigenina. A) Análisis por RT-qPCR para detectar los niveles de Ciclina D en C33A WT, C-33A-WT tratadas con apigenina y B) Análisis en C-33A-E216 y C-33A-E216 con Apigenina.

Los resultados de la figura 14 señalan que para las células C-33A-WT y C-33A-E216 tratadas con 60 μ M de apigenina, la reducción en la expresión de la ciclina D es significativa, denotando un cambio en la actividad quinasa de TAF1.

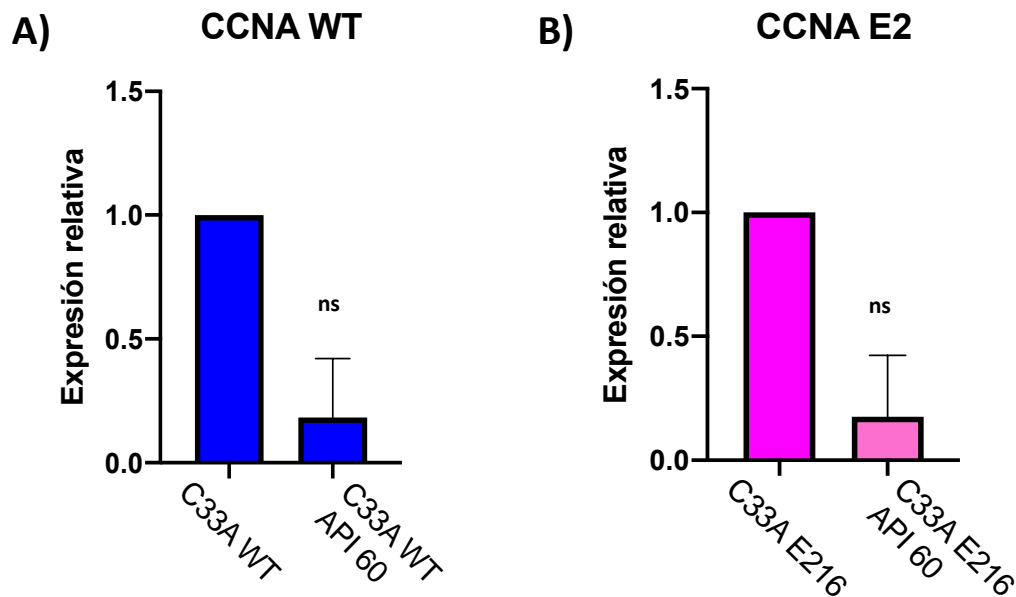


Figura 15. Expresión de Ciclina A en células C-33A-WT y C-33A-E216 tratadas con 60 μ M de Apigenina. A) Análisis por RT-qPCR para detectar los niveles de Ciclina A en C-33A-WT y C-33A-WT tratadas con Apigenina B) Comparación de expresión de Ciclina A en C-33A E216 y C-33A-E216 tratadas con Apigenina.

En la figura 15 se observa un comportamiento distinto del gen de la ciclina A, si bien, se nota una reducción de la expresión en las células tratadas con Apigenina, ésta no es significativa. Sin embargo, al igual que en el análisis de ciclina D, la reducción en la expresión de ambos genes indica una reducción de actividad quinasa de TAF1, por lo que se concluye que utilizar 60 μ M de Apigenina es efectivo para observar un microambiente con TAF1 con menor actividad.

8.3 E2 modifica la expresión de genes celulares de forma dependiente de TAF1.

Una vez que se determinó la concentración óptima de Apigenina para disminuir la actividad quinasa de TAF1, se realizó el análisis de expresión de los genes de interés en las dos líneas celulares: C-33A-WT y C-33A-E2. El análisis se realizó comparando la expresión de células sin y con tratamiento con Apigenina, es decir en dos microambientes celulares: con TAF1 activo e inactivo. Los resultados del análisis en células C-33A-WT se observan en la figura 16.

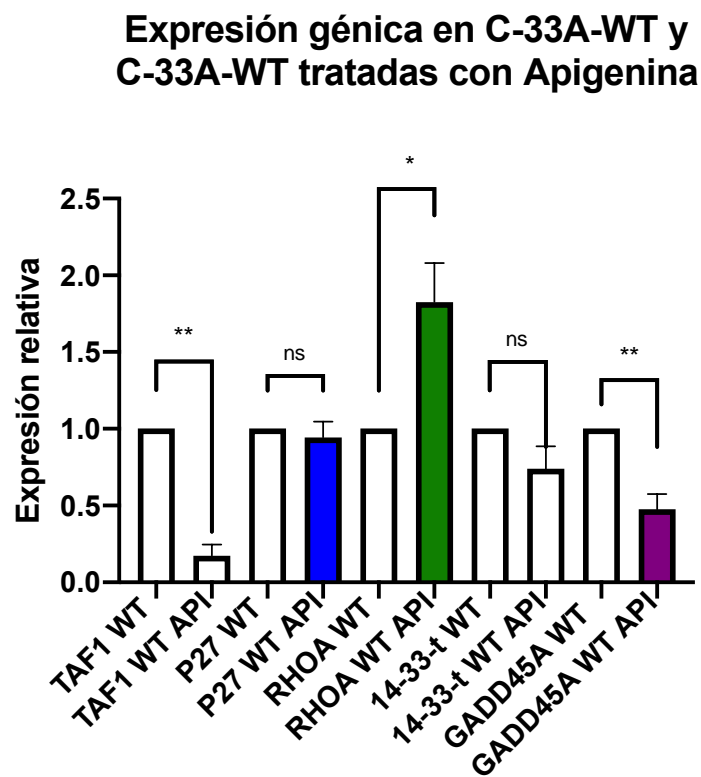


Figura 16. Análisis de la expresión de genes celulares en células C-33A-WT con TAF1 activo e inactivo. Se muestra la expresión relativa de los genes diana con respecto a un control endógeno en la línea C-33A-WT sin y con tratamiento con Apigenina.

Se observa en la Figura 16 que los genes TAF1 y GADD45A presentan una disminución significativa en su expresión cuando la actividad quinasa del factor TAF1 está inactiva; este hecho denota que TAF1 puede auto-regular su transcripción y que, al no estar

activo, su expresión se ve significativamente reducida; por su parte la expresión de GADD45A tiene una dependencia del factor TAF1 debido a que cuando se encuentra inactivo la expresión de GADD45 disminuye. En contraste, el gen RHOA tiene un comportamiento contrario, ya que cuando TAF1 está inactivo, su expresión se ve incrementada. Por otro lado, la expresión de los genes P27 y 14-33-t no presentan cambios significativos; lo que apunta a que otros factores pueden intervenir en la transcripción de estos genes y que la inactivación funcional de TAF1 no afecta su expresión.

Posteriormente, se realizó el análisis de expresión comparando a C-33A-E2 y C-33A-E216 tratadas con Apigenina, los resultados se observan en la Figura 17.

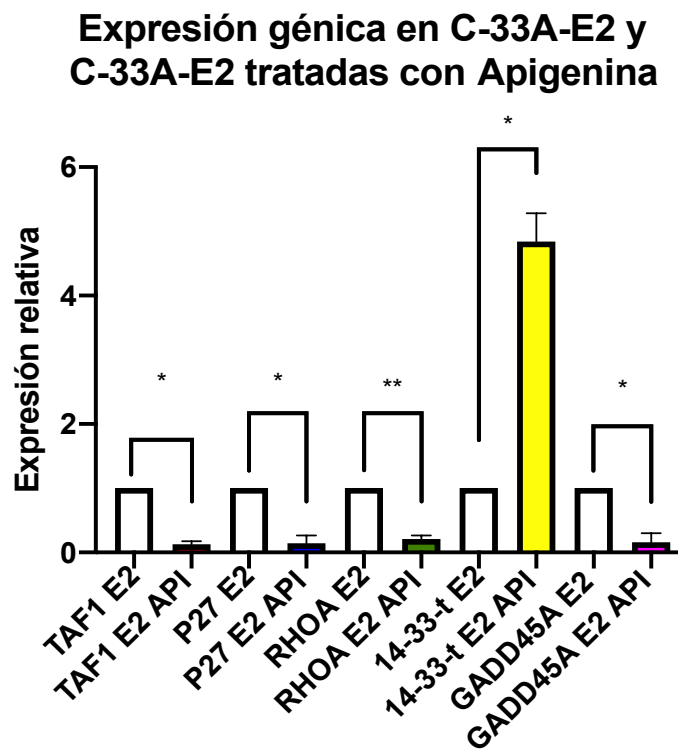


Figura 17. Análisis de la expresión de genes celulares en células C-33A-E2 con TAF1 activo e inactivo. Se muestra la expresión relativa de los genes diana con respecto a un control endógeno en la línea C-33A-E2 sin y con tratamiento con Apigenina.

En la figura 17 se muestra un patrón de expresión distinto en comparación al obtenido en células C-33A-WT. Se observa en células C-33A-E2 una disminución en la expresión de los genes TAF1, P27, RHOA y GADD45A cuando las células fueron tratadas con Apigenina. Este resultado indica que cuando la función quinasa de TAF1 se encuentra inactiva, E2 no consigue mantener los mismos niveles de expresión de los genes mencionados, y su expresión disminuye de forma significativa. Interesantemente la expresión del gen 14-33-t se eleva cuando TAF1 se encuentra inactivo, lo que señala que E2 mantiene una represión de 14-33-t a través de TAF1.

Así mismo, con la finalidad de analizar los cambios en cada uno de los genes de interés, se comparó la expresión de cada gen en cada uno de los cuatro grupos de estudio que fueron: C-33A-WT, C-33A-WT tratadas con Apigenina, C-33A-E2 y C-33A-E2 tratadas con Apigenina (Figura 18).

En la figura 18 se puede observar como se afecta la expresión de los genes diana cuando TAF1 está inactivo (C-33A-WT API), además se indica el cambio que se da cuando está presente E2 (C-33A-E2) y finalmente la expresión relativa cuando está presente E2, pero TAF1 se encuentra inactivo (C-33A-E2 API); todo con respecto a la expresión de C-33A-WT.

Particularmente, la expresión de TAF1 y de 14-33-t disminuye en los tres microambientes presentados en comparación con las células C-33A-WT. En el caso de los transcritos de P27, RHOA, y GADD45A se aumentó la expresión en presencia de E2. Los cambios de expresión en los genes de interés indican que E2 modifica la expresión génica de forma dependiente de la actividad de TAF1.

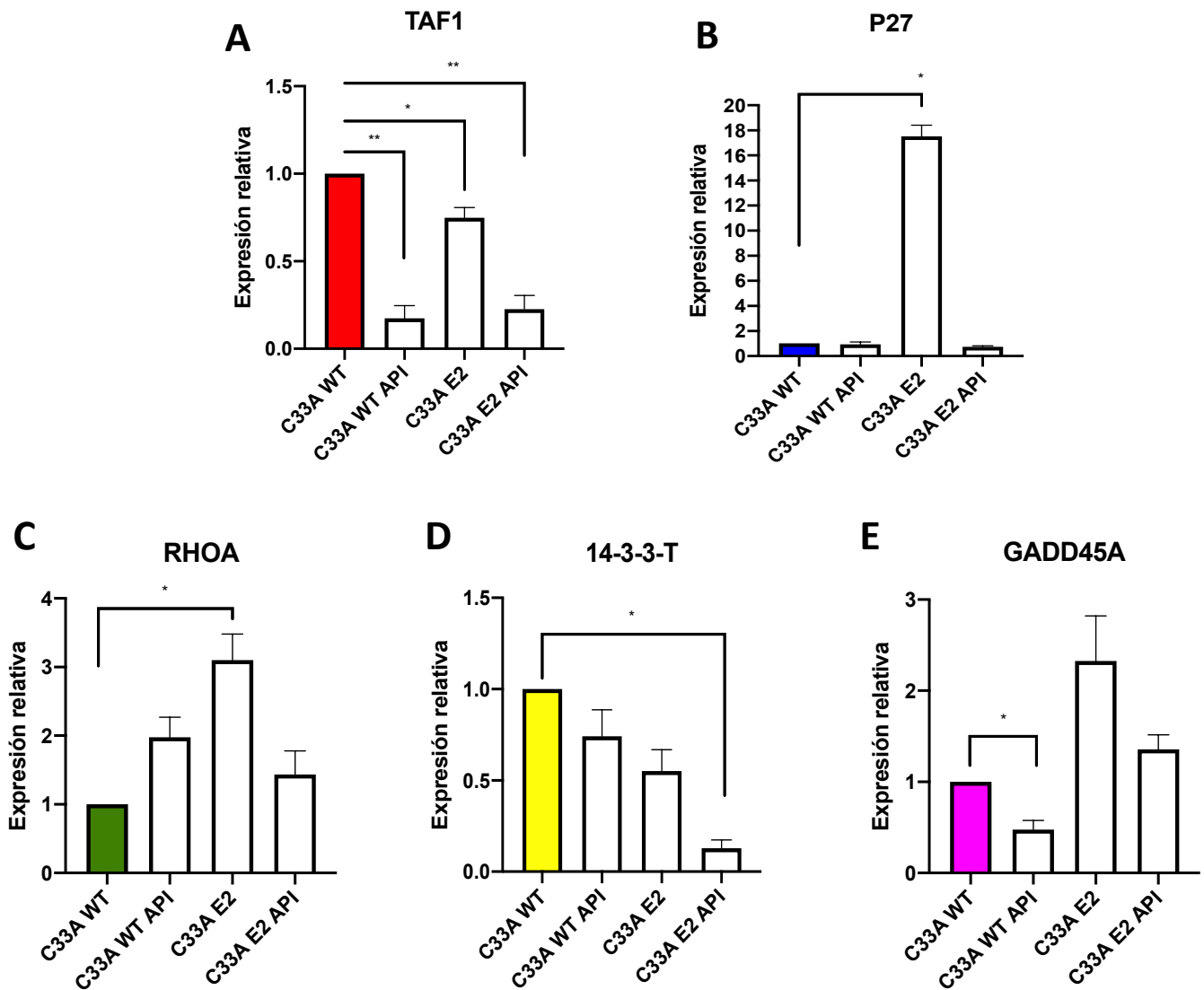


Figura 18. Análisis de la expresión de genes diana en células C-33A-WT con TAF1 activo e inactivo y C-33A-E2 con TAF1 activo e inactivo. Se muestra en el panel A) la expresión relativa de TAF1 en los cuatro grupos celulares con respecto a un control endógeno. En el panel B) se muestra la expresión diferencial de P27, en el C) el de RHOA, en D) de 14-3-3-t y en E) el patrón de expresión de GADD45A.

IX. DISCUSIÓN

9.1 Análisis de la selección de genes TAF1-dependientes, modificados por E2.

Como se ha mencionado, E2 puede modificar la expresión tanto de genes virales, como de genes de la célula huésped. Aunque esto fue demostrado por Ramírez-Salazar, et al., en nuestro grupo de investigación desde 2011, diversas publicaciones han confirmado contundentemente este hecho. Por ejemplo, un trabajo realizado por Gauson et. al., en el 2014, reportó que en células U2OS, la presencia de E2 de VPH16, modificó la expresión de 74 genes (algunos de ellos involucrados en la regulación de la expresión génica, en la replicación del DNA, ensamblaje y organización celular), la mayoría de ellos, de forma negativa. En otro estudio en donde se evaluó el efecto de la expresión de E2 de este mismo tipo viral en queratinocitos humanos (Sunthamala et al., 2014), se reportó que E2 podía disminuir la expresión de 601 genes, mientras que aumentaba la expresión de 178; algunos de los genes afectados, forman parte de vías de señalización específicas como: remodelación de la cromatina y transcripción. Por otro lado, en un trabajo publicado en el 2018 por Fuentes-González et al., se detallan los cambios génicos que ocurren al expresar E2 de VPH18 mediante su transfección plasmídica, en células C-33A, indicando que existen cambios en genes involucrados en rutas como proliferación y muerte celular por apoptosis. Todas las vías de regulación mencionadas anteriormente tienen en común su relación con la progresión del ciclo celular.

Derivado de la publicación de nuestro grupo de trabajo sobre la capacidad de E2 de VPH16 de modificar la expresión de algunos genes relacionados con la transcripción, trabajos recientes se han enfocado en estudiar con mayor detalle los mecanismos que sigue E2 para realizar esta regulación. Uno de estos genes es el del factor de transcripción TAF1, cuyo estudio fue abordado por Sánchez-Ramos et al., en 2019, reportando un aumento significativo de los niveles de mRNA y proteína de este factor. Dado que TAF1 es un factor de transcripción, del cual son dependientes el 18% de los

genes de mamíferos y que además promueve rutas como diferenciación, apoptosis y progresión del ciclo celular, se planteó la hipótesis de que E2 pueda modificar la expresión génica a través de este factor. De hecho, estudios previos de nuestro laboratorio, en los que se analizó un grupo de genes cuya expresión ha sido reportada que es dependiente de TAF1, entre ellos: 14-3-3-T, GADD45A, P27, RHOA y SRC, se demostró que E2 podía modificar tanto la unión de TAF1 a los promotores de los genes, así como su expresión (García-Venzor et al., 2013); además, López-Vázquez en 2016, demostró que ese mismo grupo de genes es afectado por E2 de VPH16 de manera dependiente del estatus celular del gen P53. Por todo lo anteriormente planteado se consideró para el presente estudio un grupo de genes cuya expresión estuviera modulada por ambas proteínas (E2 y TAF1) e involucrados en vías de señalización similares.

9.2 Modificación de la expresión génica de forma indirecta por parte de E2

Partiendo de la idea de que E2 puede unirse a regiones del genoma celular en una secuencia específica y de esta forma modificar la expresión génica, se realizó una búsqueda de E2BS en los promotores de los genes de interés. En un estudio realizado por Vösa et al., en 2011 se determinaron a través de un análisis *in silico* 3,300 sitios palindrómicos ACCGN4CGGT en regiones del genoma ricas en islas CpG; además se identificaron mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) sitios de unión a E2 de VPH11 en dos locus correspondientes a HMGB2 y RBBP4, en regiones activas de la cromatina. Por su parte, Jang et. al., en el 2009 observaron que E2 de HPV1 y BPV1 se unen a promotores transcripcionalmente activos.

A pesar de los antecedentes de nuestro grupo de trabajo sobre la regulación de la expresión de estos genes por E2 de VPH16, no se había analizado en los promotores de los genes de interés la existencia de secuencias de unión a la proteína viral que pudieran estar afectando su transcripción, por lo que en este trabajo se realizó la búsqueda de esta secuencia en ellos. Interesantemente, no se encontró la secuencia

palindrómica en ninguno de los promotores analizados, de modo que se descartó una regulación directa de ellos por parte de E2.

9.3 Regulación de los promotores de los genes evaluados por TAF1

Una vez que se tuvo información sobre la ausencia de E2BS en los promotores de los genes de interés y por tanto la baja probabilidad de unión de E2 a ellos, se procedió a analizar si TAF1 pudiera regular su expresión. La búsqueda se realizó con la herramienta PROMO considerando 1000 bp *upstream* del TSS y hasta 500 *downstream* y se observó que TFIID podría unirse a todos los promotores evaluados. Estas regiones alrededor del TSS fueron evaluadas considerando que previamente ha sido descrito que el TFIID puede unirse *upstream* o cerca del núcleo del promotor identificando elementos iniciadores Inr, motivos MTE, o cajas TATA (Rhee y Pugh, 2012); además se ha reportado que el 80% de los promotores transcritos por la RNAPol II carecen de caja TATA, por lo que el TFIID puede identificar y unirse a elementos regulatorios downstream DPE, o elementos Inr (Sugihara et al., 2011). Por otra parte, se tomó en cuenta que, dentro de los múltiples TAFs que conforman al TFIID, TAF1 es uno de sus principales componentes que puede unirse de manera efectiva al promotor, pues posee un dominio de unión al DNA y como lo muestra la criomicroscopía reportada por Patel et al., en 2019. En ella, el módulo de TAF1-TAF7 interactúa directamente con el DPE; además fue demostrado por Jordan y Pugh en 2005 que el dominio de unión al promotor es importante para que se pueda dar la transcripción de los genes dependientes de TFIID. Estos datos apoyan al análisis realizado y sustentan los parámetros utilizados.

9.4 Análisis del efecto distintivo de la Apigenina sobre la viabilidad celular en células en presencia y ausencia de E2 de VPH16.

En cuanto al ensayo de viabilidad que se realizó para determinar la toxicidad de Apigenina, se tomaron en cuenta ensayos reportados previamente para determinar el

rango de concentraciones; en los reportes de Souza et al., 2017, Park et al., 2021, Maggioni et. al., en 2013, Zheng e 2004, se realizaron pruebas de viabilidad utilizando concentraciones desde 10 hasta 100uM de Apigenina; los ensayos se realizaron en células C-33A, HaCaT y HeLa. Particularmente, para el estudio realizado en células C-33A por Souza et al., reportan una reducción de la viabilidad del 40% utilizando 100µM a las 24h; en contraste con los resultados obtenidos en éste trabajo, la viabilidad de células C-33A-WT se reduce entre el 30 y 40% cuando se utiliza desde 60 hasta 100µM, sin embargo no se reduce más allá del 40%.

La viabilidad celular se ve afectada debido a que en diferentes investigaciones se ha abordado el uso de Apigenina como inductor de muerte celular y modulador del ciclo celular; entre las actividades que realiza se encuentra la regulación negativa de la expresión de ciclinas A, B, D1, D2 y E, además de la modulación de proteínas pro-apoptóticas como Bcl y Bax (Xiaohui, et al., 2017).

Por otra parte, en el tratamiento de células C-33A-E216, el descenso en la viabilidad del 40% de la población se observa desde los 40µM, y continúa disminuyendo hasta 50% en las células tratadas con 100µM durante 24 h. Esta diferencia entre la reducción de viabilidad mayor en células que expresan E2 puede deberse a que de forma independiente de la apigenina, E2 puede inducir muerte celular por apoptosis como lo indica el estudio realizado por Fuentes-Gonzalez et al., en 2018 donde evalúa la viabilidad de células transfectadas con E2 de VPH18 y observa una reducción significativa de la viabilidad de células C-33A comparadas con aquellas transfectadas con un plásmido control, además detectaron a través de la anexina V, 29.4% de células apoptóticas en aquellas transfectadas con E2. Así mismo, en otro análisis realizado por Thierry y Demeret en 2008, se observó que en células Saos-2 transfectadas con un adenovirus de E2 de VPH18 es capaz de activar a través de la oligomerización a la caspasa 8, la molécula iniciadora de la vía extrínseca de la apoptosis.

9.5 Análisis de la reducción de la actividad quinasa de TAF1: reducción de P53 fosforilada

Para el presente análisis se utilizó la proteína p53 fosforilada como una referencia para detectar el estado de TAF1; éste mismo estudio había sido abordado por Heng Hong et., al., quienes detectaron a través de un análisis de fosforilación *in vitro* que TFIID y TAF1 pueden fosforilar específicamente al residuo T55 de p53. De igual modo, se realizó un experimento donde se expuso a células U2OS a 40µM de Apigenina y se resolvió que eran suficientes para inhibir la fosforilación específica de este residuo. Esta misma observación fue reportada por Wu et., al. en células HUVEC y HAEC tratadas con 30 µM de Apigenina. Además, de manera interesante Cai y Lui en 2008 señalaron que la fosforilación de la T55 podía ser reducida de manera muy significativa y de manera equiparable al utilizar Apigenina o un RNA de interferencia para TAF1. Juntos, estos estudios sustentan el uso de Apigenina como un inhibidor de la actividad quinasa de TAF1 y denotan que T55 de p53 es un blanco específico de dicha función.

Posteriormente en nuestro estudio, se realizó el ensayo para determinar la concentración ideal de Apigenina para reducir la actividad quinasa de TAF1. Los resultados obtenidos mostraron que es necesaria una concentración de Apigenina mayor para reducir significativamente la marca de T55 en células C-33A-E216. Esto puede explicarse debido a que E2 puede unirse a TAF1 *in vivo* (Olejnik-Schmidt, et al., 2008), si ambas moléculas están interactuando, posiblemente la Apigenina tenga menor disponibilidad para unirse directamente a TAF1 y deshabilitar su actividad quinasa; anteriormente ha sido demostrado que la Apigenina puede asociarse a otras proteínas celulares, por ejemplo Choudhury et al., en 2013 demostraron que la Apigenina al igual que la Curcumina pueden unirse a la tubulina; igualmente Yosuke et al., en 2013 indicaron que la Apigenina puede unirse a la proteína ribosomal RPS9, lo que desencadena una disminución de la expresión de la CDK1. Interesantemente, en un reciente artículo de Waihenya et al., 2021 muestran a través de un estudio de docking molecular, que la Apigenina puede unirse al DNA de doble cadena y que el complejo se estabiliza a través de puentes de hidrógeno; este hecho sitúa a la

Apigenina dentro del núcleo e incrementa la posibilidad de que pueda interactuar con TAF1 directamente, no obstante, se necesita un análisis más profundo para determinar que la unión apigenina-TAF1 es posible.

9.6 Análisis de la reducción de la actividad quinasa de TAF1: disminución de la expresión de ciclinas D y A.

Para obtener otra forma de comprobación de que la Apigenina había reducido la actividad quinasa de TAF1 se analizaron dos genes cuya transcripción dependiera de TAF1: La ciclina D y la ciclina A. Esto fue previamente reportado por Kloet et al., en 2012 a través de un ensayo de expresión donde, al transfectar a células HeLa con un siRNA dirigido hacia un inhibidor de TAF1, los niveles de mRNA de ciclina D y A aumentaron hasta un 40%. En este estudio, se encontró que al utilizar 60 μ M en células C-33A y C-33A-E216, disminuyó significativamente el nivel de mRNA de Ciclina D, lo que concuerda con lo anteriormente reportado. En contraste, el análisis de expresión de ciclina A para ambos grupos de células resultó en una disminución que, aunque no significativa, coincide con los estudios anteriores. Estos resultados corresponden con el estudio reportado por Choi et al., en 2009 y Shukla et al., 2007, pues al utilizar Apigenina en células tratadas con 40, 50 y 100 μ M de Apigenina se reducen significativamente la expresión de ciclina D y ciclina A.

9.7 Análisis de la modificación de la expresión génica por E2, dependiente de TAF1.

Como se ha mencionado, la proteína E2 además de encargarse del mantenimiento y replicación y expresión del genoma viral, también puede realizar cambios en la célula hospedera a través de la modificación de su expresión génica. En nuestro grupo de trabajo ha sido abordada la pregunta de qué genes y en qué condiciones se pueden

modificar en presencia de E2, y de manera particular, aquellos cambios en la expresión génica en los que la participación de TAF1 pudiera estar involucrada. Hasta ahora, los trabajos previos se han realizado en sistemas celulares en los que el gen TAF1 se encuentra en su forma normal (silvestre) y su expresión y función se encuentra sujeta a los mecanismos de regulación normales en la célula. Dado que se ha comenzado a estudiar la modificación de la expresión que realiza E2 sobre genes TAF1-dependientes, se postuló la idea de que al inactivar la actividad quinasa de TAF1, E2 tendría una actividad distinta sobre la expresión génica.

En este trabajo se comparó la expresión génica entre dos microambientes celulares: uno con TAF1 activo y otro con TAF1 inactivo (en su actividad quinasa) y se observó que en células C-33A-WT la expresión de TAF1, GADD45 y RHOA se modifica cuando disminuye la actividad quinasa de TAF1. En el caso del transcrito correspondiente a TAF1 se observó que su expresión disminuye; este resultado puede explicarse debido a que en condiciones normales TAF1 a través de su actividad quinasa puede fosforilar a su regulador negativo TAF7, y así conserva su actividad como HAT y puede activar promotores TFIID dependientes; sin embargo, cuando TAF1 se encuentra inactivo, TAF7 puede inactivar la función de TAF1, lo que imposibilita la regulación positiva sobre su propia transcripción. Además, es importante recalcar que el uso de Apigenina no solo disminuye la actividad quinasa de TAF1, sino que también disminuye la cantidad de transcrito, lo que afecta directamente la regulación de genes TAF1 dependientes. Nuestros resultados son equiparables a los obtenidos por Heng Hong en 2004, donde muestran que al utilizar Apigenina se reduce la cantidad de proteína de TAF1.

Con el transcrito de GADD45A sucede algo similar pues al inactivar TAF1 se nota una considerable disminución en su expresión, lo que señala una fuerte dependencia de este promotor hacia TAF1; asimismo en la expresión de 14-33-t se observa una pequeña disminución. Este dato puede ser explicado si se toma en cuenta que la expresión de ambos genes es regulada también por la proteína p53. En un contexto celular normal, TAF1 fosforila a p53 en la T55; sin embargo, en este trabajo, se redujo la actividad quinasa de TAF1 lo que disminuyó esta fosforilación. Este evento podría

modificar la actividad de la proteína p53 lo que repercute de forma directa en la expresión de los genes p53 dependientes.

En contraste, el transcrito de P27 no se ve modificado por la inactividad de TAF1, lo que supone que otros factores pueden intervenir y mantener la transcripción de éste. Según los datos obtenidos por PROMO, alrededor de 70 diferentes factores pueden unirse en el promotor de P27 por lo que es altamente probable que algunos de ellos intervengan en este proceso.

Siguiendo con el segundo análisis realizado en células C-33A-E2 en los microambientes con TAF1 activo y TAF1 inactivo, se pudo observar un comportamiento similar entre los transcritos de TAF1, P27, RHOA y GADD45A, debido a que al inactivar a TAF1 se reduce la expresión de éstos. Esta observación indica que E2 puede realizar una modificación génica a través de TAF1 porque cuando se encuentra inactivo, el patrón de expresión se modifica significativamente en todos los genes evaluados. Además, el resultado señala que E2 puede aumentar la expresión de estos genes a través de TAF1, dado que cuando se encuentra inactivo la expresión disminuye. Esto va acorde al análisis posteriormente realizado donde se muestra que en células que expresan E2 en comparación con las WT, incrementa la expresión de P27, RHOA y GADD45A.

La observación particular de P27 concuerda con lo reportado por Sánchez-Ramos en 2019 donde se ve un aumento de P27 a nivel de mRNA y proteína en presencia de E2 de VPH16. Además, en el presente estudio se confirmó que GADD45A y RHOA también aumentan su expresión de manera significativa en las células C-33A-E216; este resultado fue similar al obtenido por García-Venzor en 2013; no obstante, en el transcrito correspondiente a 14-33-T cuya expresión había sido previamente reportada como incrementada, en este análisis se encontró una actividad contraria pues se ve una disminución en la expresión.

El hecho de que E2 modifique a través de TAF1 la expresión de este grupo de genes celulares puede traer consecuencias biológicas importantes ya que cada uno de ellos interviene en puntos importantes de diversas vías de señalización; por su parte, el gen

GADD45A (llamado así por sus siglas en inglés Growth Arrest and DNA Damage inducible alpha) es un miembro de un grupo de genes que se sobre-expresa en condiciones de estrés celular y daño al DNA. En cuanto al gen 14-3-3-t, pertenece a la familia de las proteínas 14-3-3- cuyas funciones se dan en parte gracias a su habilidad de unirse a motivos estructurales fosforilados de hasta 200 proteínas específicas; su actividad biológica dentro del ciclo celular está dada debido a que interacciona con cdc25, además puede interactuar con proteínas pro-apoptóticas como BAD, FKHLR1 y Ask1; al igual que GADD45A, regula la respuesta al daño celular. Otra proteína involucrada en procesos similares es p27 que inhibe la actividad del complejo ciclina A/cdk2 que participan en la transición de la fase S a la fase G2. Por otro lado, RhoA es una proteína que puede unirse a proteínas que regulan la dinámica del citoesqueleto y también es necesaria para la formación de un anillo contráctil durante la citocinesis.

En el presente estudio se pudieron encontrar diferencias en la expresión génica en los cuatro escenarios presentados: C-33A-WT con TAF1 activo, C-33A-WT con TAF1 inactivo, C-33A-E2 con TAF1 activo y C-33A-E2 con TAF1 inactivo, lo que nos lleva a concluir que la diferencia en los cambios que realiza E2 sobre la expresión de genes radica en el estado activo o inactivo del factor de transcripción TAF1. Esta observación denota que E2 puede modificar la expresión génica a través de TAF1.

X. CONCLUSIONES

1. Se identificó un grupo de genes involucrados en la modulación del ciclo celular, cuya expresión está regulada por E2 de VPH y son transcritos por TAF1.
2. Se determinó la concentración óptima de apigenina para reducir la actividad quinasa de TAF1 sin afectar a más del 50% la viabilidad celular en nuestro modelo de estudio.
3. Se observó un cambio en la expresión génica entre los microambientes celulares con TAF1 activo e inactivo que demostró que E2 requiere a TAF1 para regular la expresión de los genes estudiados. genes celulares.

XI. PERSPECTIVAS

1. Analizar la expresión génica modificada por E216 en un microambiente celular en donde TAF1 se encuentre deficiente a través de un sistema de silenciamiento génico.
2. Realizar un meta-análisis para determinar que otros genes dependientes de TAF1 se encuentran modificados por E2.
3. Determinar a través de ensayos de modelado molecular si la apigenina puede unirse directamente a TAF1 o a otras moléculas que puedan modificar su expresión o actividad.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Sociedad Americana contra el Cancer. (2016). Aspectos básicos sobre el cancer. Retrieved from <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>
2. Organización Mundial de la Salud. (2021.). Cancer: Datos y cifras. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
3. Organización Mundial de la Salud. (2018). Cancer Today. Estimated Age-Standardized Incidence Rates (World) in 2018, All Cancers, Both Sexes, All Ages.
4. Organización Mundial de la Salud. (2018). Globo can 2018: México. Number of New Cases in 2018, Females, All Ages. Number of new cases in 2018, females, all ages
5. Alberts, B. (2010). *Biología molecular de la célula* (5ta ed.). Ediciones Omega.
6. Aldridge, r., naysmith, l., ee ting, o., murray, c., & Jonathan, L. (2013). Europe PMC Funders Group. *Acta Derm Venereol*, 93(6), 719–724. <https://doi.org/10.1038/nature07943>.
7. Organización Mundial de la Salud. (2018). Latest global cancer data. Retrieved from <https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>
8. Hausen, H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*, 384(2), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.046>
9. Prendivile, W. (2004) . *HPV handbook, In human papillovavirus and cervical cancer*; Taylor & Francis Group.
10. Cobo, F. (2012). Human Papillomavirus Infections From the laboratory to clinical practice. Woodhead Publishing.
11. Leto, M. D. G. P., Santos Júnior, G. F. Dos, Porro, A. M., & Tomimori, J. (2011). Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(2), 306–317. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000200014>
12. Aksoy, P., Gottschalk, E. Y., & Meneses, P. I. (2017). Mutation Research / Reviews in Mutation Research HPV entry into cells. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 772, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.09.004>
13. Tommasino, M. (2013). The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.11.002>
14. Van Doorslaer, K., Chen, Z., Bernard, H., Chan, P.K.S, DeSalle, R., Dillner, J., Forslund, O., Haga, T., McBride, A.A., Villa, L.L., Burk, R.D., and ICTV Report Consortium. 2018, [ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae](https://doi.org/10.1016/j.jgv.2018.09.004), *Journal of General Virology*, 99, 989–990.
15. Horvath CAJ, Boulet GAV, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers J-PJ. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Viol J*. 2010;7:11-.

16. Zheng Z-M, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006;11:2286-302.
17. Santos-López, G., Márquez-Domínguez, L., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2015). General Aspects of Structure, Classification and Replication of Human Papillomavirus., 53(244), S166–S171.
18. Miller, D., & Stack, M. (2015). *Human Papillomavirus (HPV) Associated Oropharyngeal Cancer.* Springer. Retrieved from
19. Yin, F., Wang, Y., Chen, N., Jiang, D., Qiu, Y., Wang, Y., ... Liu, Y. (2017). A novel trivalent HPV 16/18/58 vaccine with anti-HPV 16 and 18 neutralizing antibody responses comparable to those induced by the Gardasil quadrivalent vaccine in rhesus macaque model. *Papillomavirus Research*, 3(February), 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2017.02.005>
20. Nubia Muñoz, M.D., F. Xavier Bosch, M.D., Silvia de Sanjosé, M.D., Rolando Herrero, M.D., Xavier Castellsagué, M.D., Keerti V. Shah, Ph.D., Peter J.F. Snijders, Ph.D., and Chris J.L.M. Meijer, M. . (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer, 518–527.
21. Hausen, H. (2002). PAPILOMAVIRUSES AND CANCER : FROM BASIC STUDIES TO CLINICAL APPLICATION, 2(May), 342–350. <https://doi.org/10.1038/nrc798>
22. Harari, A., & Burk, R. D. (2014). Human Papillomavirus Genomics : Past , Present and Future, 45, 1–18. <https://doi.org/10.1159/000355952>
23. Spalholz, B. A., Yang, Y., & Howley, P. M. (1985). Transactivation of a Bovine Papilloma Virus Transcriptional Regulatory Element by the E2 Gene Product, 42(August), 183–191.
24. Ustav, M., & Steniund, A. (1991). Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames, 10(2), 449–457.
25. Dell, G., & Gaston, K. (2001). Contributions in the domain of cancer research: Review human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(12–13), 1923–1942. <https://doi.org/10.1007/PL00000827>
26. Giri, I., & Yaniv, M. (1986). Structural and mutational analysis of E2 transactivating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains, 7(9), 2823–2829. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03138.x>
27. Androphy EJ, Lowy DR, Schiller JT. Bovine papillomavirus E2 transactivating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature.* 1987;325(6099):70-73. doi:10.1038/325070a0
28. Muller, M. (2013). The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions: A Complex Hijacking of the Cellular Network. *The Open Virology Journal*, 6(1), 173–189. <https://doi.org/10.2174/1874357901206010173>
29. Sedman, J., & Steniund, A. (1995). Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro, 14(24), 6218–6228.

30. Dowhanick, J. J., Bride, A. A. M. C., & Howley, P. M. (1995). Suppression of Cellular Proliferation by the Papillomavirus E2 Protein, 69(12), 7791–7799.
31. Bouvard, V., Storey, A., Pim, D., & Banks, L. (1994). Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation, 13(22), 5451–5459.
32. Dong, G., Broker, T. R., & Chow, L. T. (1994). Human Papillomavirus Type 11 E2 Proteins Repress the Homologous E6 Promoter by Interfering with the Binding of Host Transcription Factors to Adjacent Elements, 68(2), 1115–1127.
33. Ilves, I., & Kivi, S. (1999). Long-Term Episomal Maintenance of Bovine Papillomavirus Type 1 Plasmids Is Determined by Attachment to Host Chromosomes , Which Is Mediated by the Viral E2 Protein and Its Binding Sites, 73(5), 4404–4412.
34. Morgan, D. (2007). *The cell cycle: Principles of control.* (N. S. Press, Ed.).
35. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach.* 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. *The Eukaryotic Cell Cycle.* Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>
36. Schafer, K. A. (1998). Cell Cycle: A Review. *Vet Pathol*, 35, 461–478.
37. Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm, 9(mArCH). <https://doi.org/10.1038/nrc2602>
38. Murray, A. W. (2004). Recycling the Cell Cycle : Cyclins Revisited, 116, 221–234.
39. Vermeulen, K., Bockstaele, D. R. Van, & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle : a review of regulation , deregulation and therapeutic targets in cancer, 131–149.
40. Visconti, R., Monica, R. Della, & Grieco, D. (2016). Cell cycle checkpoint in cancer : a therapeutically targetable double-edged sword. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0433-9>
41. Sherr, C. J., & Bartek, J. (2017). Cell Cycle – Targeted Cancer Therapies. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-040716-075628>
42. Wang, H., Curran, E. C., Hinds, T. R., Wang, E. H., & Zheng, N. (2014). Crystal structure of a TAF1-TAF7 complex in human transcription factor IID reveals a promoter binding module. *Nature Publishing Group*, 24(12), 1433–1444. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.148>
43. Verrijzer, C. P., Chen, J., Yokomori, K., & Tjian, R. (1995). Binding of TAFs to Core Elements Directs Promoter Selectivity by RNA Polymerase II, 81, 1115–1125.
44. Dikstein, R., Ruppert, S., Tjian, R., & Hall, B. (1996). TAF II 250 Is a Bipartite Protein Kinase That Phosphorylates the Basal Transcription Factor RAP74, 84, 781–790.
45. Kloet, S. L., Whiting, J. L., Gafken, P., Ranish, J., & Wang, E. H. (2012). Phosphorylation-Dependent Regulation of Cyclin D1 and Cyclin A Gene Transcription by TFIID Subunits TAF1 and TAF7, 32(16), 3358–3369. <https://doi.org/10.1128/MCB.00416-12>

46. O'Brien, T., & Tjian, R. (1998). Functional analysis of the human TAFII250 N-terminal kinase domain. *Molecular Cell*, 1(6), 905–911. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80089-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80089-1)
47. Sekiguchi, T., Noguchi, E., Hayashida, T., Nakashima, T., Toyoshima, H., Nishimoto, T., & Hunter, T. (1996). D-type cyclin expression is decreased and p21 and p27 CDK inhibitor expression is increased when tsBN462 CCG1 / TAF II 250 mutant cells arrest in G1 at the restrictive temperature, (1993), 687–705.
48. Heng-Hong., Li, A. G., Sheppard, H. M., & Liu, X. (2004). Phosphorylation on Thr-55 by TAF1 Mediates Degradation of p53 : A Role for TAF1 in Cell G1 Progression, 13, 867–878.
49. 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, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-247>
50. Desaintes, C., & Demeret, C. (1997). Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis ation of the protein and its specific binding to DNA. *The EMBO Journal*, 16(3), 504–514. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1169654/pdf/000504.pdf>
51. Olejnik-Schmidt, A. K., Schmidt, M. T., Kędzia, W., & Goździcka-Józefiak, A. (2008). Search for cellular partners of human papillomavirus type 16 E2 protein. *Archives of Virology*, 153(5), 983–990. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0061-6>
52. Carrillo, E., Garrido, E., & Gariglio, P. (2004). Specific in vitro interaction between papillomavirus E2 proteins and TBP-associated factors. *Intervirology*, 47(6), 342–349. <https://doi.org/10.1159/000080878>
53. Centeno, F., Ramírez-Salazar, E., García-Villa, E., Gariglio, P., & Garrido, E. (2008). TAF1 interacts with and modulates human papillomavirus 16 E2-dependent transcriptional regulation. *Intervirology*, 51(2), 137–143. <https://doi.org/10.1159/000141706>
54. García Venzor, A. (2013). Efecto de la interacción de la proteína E2 de VPH16 con el factor TAF1 sobre su unión a promotores celulares. *CINVESTAV*.
55. ALDRIDGE, R., NAYSMITH, L., Ee Ting, O., MURRAY, C., & Jonathan, L. (2013). Europe PMC Funders Group. *Acta Derm Venereol*, 93(6), 719–724. <https://doi.org/10.1038/nature07943>.The
56. Muller, M. (2013). The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions: A Complex Hijacking of the Cellular Network. *The Open Virology Journal*, 6(1), 173–189. <https://doi.org/10.2174/1874357901206010173>
57. Cai, X., & Liu, X. (2008). Inhibition of Thr-55 phosphorylation restores p53 nuclear localization and sensitizes cancer cells to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(44), 16958–16963. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804608105>
58. Choi, E. J., & Kim, G. H. (2009). Apigenin causes G2/M arrest associated with the modulation of p21Cip1 and Cdc2 and activates p53-dependent apoptosis pathway in human breast cancer SK-BR-3 cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(4), 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.03.005>
59. Fuentes-González, A. M., Muñoz-Bello, J. O., Manzo-Merino, J., Contreras-Paredes, A., Pedroza-Torres, A., Fernández-Retana, J., Pérez-Plasencia, C., &

- Lizano, M. (2019). Intratype variants of the E2 protein from human papillomavirus type 18 induce different gene expression profiles associated with apoptosis and cell proliferation. *Archives of Virology*, *164*(7), 1815–1827. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-04124-6>
60. Gauson, E. J., Windle, B., Donaldson, M. M., Caffarel, M. M., Dornan, E. S., Coleman, N., Herzyk, P., Henderson, S. C., Wang, X., & Morgan, I. M. (2014). Regulation of human genome expression and RNA splicing by human papillomavirus 16 E2 protein. *Virology*, *468–470*, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.07.022>
61. Li, H. H., Li, A. G., Sheppard, H. M., & Liu, X. (2004). Phosphorylation on Thr-55 by TAF1 mediates degradation of p53: A role for TAF1 in cell G1 progression. *Molecular Cell*, *13*(6), 867–878. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00123-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00123-6)
62. Jang, M. K., Kwon, D., & McBride, A. A. (2009). Papillomavirus E2 Proteins and the Host Brd4 Protein Associate with Transcriptionally Active Cellular Chromatin. *Journal of Virology*, *83*(6), 2592–2600. <https://doi.org/10.1128/jvi.02275-08>
63. Irvin, J. D., & Pugh, B. F. (2006). Genome-wide transcriptional dependence on TAF1 functional domains. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(10), 6404–6412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513776200>
64. Le, S. N., Brown, C. R., Harvey, S., Boeger, H., Elmlund, H., & Elmlund, D. (2019). The TAFs of TFIID bind and rearrange the topology of the TATA-less RPS5 promoter. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133290>
65. Muller, M., & Demeret, C. (2012). The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions: A Complex Hijacking of the Cellular Network. *The Open Virology Journal*, *6*(Suppl 2: M3), 173–189. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3547520/>
66. Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., Souto, E. B., Novellino, E., Antolak, H., Azzini, E., Setzer, W. N., & Martins, N. (2019). The therapeutic potential of Apigenin. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061305>
67. Souza, R. P., Bonfim-Mendonça, P. D. S., Gimenes, F., Ratti, B. A., Kaplum, V., Bruschi, M. L., Nakamura, C. V., Silva, S. O., Maria-Engler, S. S., & Consolaro, M. E. L. (2017). Oxidative Stress Triggered by Apigenin Induces Apoptosis in a Comprehensive Panel of Human Cervical Cancer-Derived Cell Lines. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/1512745>

68. Sunthamala, N., Thierry, F., Teissier, S., Pientong, C., Kongyingyoes, B., Tangsiriwatthana, T., Sangkomkamhang, U., & Ekalaksananan, T. (2014). E2 proteins of high risk human papillomaviruses down-modulate STING and IFN- κ transcription in keratinocytes. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091473>
69. Thierry, F., & Demeret, C. (2008). Direct activation of caspase 8 by the proapoptotic E2 protein of HPV18 independent of adaptor proteins. *Cell Death and Differentiation*, 15(9), 1356–1363. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.53>
70. Vosa, 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. <https://doi.org/10.1128/jvi.05606-11>
71. Waihenya, S., Şenel, P., Osonga, F. J., Erdoğan, T., Altay, F., Gölcü, A., & Sadik, O. A. (2021). Mechanism of Interactions of dsDNA Binding with Apigenin and Its Sulfamate Derivatives Using Multispectroscopic, Voltammetric, and Molecular Docking Studies. *ACS Omega*, 6(8), 5124–5137. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02612>
72. Yan, X., Qi, M., Li, P., Zhan, Y., & Shao, H. (2017). Apigenin in cancer therapy: Anti-cancer effects and mechanisms of action. *Cell and Bioscience*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0179-x>
73. Cai, X., & Liu, X. (2008). Inhibition of Thr-55 phosphorylation restores p53 nuclear localization and sensitizes cancer cells to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(44), 16958–16963. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804608105>
74. Cross, Sarah J. Linker, Kay E. Leslie, F. M. (2016). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.06.022>.
75. Iizumi, Y., Oishi, M., Taniguchi, T., Goi, W., Sowa, Y., & Sakai, T. (2013). The Flavonoid Apigenin Downregulates CDK1 by Directly Targeting Ribosomal Protein S9. *PLoS ONE*, 8(8), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073219>
76. Sánchez-Ramos, J., Pozo-Molina, G., & Garrido, E. (2020). The expression of the transcription factor TAF1 is modified by the HPV16 E2 protein. *Acta Virologica*, 64(3), 375–379. https://doi.org/10.4149/av_2020_307
77. LOPEZ-VAZQUEZ, I. A. (2016). “Estudio de la relevancia del estado del gen p53 sobre los efectos regulatorios de E2 de VPH-16 en promotores celulares dependientes de TAF-1. CINVESTAV.

78. Poeran. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(12), 139–148. <https://doi.org/10.1038/nature10799>. Genome-wide
79. Juven-Gershon, T., Cheng, S., & Kadonaga, J. T. (2006). Rational design of a super core promoter that enhances gene expression. *Nature Methods*, 3(11), 917–922. <https://doi.org/10.1038/nmeth937>
80. Sugihara, F., Kasahara, K., & Kokubo, T. (2011). Highly redundant function of multiple AT-rich sequences as core promoter elements in the TATA-less RPS5 promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 39(1), 59–75. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq741>
81. Patel, A. B., Greber, B. J., & Nogales, E. (2020). Recent insights into the structure of TFIID, its assembly, and its binding to core promoter. *Current Opinion in Structural Biology*, 61(April), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.10.001>
82. Choudhury, D., Ganguli, A., Dastidar, D. G., Acharya, B. R., Das, A., & Chakrabarti, G. (2013). Apigenin shows synergistic anticancer activity with curcumin by binding at different sites of tubulin. *Biochimie*, 95(6), 1297–1309. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.02.010>