



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Estudio del efecto de E2 de VPH16 sobre la
expresión de genes responsivos a daño al DNA
y su participación en la regulación del ciclo
celular”**

T E S I S

Que presenta

JANET SÁNCHEZ RAMOS

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de tesis:

Dr. José Efraín Garrido Guerrero

Ciudad de México

OCTUBRE, 2022

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Investigación en Biología Molecular y Celular del Cáncer (Laboratorio 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.

Durante el desarrollo de este trabajo, recibí una beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de registro 228869, por lo que manifiesto mi más sincero agradecimiento a esta Institución por el apoyo económico que me permitió realizar los estudios de Doctorado.

AGRADECIMIENTOS.

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

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

INDICE

	Página
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1.- INTRODUCCIÓN	5
1.1 Virus del papiloma humano (VPH)	5
1.2 Proteína E2	11
1.3 Factor de transcripción TAF1	17
1.4 Ciclo celular	21
1.5 Proteína p53	23
2.- ANTECEDENTES	27
3.- JUSTIFICACIÓN	28
4.- HIPÓTESIS	28
5.- OBJETIVOS	28
5.1 Objetivo general	28
5.2 Objetivos específicos	29
6.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
7.- MATERIALES Y MÉTODOS	31
7.1 Cultivo celular	31
7.2 Generación de lentivirus recombinantes	31
7.3 Infección de líneas celulares	32
7.4 Actividad biológica de E2	32
7.5 Tratamiento con doxorubicina	33
7.6 Análisis de ciclo celular	33
7.7 Arresto de ciclo celular	33
7.8 Extracción de RNA y generación de cDNA	34
7.9 Inmunoprecipitación de cromatina (CHIP)	35
7.10 Western Blot	36
8.- RESULTADOS	37

8.1 Líneas celulares con expresión estable de E2 VPH16	37
8.2 Evaluación de la expresión de genes regulados por p53 ante daño al DNA en presencia de E2 VPH16 en contexto p53 ^{+/+}	42
8.3 Evaluación de la expresión de genes regulados por p53 ante daño al DNA en presencia de E2 VPH16 en contexto p53 ^{-/-}	47
8.4 Participación de E2 VPH16 en la regulación del ciclo celular	51
8.4.1 Efecto de E2 en la fase G2/M del ciclo celular	51
8.4.2 Efecto de E2 en la fase G1 del ciclo celular	55
8.4.3 Evaluación de genes asociados a fase G1 del ciclo celular	60
9.- DISCUSIÓN	63
10.- CONCLUSIONES	69
11.- PERSPECTIVAS	70
12.- BIBLIOGRAFÍA	72
13.- APENDICE	80
Secuencia de oligonucleótidos	84
14.- ANEXO	81
Publicación	85

RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino representa la cuarta causa de muerte por cáncer en mujeres en México. El virus de papiloma humano (VPH) está asociado con el desarrollo de este padecimiento; particularmente los VPHs de alto riesgo como VPH16 y VPH18 que se presentan en la mayoría de los casos de cáncer cervical. Entre las proteínas codificadas por este virus, la de expresión temprana E2 controla la replicación, transcripción y segregación del genoma viral durante el ciclo replicativo del virus, adicionalmente modifica la expresión a nivel transcripcional de múltiples genes celulares y de manera reciente ha surgido evidencia de su participación en el control del *splicing* tanto viral como celular. Aunque el papel de E2 en la regulación de la expresión celular ha sido muy estudiado, la participación de E2 en la respuesta a daño al DNA mediada por p53, factor fundamental en la decisión del destino celular (detención de ciclo y/o apoptosis) no ha sido reportada. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que E2 intensifica la expresión de genes responsivos a p53 involucrados en la detención del ciclo celular como p21, posiblemente para permitir la reparación del daño celular. Una observación relevante, fue que en células carentes de expresión de p53, la presencia de E2 eleva la expresión de genes responsivos a p53, lo que confirma el papel de esta proteína viral en proveer un ambiente celular adecuado que permita un ciclo replicativo viral exitoso. Adicionalmente, en concordancia con resultados previos en el grupo de investigación que han mostrado que E2 modifica la expresión del factor de la maquinaria de transcripción general TAF1, observamos incremento de este importante factor, relacionado con la regulación del ciclo celular entre otros procesos. Asimismo, la expresión de p27 (regulador negativo del ciclo celular y blanco de TAF1) sufre aumento tanto a nivel de RNA mensajero como de proteína, lo que se traduce en la transición y salida más lenta por la fase G1 del ciclo celular en células que expresan E2.

ABSTRACT

Cervical cancer represents the fourth cause of death by cancer in woman in Mexico and the human papillomavirus (HPV) is associated with the development of this disease; particularly the high-risk HPV's such as HPV16 and HPV18 are present in most of the cases of cervical cancer. Among the proteins encoded for this virus, the early expressed E2 controls the replication, transcription and segregation of the viral genome during the replicative cycle of the virus; additionally, it modifies the expression at transcriptional level of multiple cellular genes and recently there has been accumulated evidence of the participation of E2 in the control of viral and cellular mRNA *splicing*. Although in some cases the modification of cellular gene expression by E2 occurs by the binding of the protein to recognition sites present in the promoter region of these genes, the interaction of E2 with cellular proteins is the main mechanism used for this viral protein to modify the cellular gene expression. Although the role of E2 in the cellular gene expression has been widely studied, the participation of this viral protein in the DNA damage response mediated by p53, a fundamental factor in the decision of the cellular fate (cell cycle arrest the cell cycle or apoptosis) has not been reported. The results obtained in this work suggest that E2 intensify the expression of p53 responsive genes involved in the arrest of the cell cycle (such as p21), possibly to allow the cellular process of DNA repair in response to damage. An interesting observation in this work was that in cells where p53 is absent, the presence of E2 in the cells, increases the expression of p53 responsive genes, confirming the role of this viral protein to promote a cellular environment convenient to allow a successful replicative cycle. In agreement with previous reports in our research group showing that E2 modifies the expression at mRNA level of the general transcription factor TAF1, we observed a considerable increase in the protein level of this important factor related with the regulation of the cell cycle, among other cellular processes. In this way, the expression of p27 (negative regulator of the cell cycle and target of TAF1) increases at mRNA and protein level, leading to a slower transition and exit from the cell cycle G1 phase in cells expressing E2.

1.- INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el cáncer cérvico-uterino en México representa la segunda causa de muerte en mujeres de entre 30 a 59 años [1]. Entre los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de este padecimiento se encuentra la infección por el virus del papiloma humano (VPH), particularmente los de alto riesgo u oncogénicos, destacando el VPH16 y VPH18, ya que se presentan en cerca del 50% y 20% (respectivamente) de los casos de cáncer cervical, pudiendo co-infectar con otros tipos oncogénicos como VPH 31, 33, 35, 45, 52 y 58 [2].

El cáncer cervical se produce en el epitelio del cérvix en la unión escamo-columnar del ecto- y endocervix, un sitio de continua actividad metaplásica. La infección persistente con uno o más tipos de VPHs oncogénicos lleva al desarrollo de lesiones precancerosas que si no son atendidas pueden progresar lentamente a la formación de carcinoma cervical invasivo en un periodo de entre 10 a 20 años. Sin embargo, un número de lesiones cervicales causadas por la infección de VPH se limpian de manera espontánea evitando su progresión a cáncer [3].

1.1 Virus del Papiloma Humano (VPH)

Los papilomavirus engloban a un grupo diverso de virus que infectan tanto a humanos como a otros mamíferos; son virus de DNA de doble cadena, de entre 52-55 nm de diámetro, no envueltos, con cápside icosaédrica, y epiteliotrópicos, lo que significa que generan infecciones productivas en epitelio estratificado de la piel, cavidad oral y tracto anogenital. La infección de las células de la capa basal del epitelio inicia el ciclo de vida viral, el cual está asociado al proceso de diferenciación de la célula epitelial infectada [4]. Los tipos de VPH16 y VPH18, asociados con cáncer cervical y otros tumores invasivos son conocidos como “virus de alto riesgo u oncogénicos”. En

contraste los “virus de bajo riesgo” como VPH6 o VPH11 se encuentran principalmente en verrugas [5].

El genoma viral de aproximadamente 8 kilobases se ha dividido en tres regiones para su estudio: la región larga de control (LCR) o región reguladora río arriba (URR), la cual contiene sitios de unión para factores de transcripción tanto celulares como virales, que regulan la expresión de los genes del virus después de la infección; alberga el origen de replicación, y en gran parte es responsable del tropismo de cada tipo de VPH. La región temprana denotada como “E” (*early*) consta de seis marcos de lectura abierta (ORFs): E1, E2, E4, E5, E6, E7. Los genes *E1*, *E2*, *E6* y *E7* se expresan como transcrito policistrónico que sufre *splicing* alternativo; los productos de esta región actúan como reguladores de la replicación del DNA viral, transcripción o carcinogénesis. Finalmente, la región tardía “L” (*late*) está constituida por los ORFs *L1* y *L2*, que codifican para proteínas estructurales constituyentes de la cápside [6], [7]. En la figura 1 se esquematiza el genoma de VPH16 y en tabla 1 se resumen algunas de las actividades de las proteínas virales.

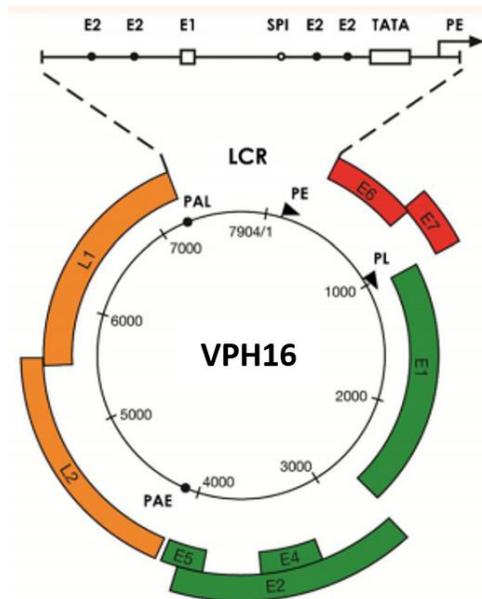


Figura 1. Estructura del genoma viral. El genoma del virus tiene un tamaño aproximado de 8 kilobases. Los oncogenes virales E6 y E7 se muestran en rojo, mientras que los genes E1,

E2, E4, E5 en color verde; su expresión cambia durante las distintas etapas de diferenciación del epitelio. La expresión de L1 y L2 es regulada por el promotor tardío en capas superiores del epitelio. En la imagen se observa el promotor temprano (PE/p97), tardío (PL/p670), sitio temprano de poli-adenilación (PAE), tardío (PAL) y la Región Larga de Control (LCR) con cuatro sitios de unión para E2, un sitio SP1, caja TATA y el promotor temprano (PE), modificado de Ewaga N. et al 2015.

Las proteínas virales E1 y E2 participan en la replicación del genoma viral, dependiendo de la DNA polimerasa y del resto de la maquinaria celular. E1 funciona como helicasa empleando ATP, capaz de abrir la doble cadena de DNA previo a la polimerización de DNA. E1 y E2 forman un heterodímero en el origen de replicación viral para iniciar la síntesis del genoma de manera bidireccional. Se sabe que cada célula de la capa basal contiene entre 20 y 100 copias del DNA viral después de la infección [5]. De manera reciente se ha demostrado que E1 y E2 funcionan también en la respuesta temprana frente a daño al DNA, contribuyendo a generar un ambiente permisivo para la replicación del genoma viral.

Las proteínas E5, E6 y E7 poseen propiedades transformantes, siendo importantes tanto para la replicación viral como en la tumorigénesis. Los genes de expresión tardía L1 y L2 participan en la maduración de viriones, regulando su auto-ensamblaje que empaqueta el genoma para la liberación en la parte superior del epitelio. Durante las etapas de pre-cáncer a cáncer las proteínas L1 y L2 no se expresan [6].

Tabla 1. Resumen de actividades de las proteínas virales.

Proteína	Actividades
E1	Helicasa dependiente de ATP. Participa en la replicación del genoma
E2	Co-activador de la replicación del genoma viral mediante el reclutamiento de E1 al origen de replicación viral. Factor de

	transcripción que regula la expresión de los oncogenes E6 y E7. Participa en la segregación del genoma viral.
E4	La proteína está codificada dentro del gen E2 y se expresa de manera abundante como fusión E1 ^{E4} ; su expresión se restringe a etapas tardías del ciclo de vida viral. Se une a filamentos de citoqueratinas rompiendo su estructura, contribuyendo a la liberación del virus y por ende a la re-infección.
E5	Proteína transmembranal, que interactúa con el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF), activando vías mitogénicas. Participa en la evasión de la respuesta sistema inmune y apoptosis. Los géneros virales Beta, Gama y Mu no presentan E5.
E6	Permite la entrada al ciclo celular y amplificación del genoma en las capas superiores del epitelio. E6 de papilomavirus de alto riesgo se une y degrada a p53, además de activar la expresión de la telomerasa contribuyendo a la transformación.
E7	De manera similar a E6, contribuye a la amplificación del genoma en capas superiores del epitelio, E7 interactúa con la proteína supresora de tumores pRB coadyuvando en la inestabilidad genómica, haciéndola necesaria para la transformación celular.
L1	Principal proteína de la cápside se ensambla en capsómeros pentaméricos.
L2	Proteína menor de la cápside que contribuye en el ensamblaje del virus, facilita la entrada del virus y el tráfico al núcleo.

Modificado de: Egawa N., et al., 2015.

La infección por papilomavirus ocurre cuando el virus tiene acceso a las células de la capa basal, entre las cuales se encuentran las células troncales; las micro-abrasiones en la superficie del epitelio favorecen la entrada del virus. La renovación del tejido epitelial se logra por la proliferación de las células troncales presentes como progenitores epiteliales tempranos en la capa basal,

produciendo células de amplificación transitoria que tienen capacidad proliferativa limitada, para que posteriormente entren a diferenciación terminal. Una vez comprometidas a diferenciación, estas células son propulsadas a la superficie debido a la producción de nuevas células debajo de ellas, eventualmente se pierden en la superficie epitelial como escamas diferenciadas terminalmente. Este movimiento ocurre en un corto periodo de tiempo, como sucede con la infección productiva de papilomavirus [2].

Una vez internalizados en la célula, los viriones son sometidos a transporte endosómico; el complejo proteína viral L2-DNA asegura la entrada del DNA viral al núcleo, mientras que la proteína L1 (constituyente de la cápside) es retenida en el endosoma para ser degradada vía lisosomal. Una vez en el núcleo, se inicia la expresión controlada de los genes tempranos *E1* y *E2* en células de la capa basal llevando a la replicación y amplificación del genoma viral, manteniendo en promedio 100 episomas por célula. En la zona media y superficial del epitelio los productos de los genes tempranos *E5*, *E6* y *E7* prolongan el ciclo celular, favoreciendo la proliferación y afectando la apoptosis debido a que la diferenciación de la célula epitelial genera un ambiente poco favorable para la replicación viral. L1, L2 y E4 se expresan en células que han madurado en la capa superior del epitelio, donde el ensamblaje viral toma lugar y los viriones son liberados a partir de células totalmente diferenciadas en la superficie del epitelio. La liberación de las partículas puede iniciar un nuevo ciclo infeccioso (Figura 2) [3].

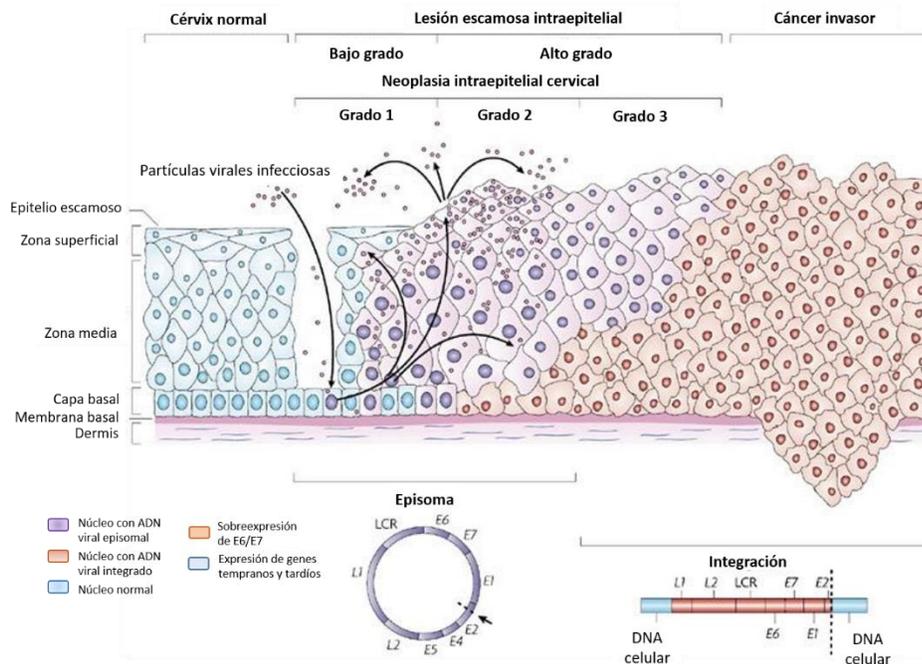


Figura 2. Ciclo de vida de VPH y cambios asociados en el epitelio. Se ilustran las distintas capas del epitelio cervical (capa basal, media y superficial), la entrada del virus a la capa basal del epitelio ocurre por microabrasiones del epitelio, la producción y liberación de viriones en capas superiores. El DNA viral se mantiene como episoma durante la infección productiva (color morado). Generalmente en células cancerosas el genoma viral está integrado en el genoma de la célula hospedera (núcleos de color rojo). Modificado de Ciaran B. J. Woodman et al. 2007

En células transformadas por VPH, el genoma viral, que es mantenido como episoma se integra en el genoma hospedero. El evento de integración ocurre al azar dejando a la región de los oncogenes E6 y E7 intacta, de esta forma se mantiene su expresión. Es importante mencionar que la integración no es parte del proceso normal del ciclo de vida del virus y en las etapas iniciales de las tumorigénesis, la co-existencia del genoma viral episomal e integrado es frecuente; sin embargo, en etapas tardías la presencia de la forma episomal es menos frecuente. El número de genomas de VPH integrado es variable entre tumores. La integración ocurre en distintos sitios dentro del genoma celular, el rompimiento del genoma viral con frecuencia ocurre dentro del gen E2, llevando a la pérdida de su expresión y regulación de los oncogenes E6 y

E7. La pérdida de la proteína E2 parece jugar un papel central en la tumorigénesis inducida por VPH [5].

1.2 Proteína E2

La proteína viral E2 es importante tanto en la infección productiva como en la infección persistente. Dependiendo del tipo viral, está constituida por entre 350 y 500 aminoácidos aproximadamente, dividida en dos dominios funcionales: la región amino terminal (N-ter) cuenta con alrededor de 200 aminoácidos y contiene al dominio de transactivación (TAD), mientras que en la región carboxilo terminal (C-ter) se encuentra el dominio de unión al DNA (DBS) y dimerización, de aproximadamente 100 aminoácidos; estos dominios están unidos por una región no estructurada, poco conservada y de longitud variable entre los genotipos de VPH, denominada región bisagra (Figura 3)[5], [8].

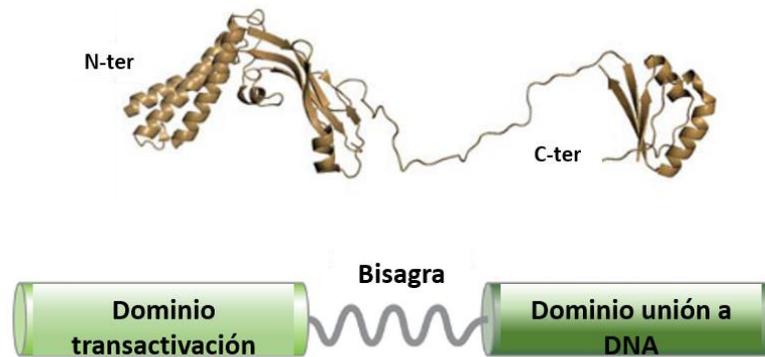


Figura 3. Estructura de la proteína E2. El dominio de transactivación (TAD) y el dominio de unión al DNA (DBD) están conservados en papilomavirus mientras que la secuencia entre ellas es variable y poco conservada (región bisagra). Modificado de Muller 2012.

El dominio de unión al DNA de E2 tiene la clásica estructura tridimensional, con homología a otros factores de transcripción, considerado prototipo entre los factores de regulación viral. Este dominio contiene tanto una interfase de

dimerización, como aminoácidos que contactan con el DNA. La proteína E2 se une al DNA como homodímero reconociendo de manera específica la secuencia palindrómica ACCGN₄CGGT denominada sitio de unión para E2 (E2BS), donde N representa cualquier nucleótido. Dentro de la LCR en todos los papilomavirus se localizan al menos cuatro sitios E2BS [8], convirtiendo a esta proteína en el principal regulador transcripcional de papilomavirus. La unión de E2 a sus sitios de reconocimiento puede activar o reprimir la transcripción dependiendo de la posición del sitio, pero también de algún factor celular al cual E2 se encuentre unido. Cuando E2 se une a los sitios distales en la LCR puede activar la transcripción, mientras que si la unión ocurre en sitios proximales al sitio de iniciación de la transcripción, E2 reprime la actividad transcripcional. El mecanismo de represión involucra el desplazamiento o impedimento estérico de E2 hacia factores celulares como SP1 y TFIID, ya que los E2BS se encuentran muy cercanos tanto al sitio de reconocimiento para SP1 como a la caja TATA [9]. Se ha propuesto que en las etapas iniciales de la infección los niveles bajos de E2 pueden favorecer su unión con alta afinidad a los E2BS distales, lo que resulta en la activación transcripcional del promotor que permite la expresión de E6 y E7 [5].

La proteína E2 participa en la replicación inicial del DNA del virus, llevando a la helicasa E1 al origen de replicación viral que contiene un sitio de unión para esta proteína (región rica en A/T) y un sitio de unión para la propia proteína E2. La proteína E2 une el DNA viral a cromosomas hospederos para facilitar su retención, mantenimiento y segregación a las células hijas [9]. Otro mecanismo por el que E2 asegura la repartición del genoma viral a células hijas es a través de la interacción con proteínas celulares llamadas proteínas adaptadoras, una de las más estudiadas es la proteína celular BRD4. Mediante el dominio de unión al DNA, E2 interactúa con los E2BS presentes en el genoma viral y a través de otras regiones como el TAD, se sujeta a cromosomas mitóticos (Figura 4) [10].

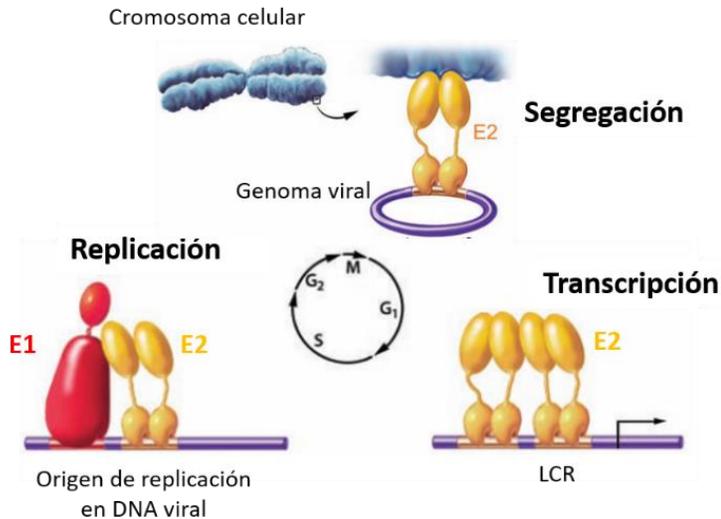


Figura 4. Actividades de la proteína E2 en la biología del virus. La proteína E2 participa en la segregación del DNA viral a células hijas durante la mitosis, en la replicación del genoma viral en heterodímero con E1 y en la regulación transcripcional de los oncogenes E6/E7. Proteína E1 (rojo), E2 (amarillo), genoma viral (morado) y cromosoma celular (azul). Modificado de McBride A. A. 2006.

De manera similar a otras proteínas virales, E2 ejerce su función al interactuar con diferentes proteínas celulares regulando la expresión de genes virales, la segregación del genoma viral, su replicación, adicionalmente proporciona condiciones celulares favorables para el virus.

1.2.1 Proteína E2 en la regulación expresión de genes celulares

Se ha descrito que E2 regula la expresión de un amplio número de genes celulares, en algunos casos, mediante su unión a sitios de reconocimiento presentes en el genoma celular o mediante su interacción con proteínas celulares que participan en diversos procesos. En 2012 Liisi Võsa *et al*, reportaron la presencia de aproximadamente 3000 sitios de reconocimiento para E2 (ACCGN4CGGT) en el genoma humano, empleando ensayos de inmunoprecipitación de cromatina mostrando que E2 de VPH11 se une con mayor afinidad a sitios E2 cuando la secuencia espaciadora (N4) es rica en A/T, lo que sugiere que solo algunos de los sitios de reconocimiento son

accesibles y posiblemente regulados por la proteína viral E2 [10]. La unión de E2 a sitios de reconocimiento en diversos promotores celulares puede tener tanto un efecto de activación como de represión transcripcional. Como ejemplo de lo anterior, tenemos al gen de *metaloproteinasa 9* (MMP-9), en cuya región promotora aproximadamente a -1000 nt se encuentra un sitio de unión para la proteína E2; la unión de E2 resulta en incremento en la expresión de MMP-9 en queratinocitos y en capa suprabasal de cultivo organotípico de piel [11]. El promotor de interleucina 10 (IL-10) posee sitios de reconocimiento para E2 a -2052 nt del sitio de inicio de transcripción y E2 se une activando la transcripción de este promotor [12]. Otro promotor celular regulado de manera positiva por E2 es el del factor de *splicing* rico en Serinas/Argininas (SF2/ASF), en el que la interacción ocurre en la región de -482 a -684 nt a partir del sitio de inicio de la transcripción [13]. Como se mencionó previamente E2 puede regular a la baja la expresión de genes como es el caso del promotor de la telomerasa transcriptasa inversa de humano (hTERT), el promotor no posee sitios de reconocimiento para la proteína viral, la regulación negativa ocurre como consecuencia de evitar la unión de la proteína celular SP1 a su sitio de reconocimiento dentro del promotor [14], un ejemplo adicional de regulación negativa es el promotor de β 4-integrina, el promotor posee tres sitios de reconocimiento para la proteína viral E2, con distinta afinidad de unión, el trabajo muestra que parte de la regulación negativa se da por la unión directa de la proteína viral y otra parte como consecuencia del desplazamiento de factores celulares de su sitio de reconocimiento en el promotor [15].

De manera adicional, existen trabajos que muestran que la proteína E2 modifica de manera global la expresión de genes celulares involucrados en procesos como apoptosis, regulación de ciclo celular, diferenciación, movimiento celular entre otros [16], [17]. Parte de esta modificación en la expresión del genoma de la célula hospedera es producto de la interacción de E2 de VPH con proteínas celulares como BDR4, ya que cuando no se da la interacción E2-BRD4, la modificación en la expresión de genes hospederos es

distinta a cuando E2 interactúa con BDR4 y en general es negativa cuando se pierde la interacción [18].

Mandy Muller *et al* en 2012, identifican a gran escala proteínas celulares que interactúan con proteínas E2 de distintos genotipos virales. El análisis de la interacción incluía proteínas celulares involucradas en procesos como regulación de la transcripción, apoptosis, procesamiento de RNA, ubiquitinación y tráfico intracelular, mostrando funciones biológicas en las que las proteínas E2 de distintos genotipos se ven involucradas, figura 5 [8].

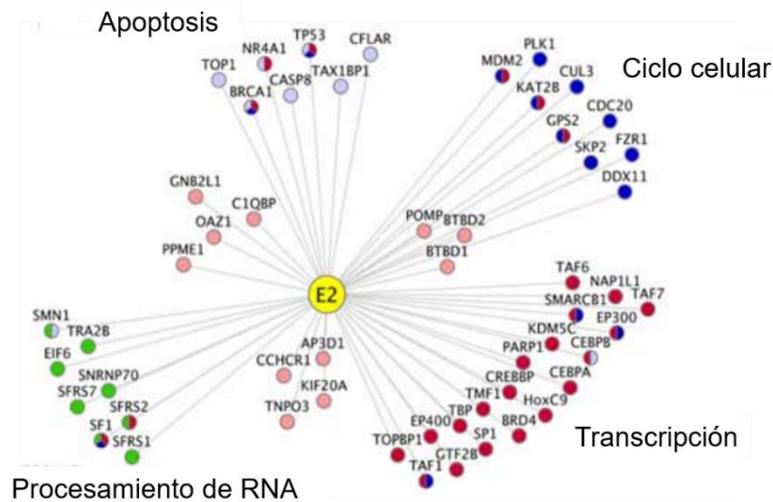


Figura 5. Red de interacción entre la proteína viral E2 y diversas proteínas celulares. E2 interactúa con proteínas como: TP53, BRCA1, MDM2, CDC20, TAF1, TA6, entre otras, involucradas en procesos como apoptosis, procesamiento de RNA, regulación del ciclo celular y regulación transcripcional.

Gauson E.J. *et al.* 2014, demostraron que la expresión de E2 de VPH16 en células U2O2, modifica el patrón de *splicing* de 522 genes celulares, algunos de ellos asociados con el desarrollo de cáncer, por lo que la participación de E2 en el procesamiento del RNA no solo involucra la regulación a nivel transcripcional de SF2/ASF como se mencionó previamente, sino también la interacción con proteínas SR (Serina/Arginina), conocidas por participar en el procesamiento de RNA [17].

Otro proceso celular que se ve afectado por la expresión de la proteína E2, independientemente de su participación en el ciclo viral, es la apoptosis. Al parecer únicamente las proteínas E2 de los VPH de alto riesgo están involucradas en la regulación de este proceso. En líneas celulares VPH positivas, la reintroducción de E2 induce apoptosis al reprimir la expresión de los oncogenes E6/E7; sin embargo, la sobre-expresión de E2 en líneas celulares VPH negativas se induce apoptosis de manera independiente y dependiente de su actividad transcripcional [19]. Por otro lado, la expresión mantenida de E2 en células VPH positivas promueve un arresto del crecimiento prolongado y senescencia irreversible [20].

La interacción de E2 con proteínas celulares parece ser fundamental en su función como regulador transcripcional. Como se mencionó previamente E2 regula de manera positiva y negativa la expresión de los genes virales E6/E7; de manera similar, la expresión de E2 en ausencia de otras proteínas virales modifica la expresión de genes celulares tanto a la alta como a la baja [16], gracias a su interacción con proteínas como TAF6, HoxC9, BRD4, TBP, TAF1, entre otras proteínas [8]. Particularmente, la interacción de E2 con TAF1 reportada por nuestro grupo de trabajo, tiene como consecuencia la eliminación del efecto represor de E2 sobre la LCR de VPH18 [21] abriendo la posibilidad de que E2 regule la interacción de TAF1 con promotores celulares dependientes de este importante factor de transcripción de la maquinaria basal.

La expresión de cientos de genes celulares es regulada a nivel transcripcional y esta regulación involucra la interacción entre secuencias en el DNA y complejos multiproteicos que controlan la dinámica de cromatina, inicio y elongación de la transcripción. Dentro de estos complejos multiproteicos se encuentran factores de transcripción (FTs) los cuales se ensamblan en el promotor o en *enhancers* a lo largo del genoma. Además de los dominios de unión al DNA, los FTs poseen dominios de activación para su interacción con otros reguladores transcripcionales [22].

Para que la transcripción génica ocurra, la RNA polimerasa II (Pol II) debe ser reclutada a sitios específicos en el genoma, lo cual es controlado por FTs de unión secuencia-específica al DNA formando el complejo de pre-inicio (PIC) de la transcripción. El PIC está constituido por diversos factores generales de transcripción como TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH, Pol II y proteínas accesorias; cada uno con diversos roles estructurales y funcionales. Las secuencias de DNA que constituyen al promotor incluyen la caja TATA de 8pb (TATAAWR consenso), que provee el sitio de unión específico para TBP (proteína de unión a caja TATA) iniciando la nucleación del PIC. Sin embargo, la caja TATA está presente en solo el 20% de los promotores eucariontes, lo que sugiere que más allá del reconocimiento de secuencias de DNA, existen mecanismos alternativos para la formación del PIC en promotores carentes de esta caja (TATA-less). TBP es una subunidad del complejo TFIID, que comprende a esta proteína y a 14 factores asociados a ella (TAFs) [21],[22]. Subunidades particulares de TFIID reconocen elementos en el promotor tales como INR, MTE y DPE. El reconocimiento secuencia-específico de estos elementos por TFIID, proporciona el mecanismo para la formación del PIC en ausencia de la caja TATA consenso. Uno de los más importantes TAF's en el complejo TFIID es TAF1, ya que sirve de anclaje para los otros TAFs a la región promotora.

1.3 Factor de transcripción TAF1

TAF1 (anteriormente denominado TAF_{II}250) como parte esencial del complejo TFIID que se une al núcleo del promotor, tiene diversas funciones: (1) el reconocimiento de secuencias de DNA en el núcleo del promotor; (2) la generación de un ambiente de cromatina favorable para el ensamble del PIC e inicio de la transcripción; y (3) la modificación postraduccional de otros factores de transcripción, nuevamente, para facilitar el ensamble de PIC e inicio de la transcripción [24].

Estructuralmente TAF1 está compuesto de múltiples dominios: hacia la región N-terminal se ubica el primer dominio cinasa (NTK) y en la región C-terminal un segundo dominio cinasa (CTK); en la región central de la proteína se encuentran el dominio de acetiltransferasa de histonas (HAT), el dominio de activación/conjugación de ubiquitina (E1/E2) y el doble bromodominio responsable de contactar a las histonas acetiladas [24], [25]. Además de otros TAFs, distintas proteínas interactúan con TAF1 y funcionan como sustratos de su actividad enzimática; entre estos se encuentran factores de la maquinaria de transcripción general como TFIIA (A), TFIIE (E), TBP, la proteína retinoblastoma (pRB), Tat de HIV (TAT), entre otras (Figura 6) [24].

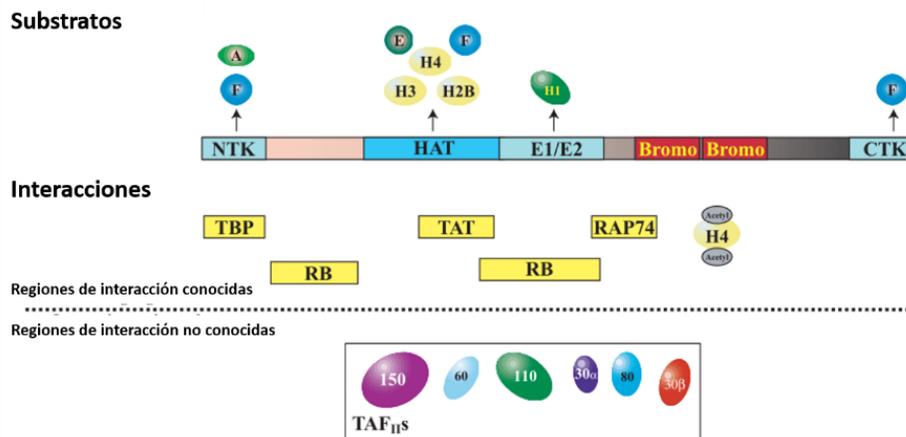


Figura 6. Estructura e interacciones conocidas de TAF1. La proteína TAF1 con un peso de 250 kDa, es la subunidad de mayor tamaño que forma parte del complejo TFIID. Los dominios con actividades enzimáticas como cinasa (NTK/CTK), acetiltransferasa de histonas (HAT) se muestran en la imagen, algunas proteínas blanco de su actividad enzimática entre los que se encuentran factores de transcripción general, histonas y las regiones de interacción con proteínas celulares (JUN, pRB, etc.) y virales (Tat de HIV). Modificado de Bhattacharya S. 2014.

La actividad de TAF1 es regulada por su interacción con distintas proteínas, como ejemplo, la interacción con activadores transcripcionales tanto de origen viral como celular incrementa la unión de TFIID a promotores celulares; entre estos activadores se encuentran Tat de HIV, E1A de adenovirus, ICP4 de

herpes virus, JUN, pRB, entre otros. La unión de Tat a TAF1 inhibe su actividad de acetiltransferasa (HAT), de manera similar a lo que sucede cuando pRB se une a TAF1, pero inhibiendo su actividad cinasa. En contraste la interacción con E1A y ciclina D elimina el efecto represor sobre la actividad cinasa de pRB. Lo anterior muestra que la regulación de las actividades de TAF1 por la interacción con activadores y factores generales de transcripción es un proceso integral que modula la activación transcripcional [24].

Otra forma de modular la actividad de TAF1 es mediante la regulación del *splicing* alternativo de su pre-RNAm. En 2006, Katzenberger R.J. *et al.*, reportaron que el daño al DNA modifica los niveles de algunos factores de *splicing*, teniendo como consecuencia el incremento de algunas isoformas de TAF1 (TAF1-3 y TAF1-4, particularmente), resultando en la regulación diferencial de la transcripción, debida a la unión de estas isoformas de TAF1 a distintos promotores blanco [26]. La forma en la que el promotor de TAF1 es regulado no ha sido del todo estudiado, aunque de manera reciente se ha reportado que el promotor de TAF1 en ciertas circunstancias se encuentra metilado. Por ejemplo, el estado de metilación del promotor de TAF1 en hepatocarcinoma, se ha asociado tanto con la infección del virus de hepatitis C como con el consumo de alcohol; sin embargo, el significado de esto no ha sido dilucidado [27].

TAF1 tiene un papel importante como regulador de la expresión de genes involucrados en procesos como ciclo celular y apoptosis [28],[29]. La importancia de TAF1 en la regulación de ciclo celular, fue demostrada de manera muy clara en la línea celular ts13, en la que TAF1 tiene una mutación puntual sensible a temperatura. Al colocar estas células en temperatura no-permisiva (39 °C), se arrestan en fase G1 y entran en apoptosis. Posteriormente en 1997 Rushton J. J. *et al.*, demostraron que la detención del ciclo celular es consecuencia de cambios en los niveles de ciclinas e inhibidores de CDK's, particularmente, ciclina D se ve reducida, mientras que la expresión de p21 aumenta y parte de estos cambios ocurren a nivel

transcripcional, cabe mencionar que TAF1 participa en la regulación transcripcional de las proteínas previamente mencionadas. Lo anterior sugiere que el efecto de TAF1 en el crecimiento y viabilidad celular es mediada por la regulación diferencial de la transcripción de genes de manera positiva y/o negativa implicados en el control del ciclo celular [30]. Parte de la regulación diferencial por TAF1 se debe a que algunos de los genes blanco, requieren de la actividad acetiltransferasa de histonas (HAT) mientras que otros requieren de su actividad cinasa. O'Brien T y Tjian R en el 2000, demuestran que aproximadamente el 18 % de la totalidad de genes regulados por TAF1, se ven afectados cuando existen mutaciones en el dominio HAT, mientras que únicamente un 6% de genes se ven perjudicados cuando mutaciones inactivan el dominio N-terminal cinasa de TAF1 y un pequeño grupo de genes (1 %) requiere la integridad de ambos dominios, lo anterior les llevo a concluir que los diferentes dominios funcionales de TAF1 regulan distintos grupos de genes *in vivo* [28].

Actualmente, TAF1 ha incrementado su importancia como blanco potencial terapéutico, o como marcador en la prognosis de ciertos padecimientos. AML1-ETO (AE) es un factor de transcripción que resulta de la translocación t(8:21); funciona como un oncogén en la promoción de leucemia. Este factor interactúa con TAF1 y es necesaria su acetilación en la lisina 43 (K43) para que sea reconocida por los bromodominios de TAF1. Esta interacción altera la asociación de AE a promotores o *enhancers* blanco, resultando en la activación y/o represión de la transcripción; además, TAF1 es requerido para la renovación de células de leucemia y su reducción promueve la diferenciación y apoptosis en células de leucemia mieloide aguda (AML) [31].

1.4 Ciclo celular

El ciclo celular es la secuencia de eventos mediante los cuales una célula duplica su genoma, crece y se divide en dos células hijas y consta de cuatro fases: G1, S, G2 y M (figura 6). Después de la división celular, las células hijas entran en un periodo de crecimiento donde macromoléculas, incluidas proteínas, RNA y membranas son sintetizadas, esta fase es conocida como G1 (*Gap 1*). La fase G1 es seguida por un periodo de síntesis de DNA o fase S. Posteriormente, otro periodo de crecimiento conocido como G2 (*Gap 2*) antes de entrar a mitosis (fase M), durante la cual el DNA es dividido de manera equitativa a las células hijas, culminando en citocinesis (división de citoplasma). Las células que no se dividen más salen del ciclo celular a un estado de reposo o quiescencia (G0).

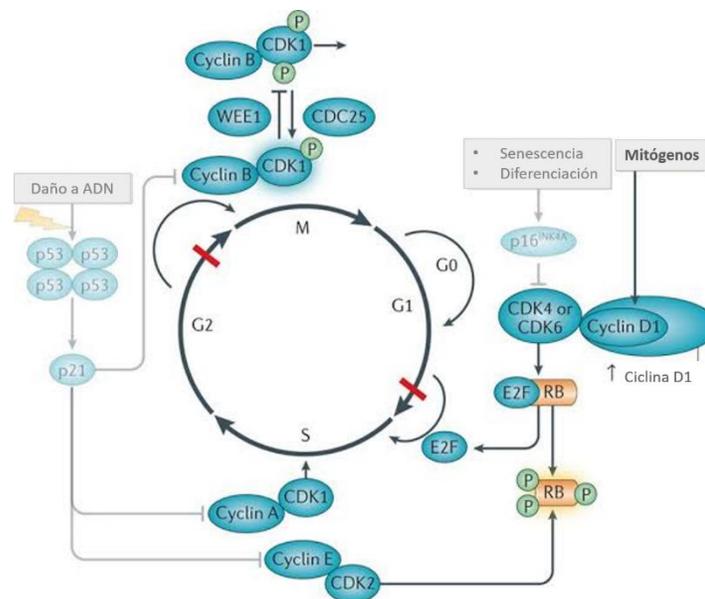


Figura 7. Regulación de ciclo celular. El ciclo celular se divide en 4 fases (G1, S, G2 y M), es regulado por los complejos ciclinas/CDKs, los puntos de control se muestran con barras rojas. En la transición G1-S se ven involucrados el factor de transcripción E2F y la proteína Rb. Para G2-M la regulación recae en el complejo ciclina B/CDK1. La actividad de los complejos ciclina/CDK es regulada por inhibidores (p16^{INK4A}, p21, entre otros) a lo largo del ciclo. Modificado de Leemans C. R. *et al.* 2018.

El ciclo celular es regulado por la familia de ciclinas, cinasas dependientes de ciclina (CDKs) y sus inhibidores (CDKIs) mediante eventos de

activación/desactivación que involucran la fosforilación/defosforilación de distintos sustratos. Las ciclinas son un grupo de proteínas que como su nombre lo sugiere están asociadas a una fase particular del ciclo celular y los niveles proteicos están sujetos a cambios durante el ciclo. En G1 se sintetizan las ciclinas A, E y D uniéndose a su correspondiente Cdk, los complejos ciclina/Cdk se importan al núcleo. Al entrar a la fase S, los complejos ciclina A/CDK y ciclina E/CDK permanecen en el núcleo hasta su degradación en fase M, mientras que la ciclina D es degradada. Finalmente, la ciclina B permanece en citoplasma y se transloca rápidamente al núcleo en la fase G2. Las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) son cinasas de serina/treonina cuya actividad depende de la subunidad reguladora ciclina [32]. Los inhibidores de las Cdk se agrupan en dos familias: los inhibidores INK4 y los inhibidores Cip/Kip. Existen cuatro miembros conocidos de la familia INK4: p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p19^{INK4D} y p18^{INK4C}, mientras que de la familia Cip/Kip tres: p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1}, y p57^{Kip2}; la familia INK4 inhibe la actividad de Cdk4 y Cdk6 durante la fase G1 del ciclo, mientras que la familia Cip/Kip puede inhibir la actividad en cualquier fase del ciclo celular.

Se ha puesto especial atención en la expresión alterada de ciclinas y Cdk's de fase G1, ya que la mayor parte de los eventos de proliferación y diferenciación ocurren en esta fase del ciclo. La ciclina D alcanza su máximo nivel de expresión y forma un complejo funcional con CDK4 o CDK6 en la parte intermedia de G1, mientras que la ciclina E se expresa y se asocia con Cdk2, en un complejo activo en la frontera G1-S. Si el complejo ciclina/Cdk es regulado por la unión de los inhibidores CDKI (p16^{INK4A}, p21^{waf1} y p27^{KIP1}), se detiene la progresión del ciclo celular en la transición de la fase G1 a la fase S (Figura 6). La transición G2/M está regulada por el complejo ciclina B/Cdk1, el complejo permanece inactivo por la fosforilación de Wee1 sobre Cdk1. En G2 tardía, la fosfatasa Cdc25C desfosforila a Cdk1 activando el complejo ciclina B/Cdk1 promoviendo así la entrada a mitosis; eventualmente es inactivado por el complejo promotor de anafase (APC), una ubiquitin ligasa que marca a la

ciclina B para degradación; sin la actividad de APC las células no saldrían de mitosis [33].

Varios virus perturban el ciclo celular para crear un ambiente propicio dentro de la célula y favorecer la replicación del genoma viral [34]. Con frecuencia estimulan la entrada a la fase S en células que de lo contrario estarían en fase G1 o G0; sin embargo, ha surgido evidencia de que la transición G1/S no es el único blanco de regulación por parte de los virus, ya que algunos de ellos son capaces de inducir el arresto del ciclo en G2/M [33]. Estos efectos de ciertos virus sobre el ciclo celular parecen involucrar la interacción de algunos de sus productos proteicos con relevantes factores celulares. TAF1 podría ser uno de estos blancos, por ser un regulador transcripcional clave de un amplio número de genes implicados en el control del ciclo del ciclo celular, como ciclina D, ciclina A y p27, entre otros. Entre las estrategias que algunos virus como VPH han desarrollado para la alteración del ciclo celular, se encuentra la inactivación de la proteína celular p53.

1.5 Proteína p53

Nombrada como el “guardián del genoma” (Lane 1992) o “guardián celular” (Levine 1997), la proteína p53 actúa en respuesta a una amplia variedad de señales de estrés con consecuencias anti-proliferativas. p53 puede ser activada por diferentes mecanismos que incluyen la respuesta a daño al DNA, activación de oncogenes, hipoxia, entre otras, llevando a la inducción de apoptosis, arresto del ciclo celular, senescencia y autofagia. Las funciones de supresor tumoral de p53 son influenciadas o dependen del tipo celular, del microambiente, de eventos oncogénicos y de la presencia de virus, entre otros factores [35].

El gen TP53, consta de 11 exones, codifica para una proteína de 393 aminoácidos (p53), con cinco dominios funcionales: en la región N-terminal se encuentra el dominio de activación transcripcional (TAD), seguido por una región rica en prolinas (PR), en la porción central se localiza el dominio de

unión al DNA (DBD) enlazado al dominio de tetramerización (TER) por una región flexible, y finalmente el dominio básico C-terminal (figura 8) [36]. El dominio TAD (aminoácidos 1-42) se requiere para la actividad transcripcional e interactúa con distintas proteínas incluidas los factores de transcripción TFIIH y varios TAF's en TFIID; este dominio es responsable de la interacción con proteínas acetil-transferasa de histonas como CBP/p300 y PCAF, al igual que interactúa con la ubiquitina ligasa MDM2. La secuencia rica en prolinas (aminoácido 61-92) da estabilidad a p53 y es la región de interacción con el co-represor Sin3. El dominio de unión al DNA (aminoácidos 101-300) contacta directamente al sitio de unión consenso. La proteína p53 forma un tetrámero a través del dominio de tetramerización (residuos 326-356). La región C-terminal (residuos 364-393) se une al DNA de manera no específica *in vitro* e *in vivo* pero modula importantemente la unión de p53 al DNA.



Figura 8. Estructura de p53. La proteína p53 hacia la región N-terminal presenta el dominio de activación transcripcional (TAD), seguido del dominio rico en prolinas (PR), dominio de unión al DNA en su posición central, hacia la región C-terminal del dominio de tetramerización. Modificado de Joerger A. C.2016.

La proteína p53 funciona como un factor de transcripción, uniéndose al DNA de manera específica a los elementos de respuesta de 10 pares de bases separados por 0 a 14 nucleótidos, cuya secuencia es: RRRWWGYYY_{n0-14}RRRWWGYYY, (R=A, G; W=A, T; Y=C, T). Muchos sitios p53 presentes en el genoma no tienen secuencia espaciadora entre ellos, la unión de p53 al sitio de reconocimiento ocurre formando un tetrámero [36].

El factor de transcripción p53 tiene un papel central en el ciclo de vida de la célula. En respuesta a señales de estrés como daño al DNA o activación de oncogenes, p53 es activado por una cascada de fosforilación y otras modificaciones postraduccionales, resultando en la expresión de genes blanco, involucrados en el arresto del ciclo celular, reparación de DNA o

apoptosis, si el daño es irreparable. Los genes blanco de p53 tienen importantes funciones en procesos como la senescencia, angiogénesis, autofagia, angiogénesis, entre otras (Figura 9).

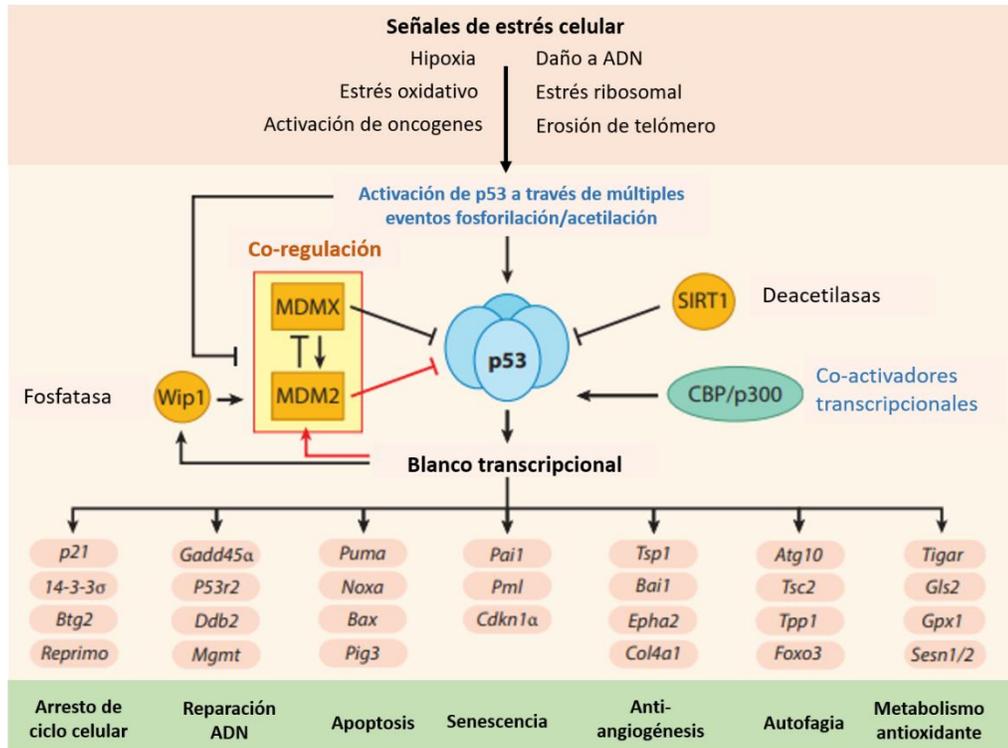


Figura 9. Actividad de p53. La proteína p53 es activada por modificaciones postraduccionales como fosforilación, acetilación, sumoilación, etc. Se une al DNA de manera específica formando un tetrámero y activando la transcripción de múltiples genes involucrados en procesos como detención del ciclo celular, reparación de daño a DNA o apoptosis si el daño no puede ser reparado. Modificado de Joerger A. C., 2016.

El nivel y actividad de la proteína p53 es finamente regulada por la proteína MDM2, que es un blanco transcripcional de p53 que actúa como ubiquitina ligasa E3, poli-ubiquitinando a p53, resultando en su exporte nuclear y posterior degradación por la vía del proteasoma. Las diversas modificaciones postraduccionales como fosforilación, acetilación, sumoilación y glicosilación, contribuyen en la regulación de p53. Por ejemplo, la fosforilación en la región N-terminal de residuos de serina y treonina debilitan la interacción p53-MDM2 estabilizando a p53. Por otro lado, la fosforilación en Thr55 por TAF1 promueve la disociación de p53 de algunos promotores, inactivando la

transcripción tardía en respuesta al daño [37]. Otra consecuencia de la fosforilación en Thr55 por TAF1 es promover la degradación de p53, permitiendo la progresión de G1 en el ciclo celular [38]. Dentro de las modificaciones más comunes se encuentra la acetilación de residuos de lisina (Lys), se sabe que la acetilación combinada de Lys370, Lys372 y Lys373 por p300 en el dominio C-terminal o de Lys120 en DBD por TIP60, promueven apoptosis, mientras que la acetilación de Lys317 por PCAF la suprime. Una mutación en Lys120 compromete el arresto del ciclo celular [39], por lo tanto, las distintas modificaciones postraduccionales son específicas al tipo de daño, y dependiendo de su localización en los diferentes dominios de p53, dirigen su respuesta diferencial.

La proteína p53 inicialmente fue identificada formando un complejo con el antígeno T grande del virus de simio 40 (SV40), sentando las bases para comprender el rol de p53 en la biología de los virus. Los datos acumulados a lo largo del tiempo implican a p53 en la regulación del ciclo viral tanto de virus asociados al desarrollo de tumores, como a otros no están, entre ellos encontramos a: virus de la influenza, del sarampión, vaccinia, del Zika, de inmunodeficiencia humana tipo 1, Herpes simple 1, así, como de papiloma humano. Estos virus modifican la actividad de la proteína p53, a través de distintas estrategias; algunos la requieren en su forma activa para la eficiente replicación viral, mientras que otros necesitan la reducción/inhibición de su actividad [40].

En el caso del virus de papiloma humano, la interacción y degradación de p53 mediada por E6 ha sido ampliamente estudiada, lo anterior resulta en bajos niveles de p53 en células infectadas, afectando el ciclo de la célula hospedera. Sin embargo, p53 participa de manera activa en regular la replicación del DNA viral, de manera independiente de E6, pero dependiente de su interacción con el factor de replicación viral E2.

2.- ANTECEDENTES

Trabajo previo en nuestro grupo de investigación demostró la interacción física de TAF1 con la proteína viral E2 de VPH16, resultando en la liberación del efecto represor de E2 sobre la LCR [21]. Por otro lado, la expresión de la proteína E2 tiene diversos efectos en la célula que van desde la inducción a diferenciación temprana, que incluye cambios en la expresión de algunos marcadores como citoqueratina 10, filagrina, e involucrina, entre otros [20], [41]; hasta la apoptosis tanto en células VPH positivas como negativas, de manera dependiente e independiente de su actividad transcripcional. No obstante, la sola expresión de E2 provoca un cambio global en la expresión de genes celulares. En nuestro grupo de trabajo, Ramírez-Salazar et al. 2011, demostraron que la expresión de E2 por un periodo de 48 horas empleando un vector adenoviral, induce la disminución en la expresión de 1048 genes y un incremento en la expresión de 581, muchos de estos asociados con la proliferación, diferenciación y apoptosis [16]. De manera interesante TAF1 y otros genes implicados en el control de ciclo celular y que a su vez son regulados por TAF1 (como ciclina A, p27, GADD45, entre otros), se vieron también modificados. Estudios posteriores evidenciaron que además de modificar la expresión de los genes antes mencionados la expresión transitoria de E2 de VPH16 modifica también la unión de TAF1 en los promotores de algunos de los genes mencionados, mostrando un enriquecimiento que correlaciona con el incremento en la expresión del gen evaluado, o bien, una disminución en la presencia de TAF1 cuando su expresión disminuye, sugiriendo una relación directa entre la ocupación del promotor por TAF1 y la expresión del gen (García-Venzor A., 2013). Estas observaciones nos llevaron a evaluar el efecto de los cambios en expresión de todos estos genes sobre el ciclo celular.

3.- JUSTIFICACIÓN

La proteína E2 de VPH16 es capaz de modificar la expresión de un amplio número de genes celulares, ya sea a través de su unión a promotores, o mediante la interacción con proteínas celulares. La regulación génica por parte de E2 puede influir en la respuesta celular ante daño al DNA mediada por p53: sin embargo, hasta el momento su participación en este proceso no ha sido determinada. Por otro lado, la interacción de E2 con TAF1 importante en la regulación de la transición G1/S podría ser modificada por la presencia de la proteína viral. Los resultados generados contribuirán al entendimiento de los mecanismos por los que virus como VPH toman ventaja de la célula hospedera.

4.- HIPÓTESIS

La expresión de E2 VPH16 modificará la regulación transcripcional de genes responsivos a p53 ante daño al DNA, así como la progresión del ciclo celular, a través de modular la actividad de TAF1 sobre promotores implicados en este proceso celular.

5.- OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar si la expresión de E2 de VPH16 participa en la regulación de promotores mediada por p53 ante daño al DNA y el impacto de su expresión sobre el ciclo celular.

5.2 Objetivos específicos

1. Generar líneas celulares que expresen de manera constitutiva E2 de VPH16 mediante un sistema lentiviral.
2. Evaluar la expresión de genes regulados por p53 ante daño al DNA en la línea celular con y sin expresión de E2 de VPH16.
3. Determinar si E2 de VPH16 modifica la unión de la proteína p53 a promotores responsivos.
4. Analizar los efectos de la expresión de E2 de VPH16 sobre el perfil de ciclo celular.
5. Evaluar el nivel de expresión de genes implicados en la regulación de la transición G1/S del ciclo celular en ausencia y presencia de E2 de VPH16.
6. Evaluar la posible modificación de la unión de TAF1 a promotores celulares blanco en presencia de E2 de VPH16.

6.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

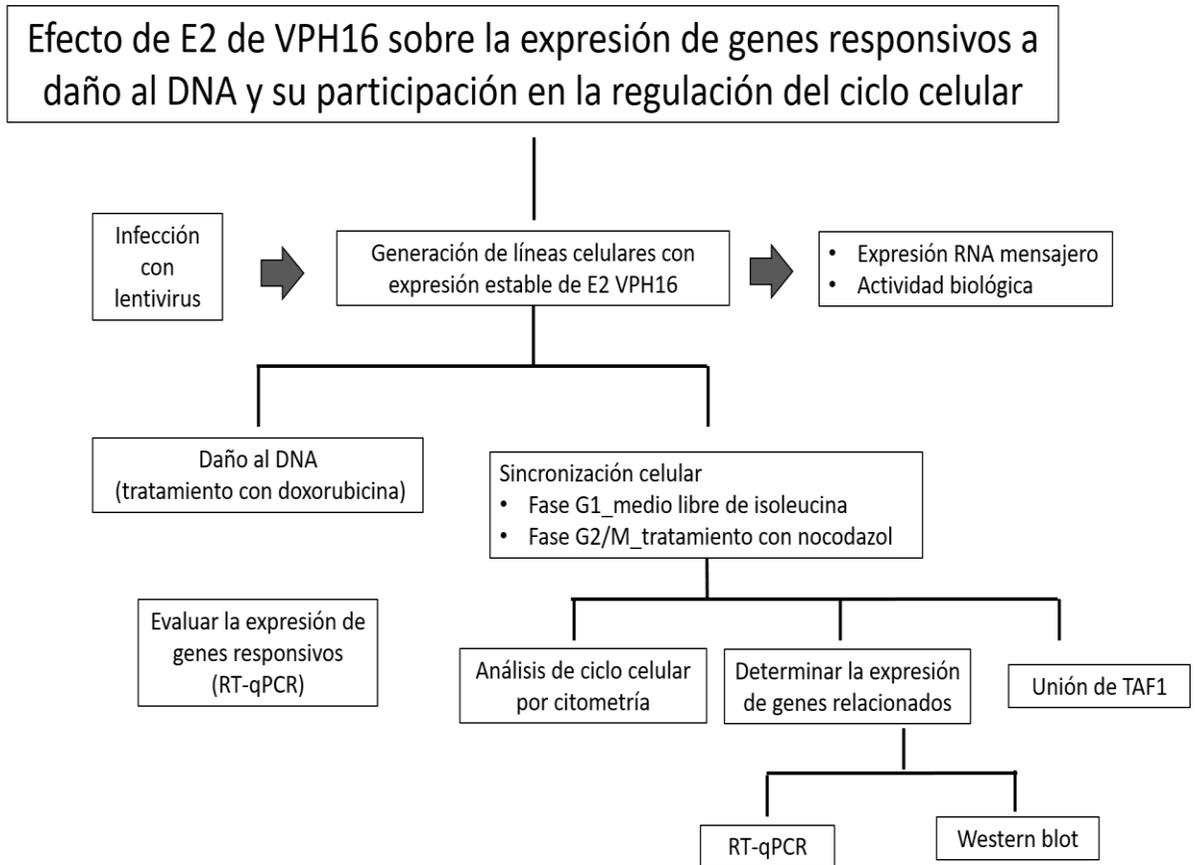


Figura 10. Diagrama general de la estrategia experimental

7.- MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Cultivo celular

Las líneas celulares HEK293-FT, C-33 A, RKO y H1299 empleadas en este trabajo fueron mantenidas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco), L-glutamina (2mM), piruvato de sodio (1 mM), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50 µg/ml). La línea celular H1299 fue mantenida en medio RPMI con los mismos suplementos. Los cultivos celulares fueron mantenidos en condiciones de incubación a 37°C en un ambiente de 5 % de CO₂.

7.2 Generación de lentivirus recombinante

El plásmido pSin-EF2-E216-Pur que posee la región codificante de E2 de VPH16 (Domínguez-Catzin *et al.* 2016) fue co-transfectado con los plásmidos pMD2.G y psPAX2 en las células empaquetadoras HEK293-FT. Se sembraron 6x10⁶ células en caja Petri de cultivo de 100mm (p-100), en medio DMEM suplementado con 1 % de aminoácidos no esenciales, 1% piruvato de sodio, 2 % glutamina, 0.5 % antibióticos y 10 % de SFB.

La cantidad de DNA plasmídico empleada fue: pSin-EF2-E216-Pur: 3 µg; pMD2.G: 2.5 µg y psPAX2: 7.5 µg.

La transfección se realizó empleando el reactivo Lipofectamina (Invitrogen, USA); la mezcla de transfección (DNA-liposomas) se depositó en el cultivo y se mantuvo por 24 horas, pasado este tiempo se retiró reemplazándolo por DMEM con suero fetal al 10 % y 8 mM/mL de Butirato de sodio (stock 500 mM). Cuarenta y ocho horas postransfección se purificaron las partículas lentivirales.

Se colectó el sobrenadante empleando puntas con filtro colocándose en tubos cónicos de 15 ml e inmediatamente colocándolos en hielo; se centrifugó a 500

g por 15 min, 4 °C con la intención de empaquetar restos celulares. Se filtró el sobrenadante con ayuda de un filtro de 0.45 µm, y se ultracentrifugó a 25,000 rpm con aceleración y desaceleración máxima, usando el rotor SW41 Ti, durante 2 horas a 4°C. Se decantó el sobrenadante directamente a un recipiente con cloro. Se agregaron al fondo del tubo 40 µL de BSA 0.01 % disuelto en PBS 1X (sin resuspender), incubando 24 horas a 4°C, posteriormente se hicieron alícuotas de 10 µl, almacenando a -70°C hasta su uso.

7.3 Infección de líneas celulares

Se sembraron 6×10^5 células en cajas Petri de cultivo de 60 mm (p60) y 24 horas después, se infectaron con 50 µl del stock viral, adicionando polybrene para facilitar la absorción viral; las partículas virales permanecieron en el medio por 24 horas. La selección inició 24 horas después con la adición de 0.5 µg/ml de puromicina cambiando cada 3 días durante 7 días el medio y la puromicina con la finalidad de que las células no transducidas mueran. A continuación, las células infectadas se mantuvieron en medio correspondiente con suero fetal bovino al 10 % en condiciones estándar.

7.4 Actividad biológica de E2.

La actividad biológica de la proteína E2 de VPH16 se evaluó mediante transfecciones transitorias con 2 µg del plásmido pGL4.10-LCR18wt-Luc (Sánchez-Ramos J; tesis de maestría) en las líneas celulares previamente transducidas (sin y con expresión de E2 VPH16). Cuarenta y ocho horas post-transfección se retiró el medio de cultivo, se lavó la monocapa celular dos veces con PBS 1X y se cosecharon raspando las monocapa con un fragmento de hule (gendarme). Se obtuvieron proteínas totales usando 200 µl Buffer de Lisis Reportero 1X (PROMEGA®), sometiendo a dos ciclos de congelación-descongelación (hielo seco/37 °C, 5 minutos cada uno), luego se centrifuga a 13,000 rpm, recuperando el sobrenadante y almacenándolo a -70 °C, hasta el

momento de ser usados. El ensayo de luciferasa se llevó a cabo empleando el kit Luciferase Assay System (PROMEGA®), y el equipo Fluoroskan Ascent FL (Labsystems).

7.5 Tratamiento con doxorubicina

Las células RKO, RKO-E216, H1299 y H1299-E216 se sembraron a una densidad de 1.5×10^6 en cajas p60 y trataron con doxorubicina; la concentración de la solución de trabajo $1 \mu\text{M}$ y la concentración final en medio fue: $0.5 \mu\text{M/ml}$ durante 8 horas; a las células sin tratamiento se les adicionó un volumen igual del vehículo (DMSO). Pasado este tiempo las células se cosecharon para realizar la extracción de RNA empleando el reactivo Trizol.

7.6 Análisis de ciclo celular

Para determinar el perfil de ciclo celular en la línea C-33A y C-33A-E2 VPH16, se cosecharon 1×10^6 células de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento (60-70 % de confluencia en la monocapa) y se fijaron en 1ml de etanol al 70 % al menos 16 horas previas a su tinción. Las células fijadas se lavaron 2 veces con PBS 1X, centrifugando a 700 g por 3 minutos. Las células se incubaron en 400 μl de PBS 1X con ioduro de propidio (100 $\mu\text{g/ml}$) y RNAsa A (1 mg/ml) por 1 hora. El perfil de ciclo celular se evaluó por citometría de flujo (FACS Fortessa, BD); se analizaron un mínimo de 20,000 células por muestra. Los datos se colectaron usando el programa CellQuest y analizados con ayuda del software Modfit.

7.7 Arresto de ciclo celular

Para el arresto mitótico 2×10^6 células se sembraron en cajas p60 y crecidas por 20 horas en condiciones estándar. Entonces las células se lavaron con PBS 1X, para posteriormente agregar DMEM con suero fetal al 2 % y

nocodazol (0.2 µg/ml-Sigma) por un periodo de 20 horas. Las células flotantes (células en arresto mitótico) se colectaron, lavaron y resembraron para su posterior cosecharon en distintos intervalos de tiempo para su análisis por citometría de flujo.

Para la sincronización en fase G0/G1 se utilizó la privación de isoleucina como se ha realizado en previos reportes [42]. Se sembraron 750,000 células en microplaca de 6 pozos, 24 horas previas al reemplazo por medio RPMI-libre de isoleucina. Las células se lavaron con PBS 1 X antes de adicionar el medio libre de isoleucina y mantenidas por 48 horas con reemplazo por medio fresco cada 24 horas. Pasadas las 48 horas las células se liberaron del arresto al reemplazar el medio por RPMI completo con suero fetal al 10 %, para ser cosechas en distintos intervalos de tiempo para su análisis.

7.8 Extracción de RNA y generación de cDNA

La extracción de RNA se realizó empleando el reactivo TRIzol (Invitrogen). El RNA se sometió a tratamiento con DNasa RQ1 (PROMEGA®, USA) por 2 horas a 37 °C. Para la generación de cDNA se emplearon 2 µg de RNA, 1u de M-MLV RT, oligo dT (PROMEGA®, USA) a 42 °C por 1.5 horas. Para evaluar los niveles de mRNA de E2 en células transducidas se emplearon los siguientes oligonucleótidos: *E2* Fw: 5' ATTCCGAATTCATGGAGACTCT 3', Rev: 5' TTCGGGATCCTCATATAGACAT 3'; para *TAF1* Fw: 5' ACAACATCGGGAAGAGATGC 3', Rev: 5' CAGGACGCTCCTTCATTTTC 3', y como control interno se incluyó *β-Actina* Fw: 5'GCGGGAAATCGTGCGTGACATT3', Rev:5' GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG 3'. Los oligonucleótidos para RT-qPCR empleados en la evaluación de la expresión del resto de los genes celulares se enlistan en la tabla 6.

7.9 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Las células se sembraron a una densidad de 1.5×10^6 por caja Petri p100. Posteriormente se fijaron con formaldehído (1 % concentración final) durante 10 minutos a 37 °C y lisadas con SDS Lysis Buffer (1 % SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8.1). El DNA se fragmentó utilizando el equipo Bioruptor. El lisado se diluyó 10 veces en ChIP Dilution Buffer (0.01 % SDS, 1.1 % Triton X-100, 1.3 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.1, 167 mM NaCl). Para reducir interacciones inespecíficas las muestras se trataron por una hora (pre-aclaramiento) con 25 μ l de proteína A agarosa (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), para posteriormente inmunoprecipitar con 5 μ g de anti-p53 (sc-D0-1 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-TAF1 (sc-735 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) o un IgG inespecífico, a 4 °C durante toda la noche con agitación. Al día siguiente se agregaron 25 μ l de perlas magnéticas (EMD Millipore, Darmstadt, Germany) por 1 hora a 4 °C con rotación para obtener el complejo DNA/proteína. El complejo trató con el buffer de lavado de baja sal (Low Salt Immune Complex Wash Buffer; 0.1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl), posteriormente con el buffer de lavado de alta sal (High Salt Immune Complex Wash Buffer; 0.1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 500 mM NaCl), con el buffer de lavado de LiCl (LiCl immune complex Wash Buffer; 0.25 M LiCl, 1 % IGPAL-CA630, 1 % deoxycholic acid, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8.1) y finalmente con TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), para posteriormente ser eluído con buffer de elución (Elution Buffer; 1% SDS, 0.1 mM NaHCO₃). El entrecruzamiento se revirtió empleando NaCl 5 M por 4 horas a 65°C y la proteína digerida con proteinasa K (10 mg/ml) por 1 hora a 45 °C. El DNA se purificó con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, precipitado con isopropanol y se analizó por qPCR (los oligonucleótidos utilizados se enlistan en la tabla 6).

7.10 Western blot

Para la inmunodetección, los diferentes lisados se obtuvieron empleando RIPA Buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 % deoxycolato de sodio, 0.1 % SDS). Cantidades iguales (30 µg) de proteínas se separaron en SDS-PAGE gel y transferidas a membrana de nitrocelulosa, bloqueada con leche semidescremada al 5% e incubadas con los diferentes anticuerpos monoclonales: p53 1:1000, TAF1 1:250, p27 1:250 (Santa Cruz Biotechnology, USA), Actina 1:100,000 (Sigma, San Luis Misuri, USA), seguido con la incubación con el anticuerpo secundario anti-Ig de ratón acoplada a peroxidasa 1:5,000 (Jackson, South San Francisco, USA); el revelado se realizó con SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA) y la membrana se expuso a película XO-MAT (Kodak, NY) que se reveló por métodos estándar.

8.- RESULTADOS

8.1 Líneas celulares con expresión estable de E2 de VPH16.

En este trabajo se generaron líneas celulares con expresión estable de E2 de VPH16 empleando un sistema lentiviral. Entre las ventajas que ofrece este sistema se encuentran: 1) la integración del transgen de interés en el genoma de la célula hospedera, lo que lleva a la expresión constante, 2) la selección empleando un gen de resistencia, 3) la capacidad de transportar elementos genéticos complejos como policistrones y 4) su relativa facilidad para la producción y manipulación [43].

Las líneas celulares empleadas para evaluar los distintos efectos que E2 de VPH16 puede tener en los procesos celulares como respuesta a daño al DNA o ciclo celular fueron las RKO, H1999 y C-33 A. La línea celular RKO (p53^{+/+}) corresponde a células provenientes de un carcinoma de colon, con la presencia del gen TP53, la línea celular H1299 (p53^{-/-}) provienen de un carcinoma de pulmón donde el gen TP53 se encuentra deletado parcialmente y no hay expresión de la proteína p53, ambas líneas celulares son VPH negativas. En el caso de la línea celular C-33 A, corresponde a células provenientes de cáncer cérvico-uterino, pero sin la presencia de DNA viral del virus del papiloma, donde la proteína p53 se expresa, pero no es funcional ya que presenta mutaciones en el dominio de unión al DNA. En la figura 11 se aprecia la morfología de las distintas líneas utilizadas.

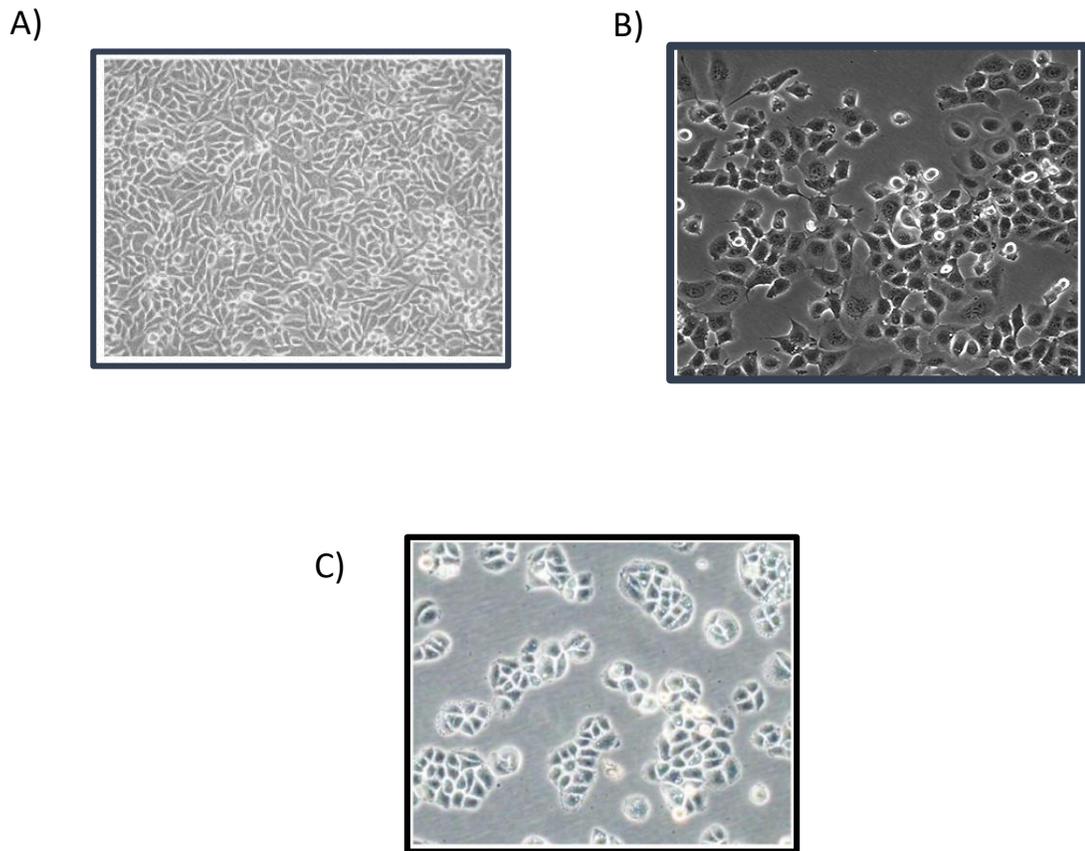


Figura 11. Morfología de líneas celulares empleadas. A) Línea celular RKO, B) Línea celular H1299 y C) Línea celular C-33 A, todas las líneas celulares son negativas para la presencia del virus de papiloma humano. Imágenes tomadas del sitio web American Type Culture Collection (ATCC).

Las distintas líneas celulares se infectaron con lentivirus E2 de VPH16, y se seleccionaron con puomicina (0.5µg/ml) por un periodo de siete días, y permitiendo que llegaran a confluencia para realizar los ensayos posteriores. Cabe mencionar que la titulación del virus que lleva la expresión del transgen de E2 VPH16 no fue posible realizarla de manera rutinaria, ya que cuando se intentó se obtuvieron títulos bajos.

Tras la infección y selección se evaluó la expresión de E2 a nivel de RNA mensajero y se determinó su funcionalidad biológica empleando un promotor responsivo a E2. En la figura 12 A, B y C se muestran los resultados de los ensayos de RT-PCR.

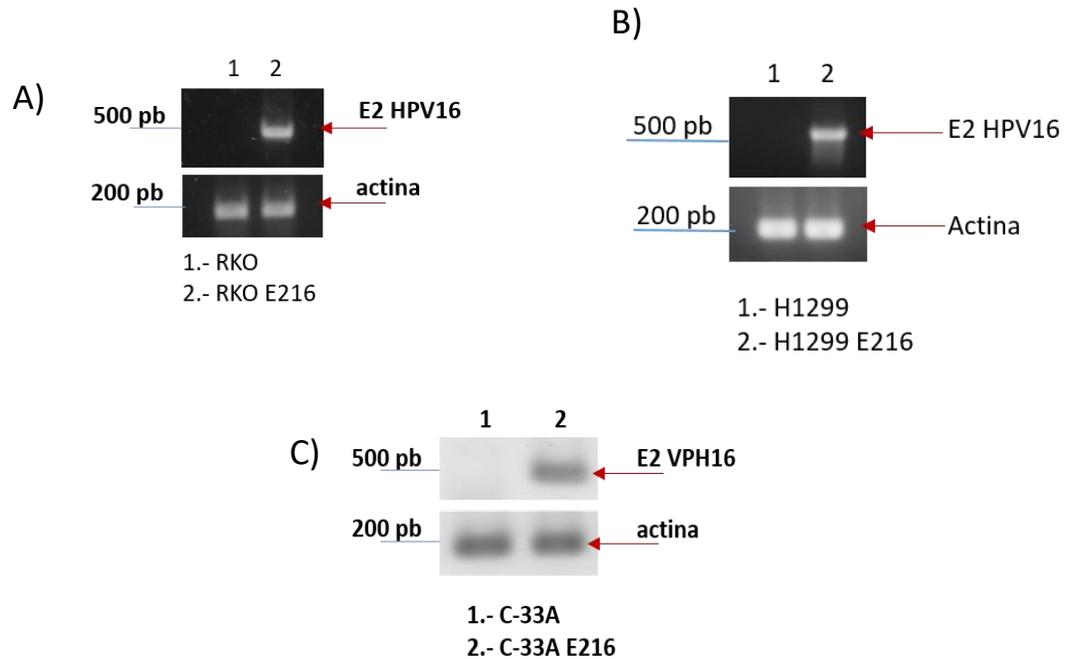


Figura 12. Expresión de E2 del virus de papiloma humano 16. La expresión de E2 se evaluó mediante RT-PCR; el amplificado de 500 pb se observa únicamente en células que se transdujeron con el lentivirus-E2. A) Células RKO, B) Células H1299 y C) Células C33 A.

Debido a las dificultades técnicas que representa determinar la expresión de la proteína E2 y a que las células que son capaces de adaptarse a la expresión de E2 deben mantener bajos sus niveles, la presencia de esta proteína se evaluó de manera indirecta, a través de su actividad como regulador transcripcional del promotor viral. Para este fin, se transfectaron en las líneas celulares sin expresión y con expresión de E2 de VPH16, 2 µg del plásmido pGL4.10-LCR18, que es un vector reportero donde la expresión del gen de luciferasa es regulada por la LCR de VPH tipo 18 (LCR18). Como se puede observar en la figura 13 panel A, B y C, la LCR18 muestra mayor actividad biológica en células con expresión estable de E2 de VPH16 en comparación

de células sin expresión de la proteína viral. Una vez determinada la presencia y funcionalidad de la proteína E2 de VPH16 las líneas celulares se utilizaron para ensayos posteriores.

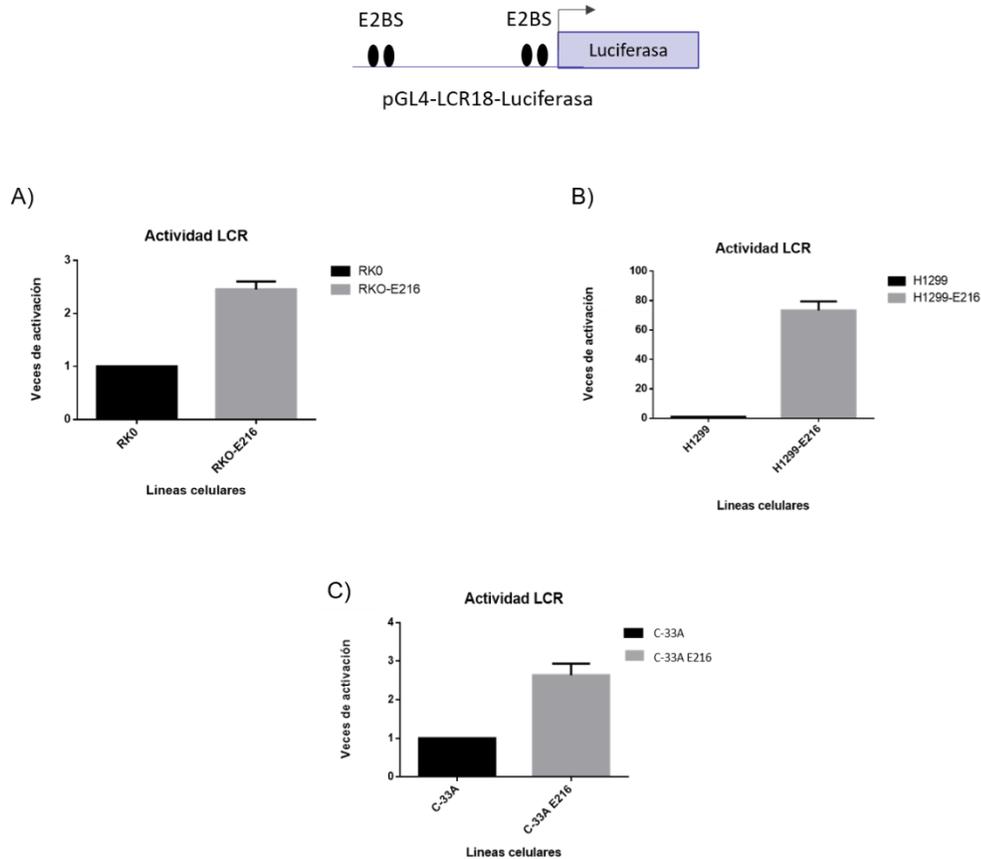


Figura 13. Actividad biológica de la proteína E2 de VPH16. La presencia y funcionalidad de E2 de VPH16 fue evaluada al medir la actividad la expresión del gen reportero luciferasa cuya expresión es regulada por la región larga de control del virus de papiloma humano tipo 18 (imagen superior). Los ensayos de transfección se realizaron por duplicado y se muestra el promedio.

Para inducir la respuesta ante daño al DNA de la proteína p53, las células se trataron con el fármaco doxorubicina, agente citotóxico, que se intercala en el DNA, bloqueando la replicación al obstruir a la topoisomerasa II [44]. En la figura 14, panel A, se observan los niveles basales de p53 tanto en células RKO sin y con expresión de E2 VPH16 (Figura 14 panel A, carriles 1 y 3); después del tratamiento con doxorubicina los niveles de la proteína p53 se

incrementan (figura 14, panel A, carriles 2 y 4), de acuerdo con lo reportado [45]. Como era de esperarse en las células H1299 no se detecta la presencia de la proteína p53 (figura 14, panel B).

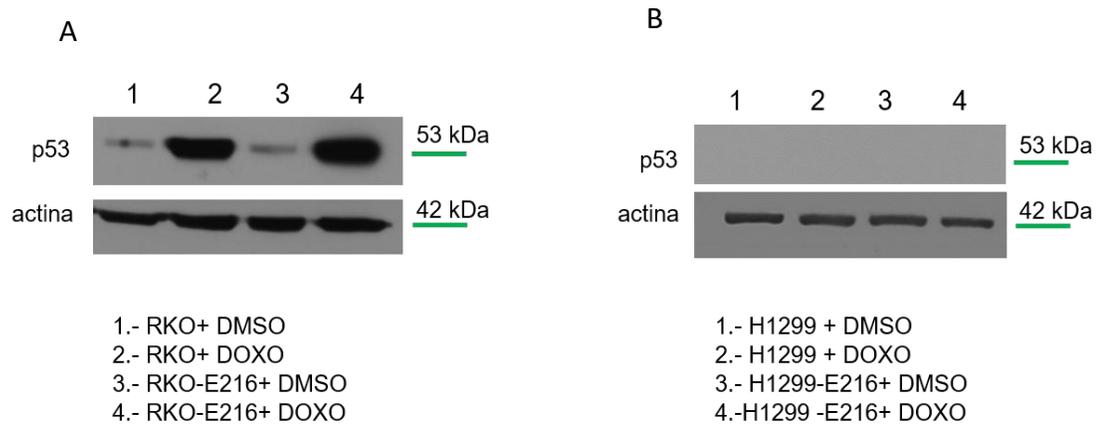


Figura 14. Expresión de la proteína p53 tras el daño al DNA. Los niveles de la proteína p53 se evaluaron por western blot, en presencia y ausencia de E2 VPH16, así como sin y con inducción de daño (vehículo/doxorubicina (DOXO) 0.5 μ M/ml por 8 horas), tanto en células p53^{+/+} (panel A) como p53^{-/-} (panel B), respectivamente.

Una vez que confirmamos que los niveles de p53 se incrementan tras el tratamiento con doxorubicina (DOXO), evaluamos la respuesta de algunos de los genes blanco de regulación transcripcional de la proteína p53, en presencia de E2 VPH16. Las líneas celulares fueron expuestas a doxorubicina (0.5 μ M/ml) por un tiempo de 8 horas y se obtuvo el RNA total para realizar la reacción de qRT-PCR. Los genes evaluados incluyeron genes de respuesta temprana y tardía según la severidad del daño provocado, dando información sobre el probable destino de la célula. Todos son blanco de regulación por la proteína p53, reportados por Shannon *et. al.* en 2013 (Tabla 2) [46].

Tabla 2. Genes regulados por p53, evaluados por qRT-PCR.

Respuesta temprana	
Con caja TATA	
<i>P21</i>	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1A
<i>MDM2</i>	Doble minuto murino
<i>Cdk5rap1</i>	Proteína 1 asociada a la subunidad reguladora CDK5
Sin caja TATA	
<i>BTG2</i>	BTG Factor anti-Proliferación 2
<i>PUMA</i>	Modulador de apoptosis sobre-regulado por p53
<i>IGF1R</i>	Receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1
Respuesta tardía	
Con caja TATA	
<i>DR5</i>	Receptor de muerte 5
Sin caja TATA	
<i>FAS</i>	Receptor de muerte de superficie celular FAS
<i>Apaf</i>	Factor activador de la proteasa apoptotica-1
<i>Sertad 1</i>	Proteína 1 con dominio SERTAD

Tomado de Shanon *et. al.* 2013

Los genes de respuesta temprana evaluados que participan en la regulación del ciclo celular son: *p21*, *BTG2*, *CDK5RAP1* e *IGFR1*, regulador *MDM2* y el gen pro-apoptotico *PUMA*, mientras que los de respuesta tardía son pro-apoptoticos e incluyen *DR5*, *FAS*, *Apaf-1*, *sertad1* y *NoxA*.

8.2 Evaluación de la expresión de genes regulados por p53 ante daño al DNA en presencia de E2 VPH16 en contexto p53 ^{+/+}.

Los resultados del tratamiento con doxorubicina y evaluación de la respuesta ante daño se muestran en la figura 15; la expresión de los genes *CDK5RAP1*, e *IGFR1* (panel A y B) no mostraron cambio en su expresión ni por la presencia de E2 VPH16 ni tras el tratamiento con doxorubicina, apoyando el hecho de que la activación de genes responsivos a p53 en gran medida depende del tipo de daño y del contexto celular.

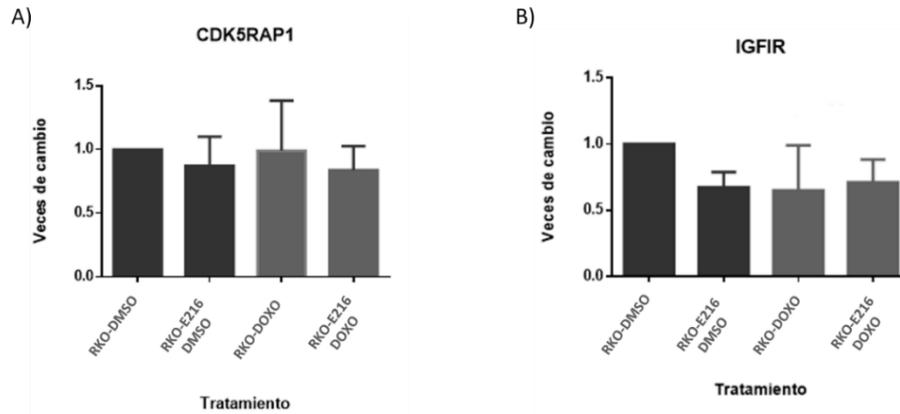


Figura 15. Expresión de genes CDK5RAP1 e IGFR en células RKO y RKO-E216 no tratadas y tratadas con doxorubicina. A) qRT-PCR de *CDK5RAP1* (proteína 1 asociada a la subunidad reguladora de la cinasa dependiente de ciclina 5). B) qRT-PCR de *IGFR* (receptor al factor de crecimiento tipo insulina). Sin diferencia significativa.

En el caso de genes relacionados con el arresto del ciclo celular, como *p21* (Figura 16 A columna 3). El incremento en la expresión de este gen es consistente con lo reportado, donde p53 censa el daño al DNA y activa su expresión; en células con expresión de E2 VPH16 tratadas con doxorubicina, el nivel de transcrito de *p21* es mayor en comparación con células sin expresión de E2 (Figura 16 panel A columnas 3 y 4).

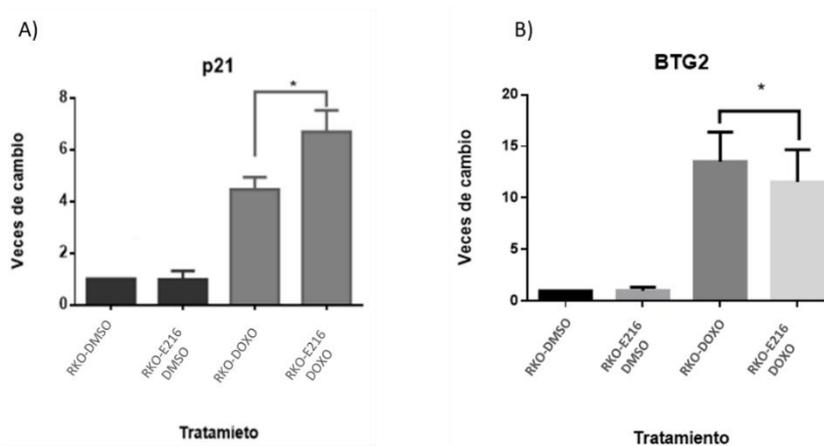


Figura 16. Expresión de genes p21 y BTG2 en células RKO y RKO-E216 no tratadas y tratadas con doxorubicina. A) RT-PCR de *p21*. B) RT-PCR de *BTG2* (Factor de anti-proliferación BTG2), * $p < 0.05$.

La expresión del gen *BTG2* se incrementa considerablemente tras el tratamiento con doxorubicina tanto en células con presencia de E2 VPH16 como en ausencia de la proteína viral; sin embargo, el incremento del transcrito en presencia de E2 es menor en comparación con células sin expresión de E2 (Figura 16 panel B columna 3 y 4), la proteína BTG2 participa en el punto de control de ciclo celular G1 en respuesta al daño al DNA en distintos tipos celulares [47]

Otros transcritos que incrementaron el nivel después del tratamiento con doxorubicina fueron *SERTAD*, *NOXA* y *APAF1*, sin que hubiera diferencia entre células sin la presencia de E2 o con la presencia de E2 (figura 17 panel A, B y C, columna 3 y 4, en cada panel). Estos resultados muestran que los promotores son regulados por p53 en presencia de daño y que E2 VPH16 no parece participar en su regulación.

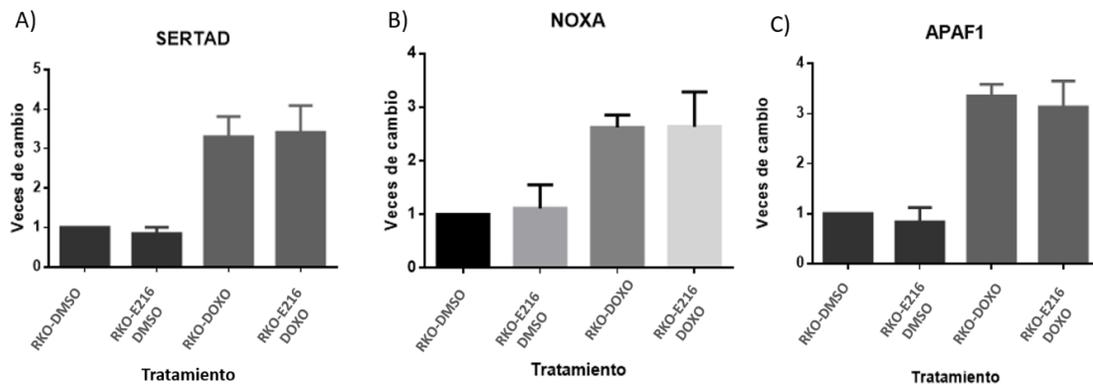


Figura 17. Expresión de genes SERTAD, NOXA y APAF1 en células RKO y RKO-E216 no tratadas y tratadas con doxorubicina. A) RT-PCR de SERTAD (co-activador transcripcional de SMAD1), B) RT-PCR de NOXA miembro de la familia BCL2. C) RT-PCR de APAF1 (Factor 1 activador de proteasa de apoptosis).

De los genes evaluados, un grupo de ellos mostró disminución del transcrito en presencia de E2 VPH16 en condiciones sin estrés como es el caso de: *MDM2*, *DR5*, *FAS*, y *PUMA*, todos los transcritos de los genes mencionados

responden a tratamiento de doxorubicina, sin que exista diferencia entre células que expresan o no a la proteína E2, figura 18 panel A, B, C y D.

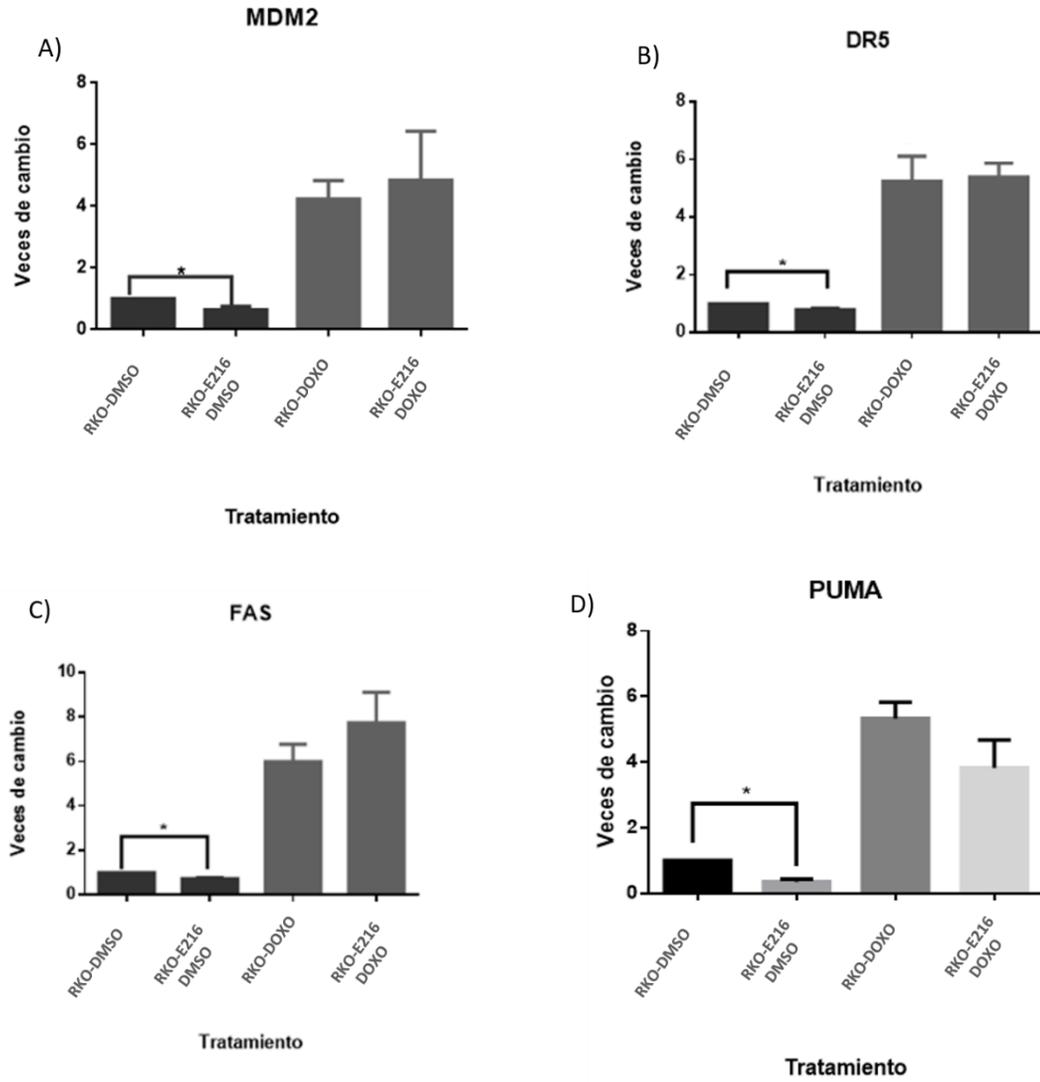


Figura 18. Expresión de genes MDM2, DR5, FAS y PUMA en células RKO y RKO-E216 no tratadas y tratadas con doxorubicina. RT-PCR de MDM2 (murine double minute 2), B) RT-PCR de DR5 (Receptor de muerte 5). C) RT-PCR de FAS (proteína transmembranal), D) RT-PCR de PUMA (Modulador de apoptosis sobre regulado por p53), * p<0.05.

Cabe mencionar que en el reporte de Shanon *et. al.* 2013, el transcritos de los genes pro-apoptóticos evaluados el nivel máximo del transcrito se alcanza

entre las 12 y 24 horas, por lo que sería conveniente evaluar por un tiempo más prolongado el comportamiento de estos genes para determinar si existe en ellos una diferencia cuando la proteína viral E2 VPH16 está presente.

Resumiendo, en la tabla 3, algunos de los genes analizados tanto de expresión temprana como de respuesta tardía, muestran cambios en sus niveles por la sola presencia de E2 de VPH16, mientras que otros no presentan cambios aún después de la inducción de daño al DNA, descartando así su participación en los mecanismos de respuesta a daño al DNA. La observación de que algunos de los genes evaluados (*MDM2*, *DR5*, *FAS*, y *PUMA*) sufran una modificación en el nivel de su transcrito por la sola expresión de E2, coincide con los reportes de que la expresión de E2 modifica genes implicados en apoptosis sin estímulos adicionales [18],[19].

Expresión



	DMSO		DOXORUBICINA	
	RKO	RKO E216	RKO	RKO E216
CDK5RAP1	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
IGFR I	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
SERTAD	Yellow	Yellow	Green	Green
APAF	Yellow	Yellow	Green	Green
NOXA	Yellow	Yellow	Green	Green
P21	Yellow	Yellow	Green	Dark Green
BTG2	Yellow	Yellow	Green	Light Green
MDM2	Yellow	Red	Green	Dark Green
DR5	Yellow	Red	Green	Light Green
FAS	Yellow	Red	Green	Light Green
PUMA	Yellow	Red	Green	Light Green

Tabla 3. **Resumen del nivel de expresión de genes evaluados.** El color verde representa el incremento del transcrito, en color amarillo nivel basal de expresión y en color rojo disminución en el transcrito.

Para tratar de entender el papel de E2 en la regulación de los genes blanco de p53, que mostraron modificación en el transcrito (*p21*, *BTG2*, *MDM2*, *DR5*, *FAS*, y *PUMA*) en las condiciones descritas (es decir, células positivas para p53), evaluamos el comportamiento de la expresión de estos mismos genes ante el tratamiento con doxorubicina en células sin presencia de la proteína p53. El modelo que se eligió para ello fue la línea celular H1299 por lo que se obtuvo una contraparte de esta línea celular transducidas con el lentivirus E2 VPH16.

8.3 Evaluación de la expresión de genes regulados por p53 ante daño al DNA en presencia de E2 VPH16 en contexto p53^{-/-}.

Las células H1299 fueron tratadas con doxorubicina por 8 horas, se extrajo el RNA y se evaluó la presencia de cada transcrito mediante RT-qPCR. El transcrito de los genes *MDM2* y *DR5* no se ve modificados por la sola presencia de E2 de VPH16 (figura 19 panel A y B columna 1 y 2), después del tratamiento con doxorubicina no se observó incremento en el nivel de transcrito, teniendo dependencia por p53 para su activación.

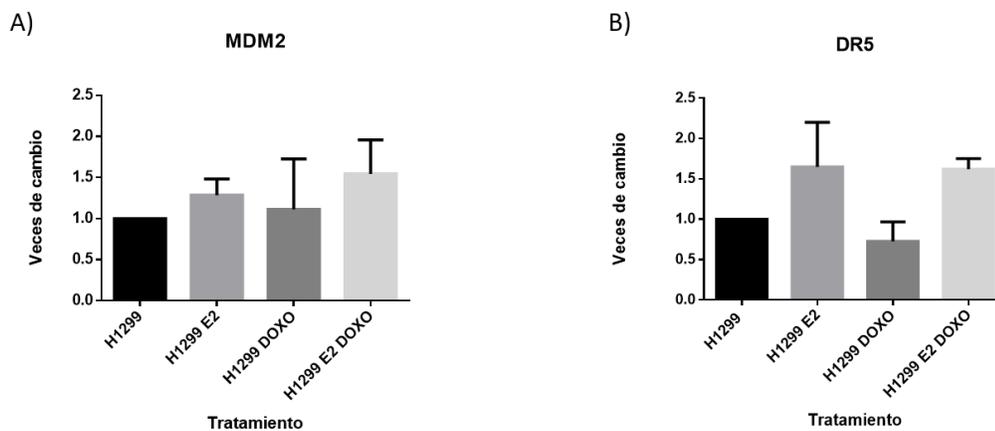


Figura 19. Expresión de genes *MDM2* y *DR5* en células H1299 y H1299-E216 no tratadas y tratadas con doxorubicina. A) RT-PCR de *MDM2*. B) RT-PCR de *DR5*.

En el caso de los transcritos de los genes *p21* y *BTG2* los resultados fueron interesantes ya que ambos muestran incremento en células con expresión de E2 VPH16, figura 20 panel A y B, columnas 3 y 4, en ambos paneles.

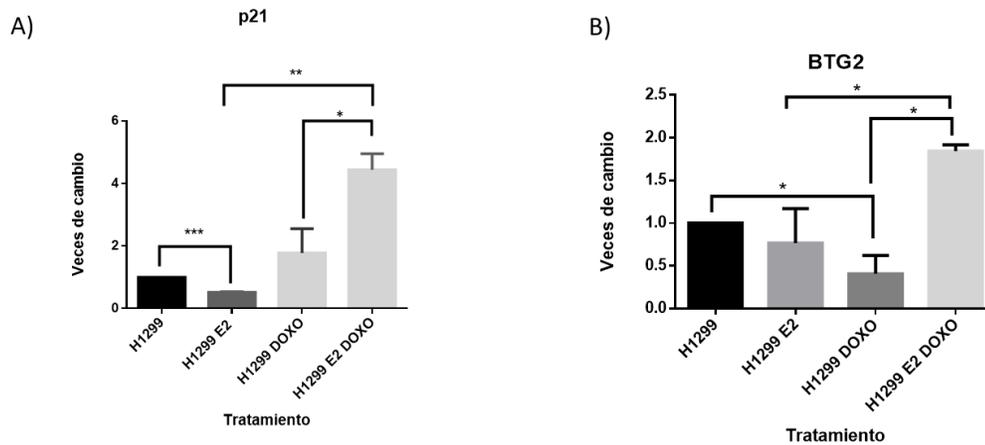


Figura 20. Expresión de genes *p21* y *BTG2* en células H1299 y H1299-E216 no tratadas y tratadas con doxorubicina. A) RT-PCR de *p21*, B) RT-PCR de *BTG2*, * $p < 0.05$, ** $p < 0.059$, *** $p < 0.0002$.

En cultivos celulares asincrónicos con expresión de E2 VPH16 y sin ningún estímulo particular, los niveles del transcrito de *p21* se ven disminuidos en comparación con el observado en células control (Figura 20 panel A columna 2). Después de la exposición a doxorubicina, el mRNA de *p21* muestra un incremento de 2.5 veces en las células control (Figura 20 panel A, columna 3), a pesar de la carencia de p53. Este resultado podría explicarse debido a que la región promotora de *p21* existen sitios de unión para distintos factores de transcripción, aunque la activación transcripcional por factores distintos a p53 está asociada mayormente a funciones como senescencia, diferenciación o apoptosis [48]. Resultó llamativo que en las células H1299-E2VPH16 tratadas con doxorubicina el transcrito de *p21* se elevó más de 4 veces en comparación con las células control (Figura 20 panel A, columna 4 y 3), al momento no se conocen sitios de unión para E2 VPH en la región promotora de *p21* que permitan suponer su activación se deba a la interacción directa por esta proteína viral, pero puede participar de manera indirecta al interactuar con

otros factores de transcripción. Se requieren de más experimentos que permitan dilucidar el mecanismo de activación de promotores blanco de p53 por E2 en ausencia de esta proteína celular.

El otro regulador negativo del ciclo celular que participa en el arresto en G1/S o G2/M que fue evaluado en células H1299 fue *BTG2*. El nivel de mRNA no mostró incremento tras la exposición de las células H1299 (p53^{-/-}) a doxorubicina, (Figura 20 panel B columna 1 y 3). Sin embargo, en cultivos con presencia de E2 VPH16 y con tratamiento con doxorubicina el nivel de transcrito se incrementa; se ha reportado que la activación de este gen de manera independiente de p53, ocurre vía PKC- δ [49].

Respecto a los genes implicados en apoptosis *FAS* y *PUMA* evaluados en este trabajo (Figura 21 panel A y B respectivamente) fue interesante observar que el tratamiento con doxorubicina no incrementó el nivel de transcrito, debido a la necesidad de la proteína p53 para la activación del promotor. En contraste, en células que expresan E2 VPH16 aumenta el nivel de transcrito de ambos genes, sugiriendo la participación de E2 en la regulación a nivel transcripcional de estos genes. E2 participa en la inducción de apoptosis de manera dependiente e independiente de su actividad transcripcional, tanto en células VPH positivas como VPH negativas.

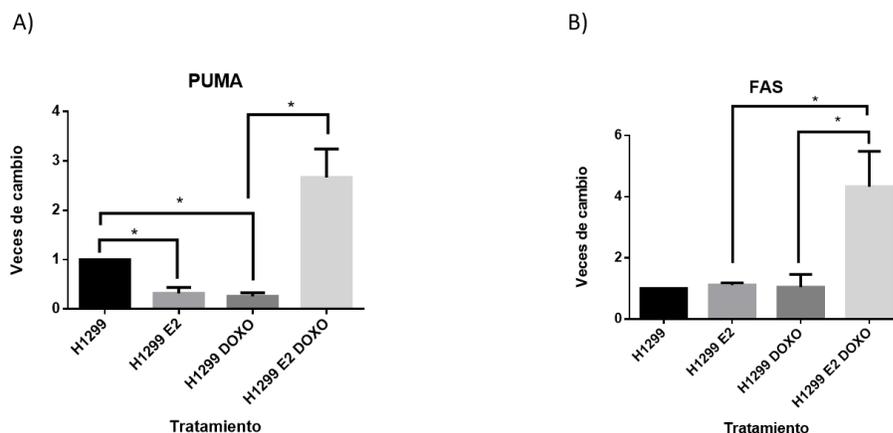


Figura 21. Expresión de genes PUMA y FAS en células H1299 y H1299-E216 no tratadas y tratadas con doxorubicina. A) RT-PCR de PUMA. B) RT-PCR de FAS, * p<0.05.

Se ha demostrado que E2 participa en la regulación transcripcional mediada por p53 de algunos promotores blanco, aunque se desconoce el mecanismo, pero la interacción directa entre estas proteínas (p53-E2) puede estar implicada; en ausencia de la proteína p53, la presencia de E2 favorecería la activación de promotores involucrados en la detección de ciclo celular y apoptosis. Nuevamente, se requiere de más experimentos que permitan conocer si en las vías de activación independientes de p53, E2 VPH16 podría tener una participación. En las tablas 4 y 5 se resumen estos resultados. En células sin expresión de p53 y después del daño a DNA inducido por doxorubicina, la presencia de E2 favorece la expresión de genes que participan en arresto de ciclo celular y apoptosis. En la tabla 4 y 5 se resumen la expresión de

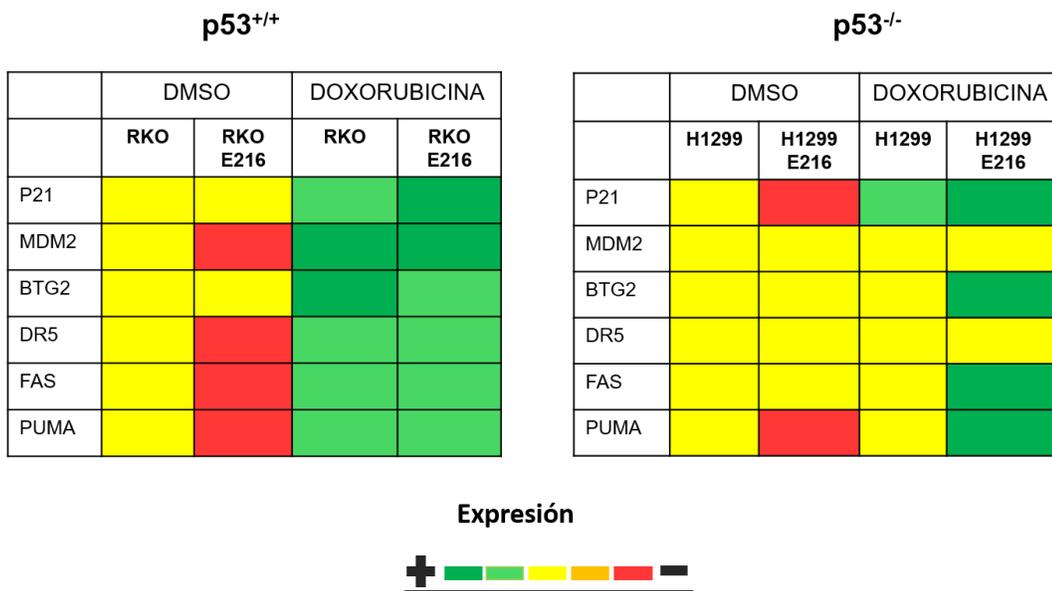


Tabla 4 y 5. Comparación entre un contexto p53^{+/+} y p53^{-/-}. Después del tratamiento con doxorubicina en las células con expresión de p53 se activa la expresión de genes relacionados con detención de ciclo celular y apoptosis, por otro lado, en células carentes de p53 la activación de genes relacionadas con los procesos antes mencionados parece estar relacionado con la presencia de E2 VPH16.

8.4 Participación de E2 VPH16 en la regulación del ciclo celular

Como se mencionó previamente la proteína viral E2 también interactúa con un amplio número de proteínas celulares, modificando procesos en los que estas se ven involucradas. En el grupo de trabajo en 2008 describió la interacción entre E2 y el factor de transcripción celular TAF1 [21], involucrado en el reconocimiento de la caja TATA y el reclutamiento de TBP o el elemento iniciador (Inr) en promotores carentes de caja TATA [50].

De acuerdo a los resultados obtenidos en el grupo de trabajo por García-Venzor (tesis de maestría), donde la expresión de E2 de VPH16 modifica la unión de TAF1 a promotores involucrados en la regulación del ciclo celular como ciclina D, ciclina A, p27, y GADD45, entre otros y como consecuencia el nivel de transcrito se ve modificado, en esta parte del trabajo determinamos si lo anterior tenía consecuencia sobre el ciclo celular. En el trabajo antes mencionado se empleó a la línea celular C-33 A, infectada con un adenovirus recombinante para permitir la expresión de E2 por periodos cortos de tiempo (48 horas, en ese trabajo), por lo que en este trabajo empleamos el sistema lentiviral que describimos en secciones previas, para transducir la misma línea celular y de esta manera permitir la expresión de E2 por un periodo prolongado de tiempo que permitiera realizar ensayos de sincronización y liberación.

8.4.1 Efecto de E2 en la fase G2/M del ciclo celular

En primera instancia se evaluó el perfil de ciclo celular de manera asíncrona en células sin expresión y con expresión de E2 de VPH16; cabe mencionar que, desde su infección hasta su empleo para estos ensayos, las células llevan un periodo de crecimiento de al menos 20 días. En la figura 22 se muestra el perfil de ciclo celular de células C-33 A y C-33 A-E2VPH16.

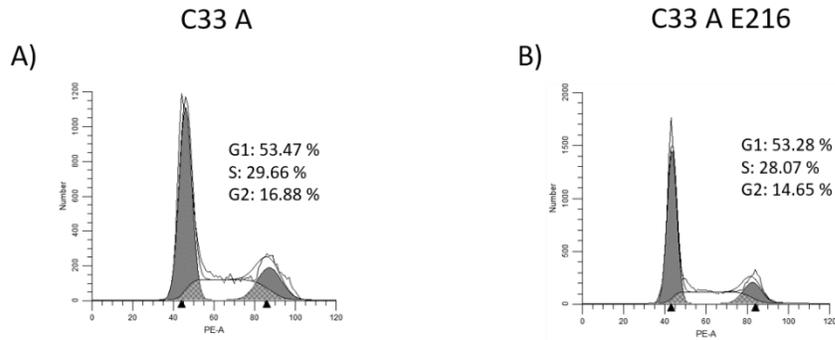


Figura 22. Perfil de ciclo celular de la línea celular C-33 A. A) Células no transducidas y B) transducidas con E2 HPV16.

El resultado muestra un perfil similar entre ambas líneas celulares, es decir el porcentaje en cada fase (G1, S y G2/M) es similar. Para tratar de evidenciar algún efecto de E2 sobre el ciclo celular de la línea celular C-33 A se emplearon dos métodos para sincronizar a las células en dos fases del ciclo celular, en G0/G1 y G2/M empleando medio RPMI y nocodazol respectivamente.

Para la sincronización celular en fase G2/M las células se incubaron con nocodazol por 48 horas, la acción del nocodazol ocurre evitando la polimerización de los microtúbulos; posteriormente se retiró el medio con el fármaco y se reemplazó por medio completo con suero al 10% cosechando las células a las 3, 6, 9, 12, 24 y 30 horas, para ser analizadas por citometría de flujo.

En la figura 23 panel A y B se muestra el perfil de ciclo celular asíncrono en ambas líneas celulares. En los paneles C y D, se observa el resultado de la sincronización con nocodazol, donde se alcanza un enriquecimiento en la fase G2/M de un 80 % aproximadamente, en ambas líneas celulares.

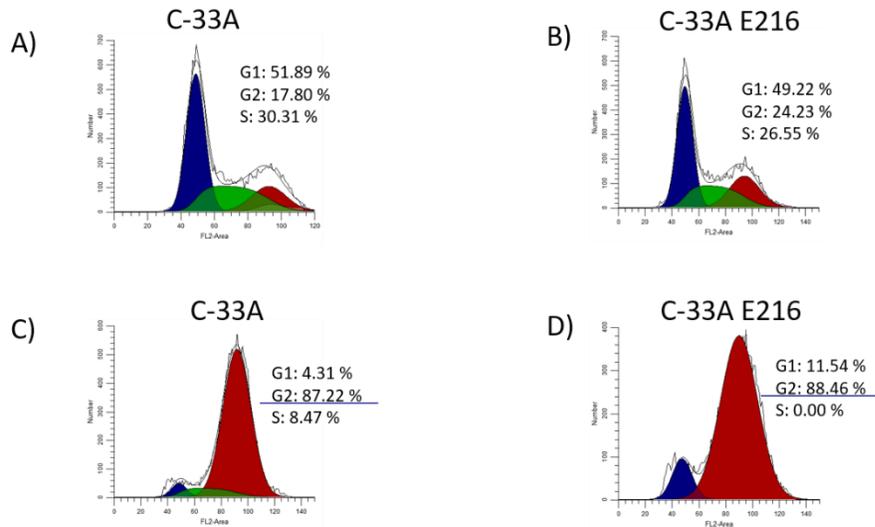


Figura 23. Perfil de ciclo celular de células sin y con expresión de E2 VPH16. A y B) Cultivo asíncrono de células C-33A y C-33A E216. C y D) Cultivo síncrono de células C-33A y C-33A E216 en fase G2/M, con nocodazol al 0.2 µg/ml-Sigma por 20 horas

Posterior a la sincronización en fase G2/M, las células se cosecharon a distintas horas, en la figura 23 se muestra el perfil de ciclo a las 3 y 6 horas, a estas horas no se aprecia diferencia entre células sin expresión y con expresión de E2.

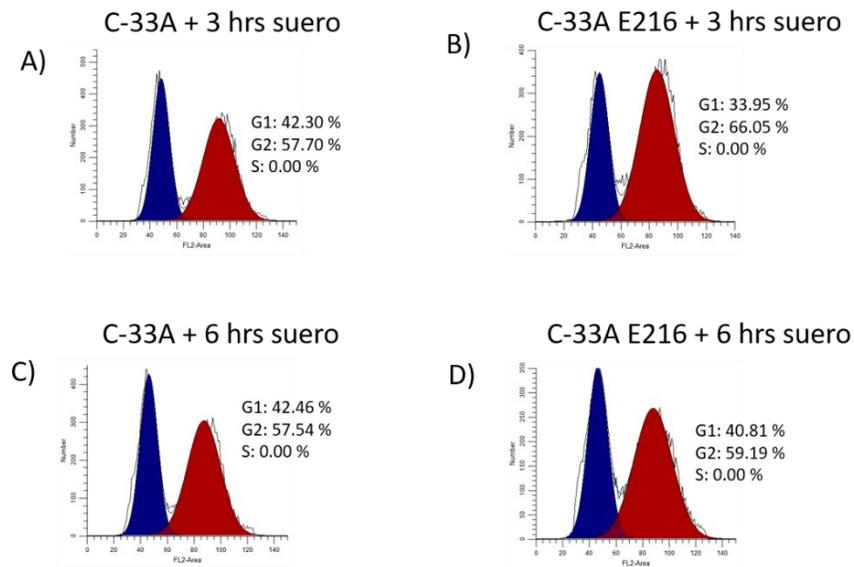


Figura 23. Perfil de ciclo celular de células sin y con expresión de E2 VPH16. A y B) Células C-33A y C-33A E216 tras 3 horas con suero al 10%, C y D) Células C-33A y C-33A E216 tras 6 horas con suero al 10%.

A las 9 horas, en las células sin expresión de E2 se aprecia que se inicia la entrada a la fase S, es decir abandonan la fase G1 a diferencia de las células con expresión de E2 donde a las mismas horas de liberación, aún no llegan a la fase S del ciclo (figura 24 panel A y B). Algo similar se observa a las 12 horas tras la liberación del tratamiento con nocodazol, en células con expresión de E2 donde el porcentaje de células en fase S, es decir que han abandonado la fase G1 es menor (figura 24 C y D).

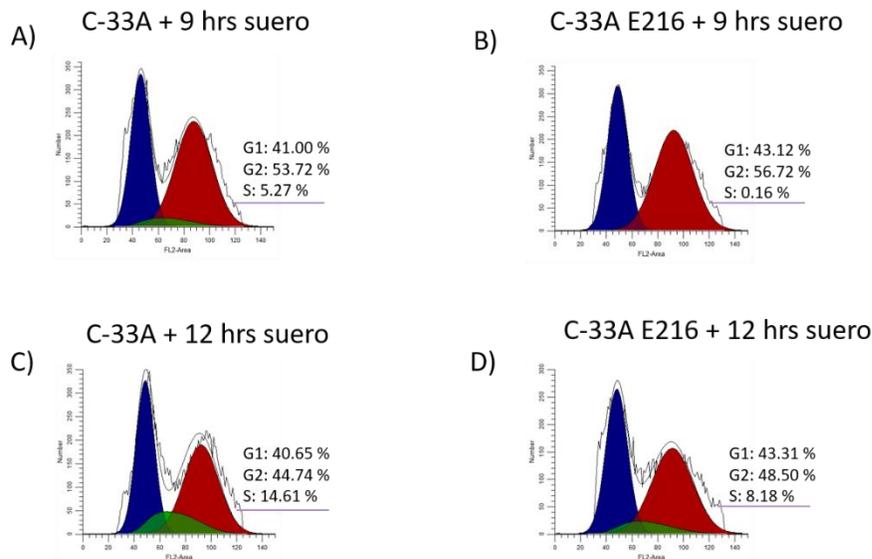


Figura 24. Perfil de ciclo celular de células sin y con expresión de E2 VPH16. A y B) Células C-33A y C-33A E216 tras 9 horas con suero al 10%, C y D) Células C-33A y C-33A E216 tras 12 horas con suero al 10%

Siguiendo la cinética de liberación el perfil de ciclo, se realizó su evaluación a las 24 y 30 horas, donde un mayor número de células en fase S se aprecia en células sin expresión de E2 (figura 25), sugiriendo que en células con expresión de E2 el tránsito por la fase G1 es más lenta en comparación con células sin expresión de la proteína viral.

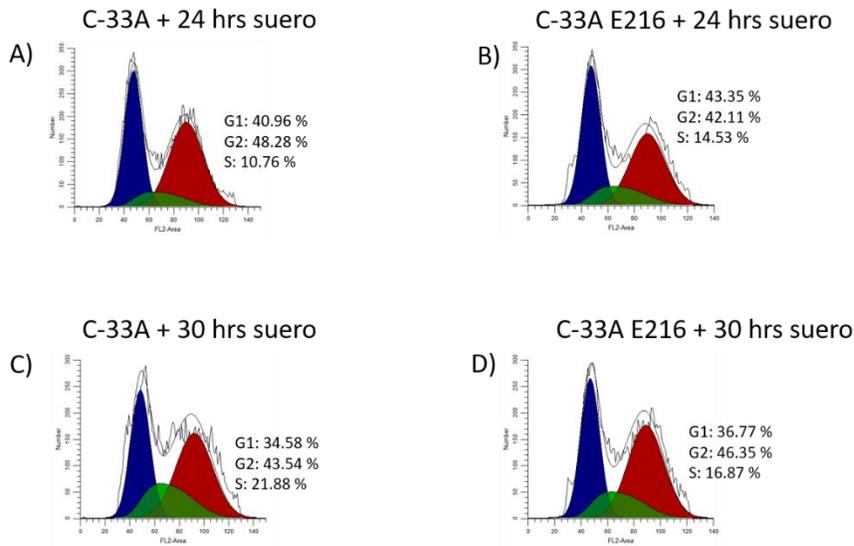


Figura 25. Perfil de ciclo celular de células sin y con expresión de E2 VPH16. A y B) Células C-33 A y C-33 A E216 tras 24 horas con suero al 10%, C y D) Células C-33 A y C-33 A E216 tras 30 horas con suero al 10%

8.4.2 Efecto de E2 en la fase G1 del ciclo celular

De manera adicional la línea celular C-33 A sin y con expresión de E2 de VPH16 fue sincronizada en fase G1; para este fin se utilizó medio RPMI libre de isoleucina (RPMI), Cifuentes y col., en 2013 reportaron el uso de este medio para sincronizar células de cáncer de próstata en fase G1. Esta metodología funciona ya que el aminoácido isoleucina al no estar presente en el medio evitará la formación de proteínas donde este aminoácido forme parte.

Las células fueron incubadas durante 24, 48 y 72 horas con medio RPMI con la finalidad de enriquecer a las células en la fase G1; el porcentaje de células en esta fase en ambas líneas celulares durante los tiempos mencionados alcanzó en promedio el 60 % (figura 26 panel C y D y figura 27 panel A, B, C y D).

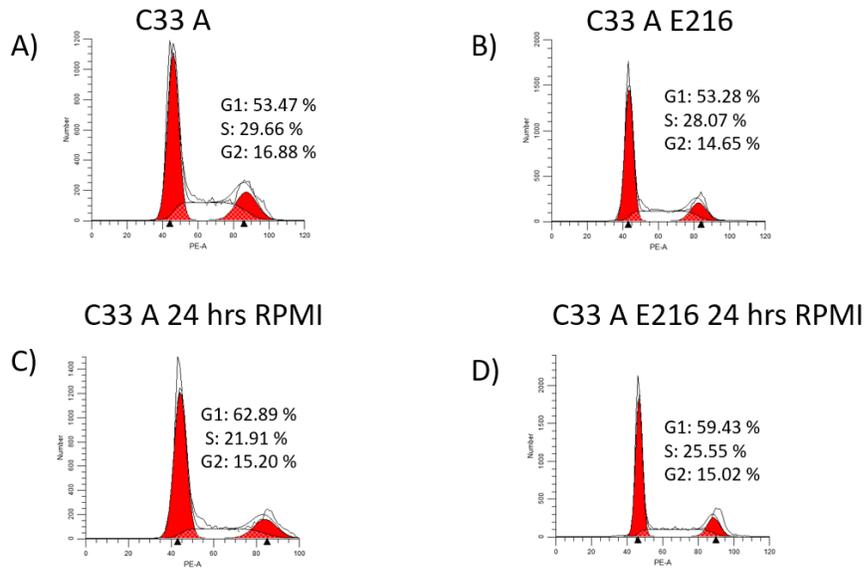


Figura 26. Perfil de ciclo celular de células sin y con expresión de E2 VPH16. A y B) Células C-33A y C-33A E216 en cultivo asíncrono, C y D) Células C-33A y C-33A E216 tras 24 horas en medio RPMI libre de isoleucina

Incubación de células sin y con expresión de E2 por 48 y 72 horas con medio RPMI (figura 27 panel A, B, C, D), el porcentaje en las distintas fases del ciclo celular es similar entre ambas líneas celulares.

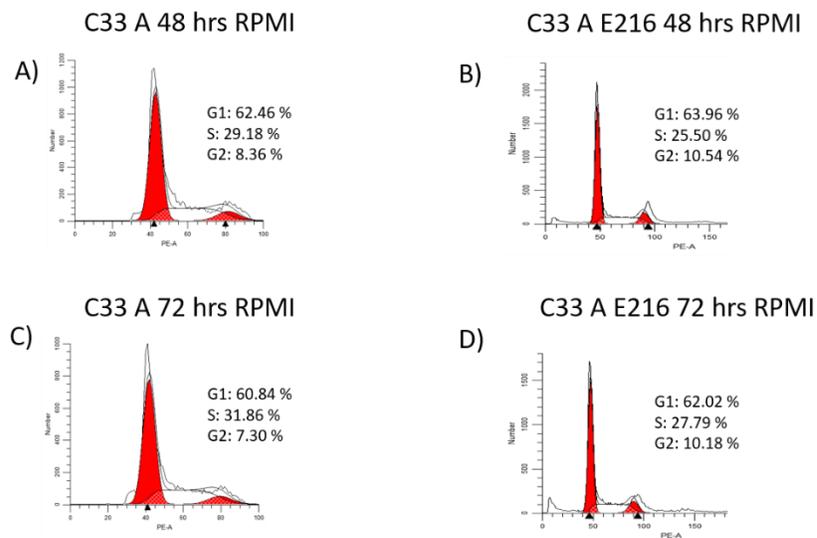


Figura 27. Perfil de ciclo celular de células sin y con expresión de E2 VPH16. A y B) Células C-33A y C-33A E216 tras 48 horas en medio RPMI libre de isoleucina, C y D) Células C-33A y C-33A E216 tras 72 horas en medio libre de isoleucina.

Para los ensayos posteriores de arresto y liberación se decidió utilizar el tiempo de 48 horas para el enriquecimiento en fase G1, pasado este tiempo se cambió el medio remplazándose por medio completo y las células cosechadas para su análisis por citometría a las 4, 8, 12, 24 y 30 horas.

En células con crecimiento asíncrono el porcentaje en las distintas fases del ciclo celular son muy similares entre células sin expresión y con expresión de E2 (Figura 28 panel A y B).

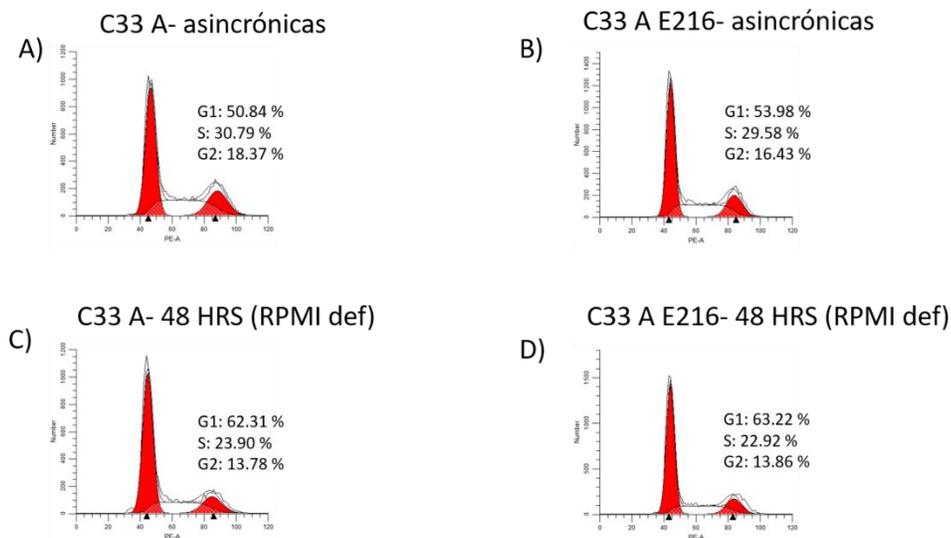


Figura 28. Perfil de ciclo celular de células sin y con expresión de E2 VPH16. A y B) Células C-33A y C-33A E216 en cultivo asincrónico, C y D) Células C-33A y C-33A E216 tras 48 horas en medio RPMI libre de isoleucina.

Después del arresto por 48 horas se cosecharon las células las células a las 4 y 8 horas, como se observa en la figura 29 panel A, B, C y D, el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo entre células sin expresión y con expresión de E2 es similar (Figura 29 panel A, B, C y D).

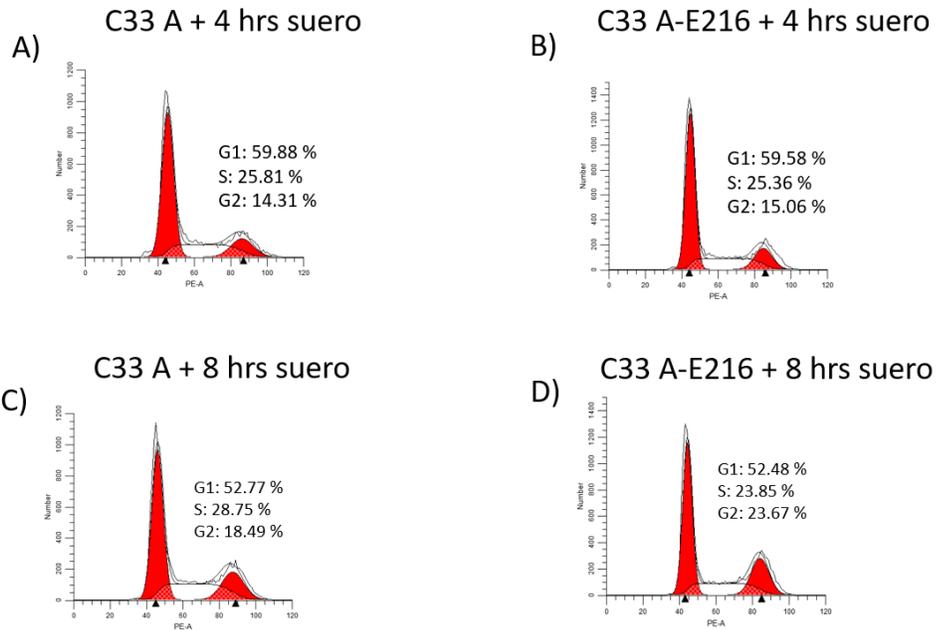


Figura 29. Perfil de ciclo celular de células sin y con expresión de E2 VPH16. A y B) Células C-33A y C-33A E216 después de 4 y 8 horas con suero

Después de 12 horas de liberación el porcentaje en la fase S en células sin expresión con E2 es mayor en comparación con células que expresan E2, figura 30 panel A y B. Algo similar ocurre en el perfil de ciclo celular a las 24 horas post-liberación figura 30 panel C y D, es decir, en células sin expresión de E2 el porcentaje de células en fase S es mayor en comparación con células que expresan E2, figura 30 panel C y D.

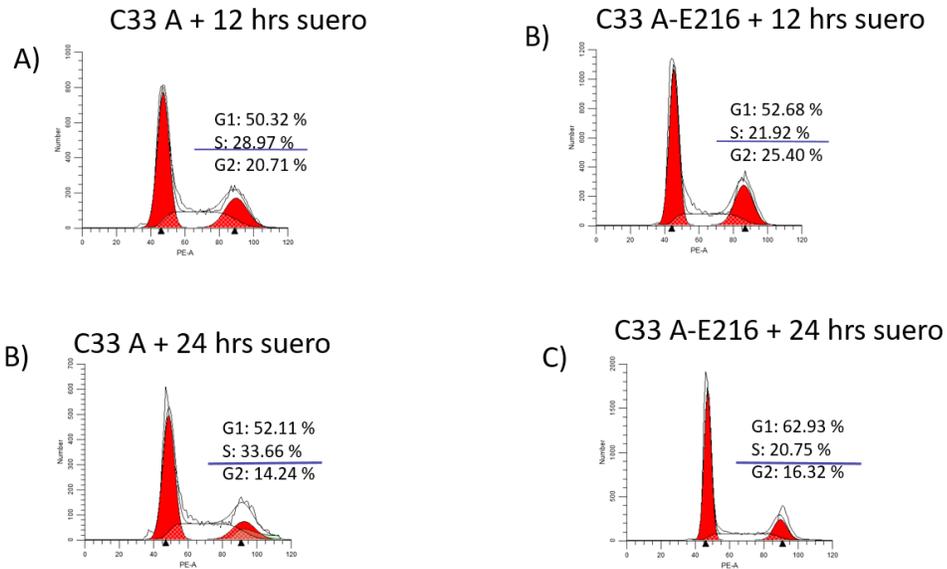


Figura 30. Perfil de ciclo celular de células sin y con expresión de E2 VPH16. A y B) Células C-33 A y C-33 AE216 después de 4 y 8 horas con suero

El último tiempo se evaluó a las 30 horas tras la liberación manteniendo un comportamiento similar al perfil del ciclo observado en tiempos de liberación previos (12 y 24 horas).

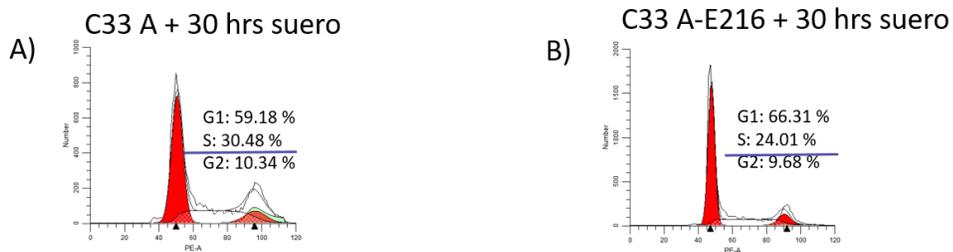


Figura 31. Perfil de ciclo celular de células sin y con expresión de E2 VPH16. A y B) Células C-33A y C-33A E216 después de 30 horas con suero

Tomando en cuenta los antecedentes donde genes reguladores de la fase G1 del ciclo se ven modificados tras la expresión de E2, así como la unión del regulador transcripcional TAF1, se evaluó la expresión de *ciclina D*, *p27*. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 32.

8.4.3 Evaluación de genes asociados a fase G1 del ciclo celular

Se observa un incremento en el transcrito de un 50% para *ciclina D* y 100% en el caso de *p27* (Figura 32, panel A) cuando la proteína E2 está presente. Para determinar la posible modificación en la unión de TAF1 a los promotores de los genes analizados se realizó inmunoprecipitación de cromatina. Como se aprecia en la figura 32 panel B, la presencia de E2 de VPH16 modifica la unión de TAF1, ya que en el caso de *ciclina D* y *p27* se detectó una disminución en la unión de TAF1 (50% y 30% respectivamente).

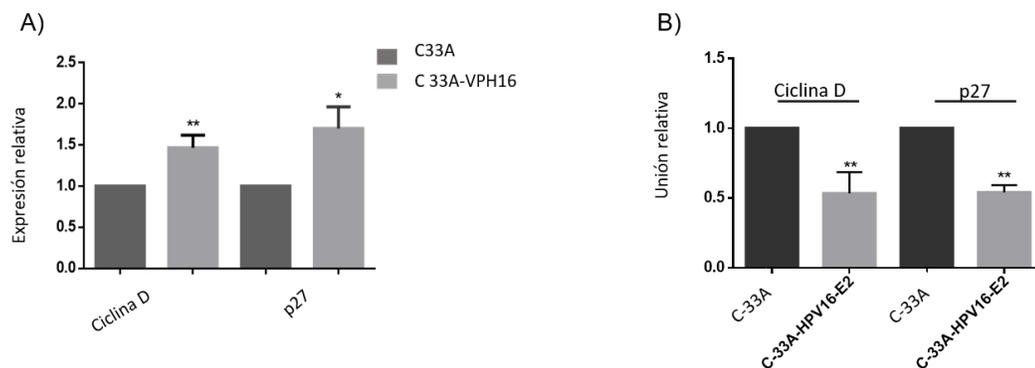


Figura 32. Expresión de *ciclina D1* y *p27* y unión de TAF1 a promotores responsivos. A) Los niveles de transcritos de *ciclina D* y *p27* fueron evaluados por RT-qPCR. B) Unión de TAF1 a los promotores de *ciclina D* y *p27*.

Los resultados de expresión correlacionan con el retraso en la salida de la fase G1 observado en células con expresión de E2VPH16 (sincronización en fase G2/M y G1). Aunque *ciclina D* es la subunidad reguladora del complejo formado con Cdk4 o Cdk6, cuya actividad es necesaria para la transición G1/S, su incremento no explicaría por sí mismo el retraso en la fase G1; sin embargo, la sobre-expresión de *p27* está asociada con una detención del ciclo celular debida a su unión a *ciclina D* de manera individual o en complejo con Cdk4, inhibiendo la actividad catalítica, por lo que el incremento observado a nivel de

mensajero de p27 podría explicar el retraso en la salida de la fase G1; lo anterior nos llevó a evaluar los niveles de la proteína p27 como pieza importante de la regulación de la fase G1/S.

Lo que se observó fue que el nivel de las proteínas p27 y ciclina D se incrementan en células con expresión de E2 en comparación con células carentes de ella (figura 33 panel A y B)

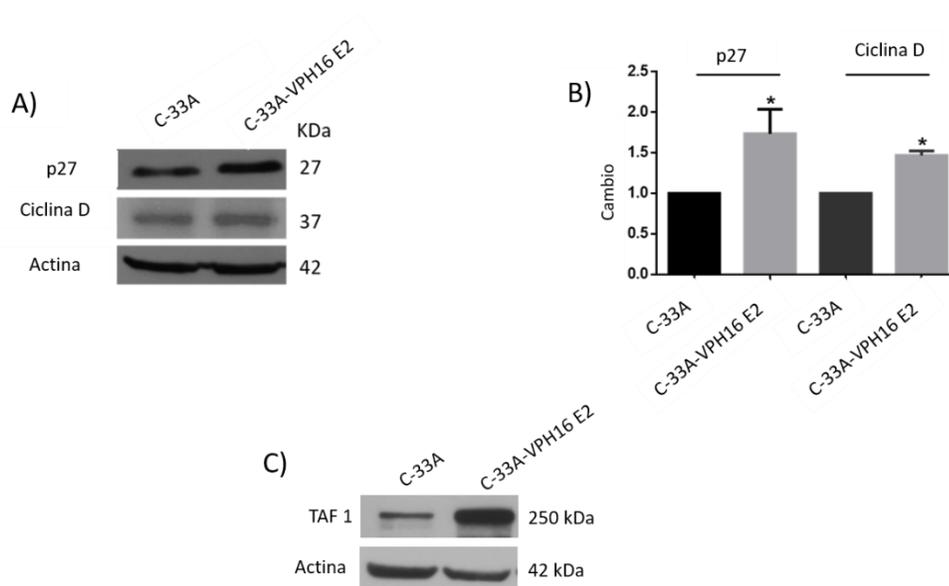


Figura 33. Nivel de proteína de p27, ciclina D y TAF1. A) Western blot de p27 y ciclina D, B) Análisis de densitometría de A. C) Western blot para la proteína TAF1.

En el trabajo de tesis de Ramírez-Salazar en 2011, se reportó que el nivel de mRNA de una importante cantidad de genes implicados en la transición G1/S del ciclo celular son alterados tras la expresión de E2 de VPH16, entre ellos TAF1, por lo que se decidió evaluar a nivel de proteína. Para el ensayo de western blot se realizó extracción de proteínas totales de las distintas líneas celulares empleadas en este trabajo en condiciones de crecimiento asincrónico; se aprecia un mayor nivel de proteína TAF1 en células con

expresión de E2VPH16 en comparación con células sin expresión de E2 (figura 33 panel C).

Los resultados obtenidos sugieren la participación de la proteína viral E2 en la regulación de la transición G1/S del ciclo celular, involucrando al factor de transcripción general TAF1, cuya actividad modifica la expresión de diversos genes celulares involucrados en la regulación de esta fase; el retraso observado en la salida de la fase G1 puede traer beneficios para el virus particularmente en la replicación del genoma viral permitiendo tener los elementos necesarios para que se lleve a cabo de manera exitosa.

9.- DISCUSIÓN.

La expresión elevada de la proteína E2 puede ser tóxica, tanto en células transformadas por VPH en donde la represión transcripcional de los oncogenes virales *E6-E7* y la reactivación de supresores de tumor p53 y RB resulta en la inhibición de la proliferación y/o en la muerte celular [1-3], así como en líneas celulares carentes de VPH, en las que su sobre-expresión induce muerte celular de manera independiente pero también dependiente de p53 [3,4], involucrando ya sea su actividad transcripcional (activación de caspasa 8), o bien otras funciones de supresor tumoral [5,6]. Sin embargo, diversos trabajos han demostrado que la expresión de esta proteína viral en niveles lo suficientemente bajos en un ambiente carente de otros productos génicos de VPH, como es el caso de las células CHO49 [56], U2OS [4–6], HaCaT [7,8] y C33 A [60], es compatible con la sobrevivencia celular, haciendo posible mantener las líneas celulares durante varios pasajes. Coincidiendo con lo anterior, en este trabajo haciendo uso de un sistema lentiviral logramos la expresión de E2 del VPH16 por varios pasajes en células C33 A, RKO y H1299 (Figura 12 y 13 panel A, B, C).

Entre las proteínas con las que E2 interactúa, la que sucede con p53 ha sido poco estudiada. De manera reciente se demostró que en células VPH16 positivas se mantienen niveles bajos de la proteína p53, y que su interacción con E2 es importante para completar el ciclo viral de manera exitosa, ya que al perderse esta interacción las células mostraron inhibición de la proliferación, senescencia e incremento de daño al DNA, evidenciando que la expresión de p53 es importante durante el ciclo viral [61]. En nuestro trabajo se evaluó la participación de E2 en la respuesta mediada por p53 ante daño al DNA observando que algunos genes no modificaron su expresión después del daño al DNA inducido por doxorubicina, como es el caso de *IGFR*, *CDK5RAP1*. Esto indica que aparentemente estos genes no están asociados con la respuesta a daño al DNA inducido por este fármaco (figura 15 panel A y B), debido a que la respuesta orquestada por p53 depende del tipo de daño y del contexto

celular. Por ejemplo, la expresión y actividad de *CDK5RAP1* depende del tipo celular, ya que la deficiencia en su expresión induce arresto del ciclo celular y apoptosis en células de cáncer de mama [62], mientras que en células cerebrales su actividad no está asociada a la regulación del ciclo celular, pero sí con la diferenciación y regulación de las dinámicas del neurocitoesqueleto [63].

Uno de los genes regulados por p53 mejor conocidos es p21. En este trabajo se observó incremento en el transcrito de p21 tras el tratamiento con doxorubicina, siendo más evidente en células que expresan E2; una posible explicación es que en células con expresión de E2 la interacción p53-E2 promueva o establezca la unión de p53 al promotor de p21, favoreciendo su expresión.

Se ha reportado que BTG2 en células HeLa tras el tratamiento con doxorubicina induce muerte celular aunado a un incremento en el nivel de la proteína [64]; en este trabajo el nivel de transcrito en presencia de E2 es menor en comparación con células sin E2 (figura 16 panel B columna 3 y 4), quizá esta diferencia a nivel de RNAm se vea reflejado en el nivel de proteína evitando así la muerte celular por BTG2 y favoreciendo el arresto celular [64].

En el caso de los genes inductores de apoptosis como *DR5*, *NOXA*, *SERTAD*, y *APAF* (figura 17 panel A, B y C columnas 3 y 4), se produjo respuesta al tratamiento con doxorubicina, como era de esperarse, debido a que en la región promotora de estos genes existen sitios responsivos a p53 [65], sin que exista diferencia entre células sin y con expresión de E2. En otro grupo de genes como es el caso de *MDM2*, *DR5*, *FAS* y *PUMA*, después del tratamiento con doxorubicina se muestra respuesta ante daño, sin que exista diferencia entre la ausencia y presencia de E2 (figura 18, panel A, B, C y D columnas 3 y 4), por un lado, estos resultados muestran que E2 podría participar en la respuesta ante daño al DNA favoreciendo la expresión de genes reguladores del ciclo celular más que genes apoptóticos, y por otro, que la regulación es específica a ciertos genes celulares. Algo que llamo la atención fue la

regulación a la baja del transcrito de los genes previamente mencionados (*MDM2*, *DR5*, *FAS* y *PUMA*) en condiciones sin estrés celular (figura 18, panel A, B, C y D columnas 1 y 2), estos resultados concuerdan con lo conocido respecto a que E2 regula la expresión de genes asociados con apoptosis, proliferación [16], por la interacción con proteínas celulares que regulan la expresión de los genes mencionados.

Los resultados obtenidos en células carentes de $p53^{-/-}$ después de la exposición a doxorubicina resultan interesantes, permitiéndonos evaluar la posible participación de E2 VPH16 en la regulación después del daño a DNA. En el caso de *MDM2* y *DR5* (figura 19 panel A y B) no hubo cambio en el transcrito ni por la presencia de E2, ni por el tratamiento por doxorubicina, ambos son genes con sitios canónicos de reconocimiento por p53, dependientes de la unión de esta proteína celular para inducir su expresión [39]. Los dos genes reguladores del ciclo celular evaluados en este trabajo *p21* y *BTG2*, muestran incremento en el transcrito después del tratamiento con doxorubicina en células con expresión de E2 (figura 20 panel A y B columnas 3 y 4); algo similar ocurre con los genes pro-apoptóticos *PUMA* y *FAS* (figura 21, panel A y B columnas 3 y 4), sugiriendo que E2 VPH16 interfiere en la regulación transcripcional de estos promotores después de daño al DNA. Parte de la explicación puede implicar la interacción de E2 con proteínas relacionadas en la respuesta a daño a DNA, como TopBP1, PARP, BRAC1, afectando su función. Adicionalmente, reportes previos muestran que algunos de los promotores blanco de p53 son activados de manera independiente a esta proteína, involucrando las vías como ATM/ATR en respuesta a distintos estímulos que dañan al DNA, como la exposición a radiación ionizante, doxorubicina, cisplatino, entre otros [66], [67] y la participación de proteínas como p65 en la regulación de genes blanco de p53 en ausencia de esta proteína [68], así como la participación de la vía PKC-d [49]. Se requieren experimentos adicionales que permitan concluir si lo observado en células H1299 ($p53^{-/-}$) es debido a que E2 influye en la regulación transcripcional de los genes evaluados de manera directa uniéndose al promotor, o indirecta al

interactuar con proteínas celulares; si bien el mecanismo no fue determinado en este trabajo, el hecho de que genes que favorecen el arresto celular o apoptosis se vean incrementados en presencia de la proteína viral, podría ser una acción por parte de E2 VPH16 para favorecer completar el ciclo viral de manera exitosa evitando que las células que presentan daño mueran y de esta manera mantener la infección viral persistente.

La participación de E2 en la regulación del ciclo celular se ha reportado previamente; por ejemplo, la eliminación del punto de control mitótico, relacionado con el recambio de p53 [69]. Los antecedentes en el grupo de trabajo hicieron suponer la participación de E2 VPH16 en la regulación del ciclo celular, por lo que se evaluó en las células C-33 A, línea celular empleada en el trabajo previo. La sincronización en fase G2/M con nocodazol y su liberación del arresto, permitió observar un retraso en la salida de la fase G1 del ciclo en células con expresión de E2 en comparación con células sin expresión, ya que el enriquecimiento en la fase S ocurre primero en células carentes de E2 (figura 24 y 25). De la misma forma, sincronizar a las células en fase G1/S empleando medio RPMI isoleucina-*free* y ser liberadas del arresto, mostró nuevamente el retraso en la salida de la fase G1/S a las 24 horas y 30 horas post-liberación (figura 30 y 31); este retraso podría estar asociado con cambios en la expresión de genes dependientes de TAF1 involucrados en esta transición, como: *Ciclina D* y *p27*. La unión de TAF1 no se ve incrementada en presencia de E2, por el contrario, se observa disminución en la unión al promotor de ciclina D y p27 (figura 32 B). El impacto de la unión de TAF1 en la expresión de los genes evaluados se comprobó al medir los cambios en los niveles de transcrito, y resultó interesante observar que a pesar de una disminución en la unión de TAF1 en los promotores de ciclina D y p27, los niveles de transcrito se elevan en células con expresión de E2 en comparación con células sin expresión del transgen viral (figura 32 A). Posiblemente, además de la unión de TAF1 al promotor, son necesarias sus diversas funciones enzimáticas para generar un ambiente propicio y permitir la activación transcripcional. Hilton T. L. *et al.*, en 2005 demostraron la importancia de la actividad de histona acetil-

transferasa (HAT) de TAF1, reportando que esta función es fundamental para permitir la unión de SP1 al promotor de ciclina D y activar su transcripción. Basado en ello, nuestros resultados sugieren que a pesar de la disminución en la unión al promotor de ciclina D y p27, la cantidad de proteína TAF1 presente es suficiente para acetilar histonas y generar un ambiente que permita la unión de activadores transcripcionales como SP1, aunado a la posibilidad de que E2 participe en promover cambios en la cromatina que permitan la activación transcripcional, como previamente ha sido sugerido [17]. Estos resultados confirman que la regulación transcripcional mediada por TAF1 es diferencial dependiendo del promotor del que se trate [30], indicando también que los mecanismos de regulación transcripcional por este factor van más allá de la sola elevación a nivel de proteína (figura 33 panel C).

Un punto a señalar es que en la línea celular C33 A reguladores importantes del ciclo celular como son p53 y pRB, se encuentran mutados. El gen p53 presenta una mutación puntual que resulta en la pérdida de su capacidad de unión al DNA perdiendo la capacidad de unión a promotores responsivos. En la línea celular se observa expresión de pRB, la mutación en el gen lleva a la pérdida de unión a E2F y el control negativo en el ciclo celular. Lo anterior, se relaciona con la dificultad en poder sincronizar en fase G1 a las células C33 A, ya que el enriquecimiento al usar medio libre de isoleucina fue del 60 % aproximadamente; evaluar los efectos de E2 sobre el ciclo celular en un ambiente p53 y pRB en su versión *wild type*, dará información relevante ya que en la transición de la fase G1/S participan ambas proteínas celulares.

El retraso en la salida de la fase G1 hacia la fase S puede explicarse por la elevación de p27 (figura 33 panel A). Como parte de la familia CIP/KIP, p27 regula de manera negativa la actividad del complejo ciclina E/CDK2, por lo que un nivel elevado de este inhibidor evitaría la transición de G1/S, ya que para una exitosa transición a la fase S se requiere de bajos niveles del inhibidor (p27) y cantidades elevadas de CycA, que en presencia de CDK2 con las modificaciones postraduccionales apropiadas, promueve la progresión por

esta fase del ciclo celular. La modificación del ciclo celular de la célula hospedera infectada es una estrategia frecuentemente empleada tanto por virus de DNA como de RNA, afectando mediante diversos mecanismos puntos importantes en el control del ciclo celular como son: transición G0/G1, G1/S y G2/M [70] [71].

Nuestros resultados revelan que la expresión constante de niveles bajos de E2 modifica la expresión de TAF1. En el caso de las células C-33 A E216 observamos un aumento de la proteína de TAF1 (figura 33 panel C), sugiriendo que E2 de VPH16 puede regular directa o indirectamente la transcripción de TAF1, o bien, que la interacción entre las proteínas E2-TAF1 previamente descrita [21], podría ocasionar la estabilización de este factor de la maquinaria de transcripción basal.

Cabe mencionar que el análisis del promotor de TAF1 en el grupo de trabajo indicó la presencia de un potencial sitio de unión para E2 con la secuencia ACCGcgtcCGGT (ACCGN₄CGGT; sitio de unión para E2 reportado), así como para otros factores de transcripción celular con los que E2 interactúa como: CREB1, Sp1 y p53; también presenta sitios de unión para la familia de factores de transcripción E2F, por lo que la expresión de TAF1 podría fluctuar a lo largo del ciclo celular como ocurre con otros promotores regulados por esta familia de factores de transcripción. Sin embargo, determinar si el mecanismo de regulación de TAF1 mediado por E2 de VPH16 ocurre a nivel transcripcional, de interacción proteica o si involucra la participación de otras proteínas celulares requiere de más experimentos.

10.- CONCLUSIONES.

- La E2 de VPH16 modifica la expresión de genes blanco de p53 implicados en la regulación del ciclo celular como *p21* y *BTG2* tras el daño a DNA en células RKO con p53 *wild type*.
- E2 de VPH16 altera la expresión de genes involucrados en respuesta a daño al DNA como *p21*, *BTG2*, *PUMA* y *FAS* en células H1299 sin expresión de la proteína p53
- La presencia de E2 de VPH16 modifica la expresión de la proteína TAF1 en la línea celular C-33 A.
- El incremento en la proteína TAF1 inducido por la expresión de E2, favorece la expresión del regulador negativo del ciclo celular p27 en células C-33 A E2VPH16.
- El aumento en la expresión de TAF1 y p27 provoca retraso en la salida de la fase G1 en células C-33 A con expresión de E2 de VPH16.

11.- PERSPECTIVAS.

Durante el desarrollo del presente trabajo se observó el posible papel que tiene la proteína E2 de VPH16 en la regulación de la expresión de proteínas celulares como TAF1 así como su participación en la modulación de la respuesta a daño, dependiente de la proteína p53; se obtuvieron resultados preliminares que necesitan ser abordados con distintas estrategias experimentales que lleven a dilucidar los mecanismos de regulación que permitan avanzar en la comprensión de la actividad de E2 en la biología de la célula hospedera.

Sería conveniente determinar la funcionalidad del “posible sitio E2 (E2BS)” detectado por análisis *in silico* en el promotor de TAF1, mediante ensayos de gen reportero utilizando esta región promotora, deleciones y mutaciones puntuales del potencial sitio de unión de E2 en ella, y analizar su expresión en condiciones de presencia y ausencia de E2 VPH16. Así mismo, sería conveniente valorar si E2 se une al “sitio E2BS” en el promotor de TAF1 *in vitro* mediante ensayos EMSA, empleando ya sea extractos nucleares de células con expresión de E2 VPH16 o proteína E2 de síntesis *in vitro* purificada o *in vivo* mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChiP).

Por otro lado, para determinar la participación de E2 VPH16 en la modulación de la respuesta a daño al DNA sería conveniente estimar mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChiP) si la unión de p53 a sus promotores blanco se modifica en presencia de E2-VPH16 y en respuesta a daño. Otro aspecto importante sería evaluar los cambios en la expresión de genes tardíos (genes involucrados en apoptosis) a tiempos largos posteriores al tratamiento con doxorubicina (mayor a 8 horas), ya que a tiempos cortos su expresión no se modifica por la presencia de E2 VPH16.

Además, se podría establecer si el incremento observado en la expresión de los genes relacionados con el freno en el ciclo y apoptosis, tiene una consecuencia para la fisiología celular, es decir, si la presencia de E2 acelera la detención de ciclo, aumenta el tiempo de freno o retrasa la salida, en los contextos celulares p53 ^{+/+} y p53 ^{-/-} o favorece la muerte por apoptosis.

12.- BIBLIOGRAFIA.

- [1] INEGI, "DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)", México city, 2018.
- [2] N. Egawa, K. Egawa, H. Griffin, and J. Doorbar, "Human papillomaviruses; Epithelial tropisms, and the development of neoplasia," *Viruses*, vol. 7, no. 7, pp. 3863–3890, 2015.
- [3] S. V. Bava, A. K. T. Thulasidasan, C. N. Sreekanth, and R. J. Anto, "Cervical cancer: A comprehensive approach towards extermination," *Annals of Medicine*, vol. 48, no. 3. Taylor and Francis Ltd, pp. 149–161, 02-Apr-2016.
- [4] C. Chelimo, T. A. Wouldes, L. D. Cameron, and J. M. Elwood, "Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer," *Journal of Infection*, vol. 66, no. 3. pp. 207–217, Mar-2013.
- [5] N. A. Hamid, C. Brown, and K. Gaston, "The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, no. 10, pp. 1700–1717, 2009.
- [6] A. Harari, Z. Chen, R. D. Burk, and P. Health, "HPV Genomics: Past, Present and Future," *Curr Probl Dermatol*, vol. 45, no. 718, pp. 1–18, 2014.
- [7] J. Fang, H. Zhang, and S. Jin, "Epigenetics and cervical cancer: From pathogenesis to therapy," *Tumor Biology*, vol. 35, no. 6. Kluwer Academic Publishers, pp. 5083–5093, 2014.
- [8] M. Muller and C. Demeret, "The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions: A Complex Hijacking of the Cellular Network.," *Open Virol. J.*, vol. 6, pp. 173–189, 2012.
- [9] A. A. McBride, "The Papillomavirus E2 proteins," *Virology*, vol. 445, no. 1, pp. 57–79, 2013.

- [10] L. Vösa, A. Sudakov, M. Remm, M. Ustav, and R. Kurg, "Identification and analysis of papillomavirus E2 protein binding sites in the human genome.," *J. Virol.*, vol. 86, no. 1, pp. 348–57, 2012.
- [11] B. Akgül *et al.*, "The E2 protein of human papillomavirus type 8 increases the expression of matrix metalloproteinase-9 in human keratinocytes and organotypic skin cultures," *Med. Microbiol. Immunol.*, vol. 200, no. 2, pp. 127–135, 2011.
- [12] V. H. Bermúdez-Morales, O. Peralta-Zaragoza, J. M. Alcocer-González, J. Moreno, and V. Madrid-Marina, "IL-10 expression is regulated by HPV E2 protein in cervical cancer cells," *Mol. Med. Rep.*, vol. 4, no. 2, pp. 369–375, 2011.
- [13] S. Mole, S. G. Milligan, and S. V Graham, "Human papillomavirus type 16 E2 protein transcriptionally activates the promoter of a key cellular splicing factor, SF2/ASF.," *J. Virol.*, vol. 83, no. 1, pp. 357–67, 2009.
- [14] D. Lee *et al.*, "Human Papillomavirus E2 Down-regulates the Human Telomerase Reverse Transcriptase Promoter*," 2002.
- [15] M. Oldak, H. Smola, M. Aumailley, F. Rivero, H. Pfister, and S. Smola-hess, "The Human Papillomavirus Type 8 E2 Protein Suppresses α 4-Integrin Expression in Primary Human Keratinocytes," vol. 78, no. 19, pp. 10738–10746, 2004.
- [16] E. Ramírez-Salazar, F. Centeno, K. Nieto, A. Valencia-Hernández, M. Salcedo, and E. Garrido, "HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation.," *Virol. J.*, vol. 8, no. 1, p. 247, 2011.
- [17] E. J. Gauson *et al.*, "Regulation of human genome expression and RNA splicing by human papillomavirus 16 E2 protein," *Virology*, vol. 468–470, pp. 10–18, 2014.
- [18] E. J. Gauson, X. Wang, E. S. Dornan, P. Herzyk, M. Bristol, and I. M.

- Morgan, "Failure to interact with Brd4 alters the ability of HPV16 E2 to regulate host genome expression and cellular movement," *Virus Res.*, vol. 211, pp. 1–8, 2016.
- [19] C. Demeret, A. Garcia-Carranca, and F. Thierry, "Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein," *Oncogene*, vol. 22, no. 2, pp. 168–175, 2003.
- [20] J. E. Burns, H. F. Walker, C. Schmitz, and N. J. Maitland, "Phenotypic effects of HPV-16 E2 protein expression in human keratinocytes," *Virology*, vol. 401, pp. 314–321, 2010.
- [21] F. Centeno, E. Ramírez-Salazar, E. García-Villa, P. Gariglio, and E. Garrido, "TAF1 interacts with and modulates human papillomavirus 16 E2-dependent transcriptional regulation," *Intervirology*, vol. 51, no. 2, pp. 137–143, 2008.
- [22] B. L. Allen and D. J. Taatjes, "The Mediator complex: a central integrator of transcription," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 16, no. 3, pp. 155–166, 2015.
- [23] R. Donczew and S. Hahn, "Mechanistic Differences in Transcription Initiation at TATA-Less and TATA-Containing Promoters," 2017.
- [24] D. a Wassarman and F. Sauer, "TAF II 250 : a transcription toolbox Interaction partners," *J. Cell Sci.*, vol. 1, no. 114, pp. 2895–2920, 2001.
- [25] S. Bhattacharya *et al.*, "Structural and functional insight into TAF1-TAF7, a subcomplex of transcription factor II D," *PNAS*, vol. 111, 2014.
- [26] R. J. Katzenberger, M. S. Marengo, and D. A. Wassarman, "ATR Pathways Signal Alternative Splicing of Drosophila TAF1 Pre-mRNA in Response to DNA Damage Downloaded from," *Mol. Cell Biol.*, vol. 26, no. 24, pp. 9256–9267, 2006.
- [27] C. Cai, X. Xie, J. Zhou, X. Fang, F. Wang, and M. Wang, "Identification

- of TAF1, SAT1, and ARHGEF9 as DNA methylation biomarkers for hepatocellular carcinoma,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 235, no. 1, pp. 611–618, 2020.
- [28] T. O’Brien and R. Tjian, “Different functional domains of TAFII250 modulate expression of distinct subsets of mammalian genes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 6, pp. 2456–2461, 2000.
- [29] Y. M. and K. Y. J Kimura, Su Tien Nguyen, Hanshao Liu, Naoe Taira, “A functional genome-wide RNAi screen identifies TAF1 as a regulator for apoptosis in response to genotoxic stress,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. 16, pp. 5250–5259, 2008.
- [30] J. J. Rushton, R. A. Steinman, and P. D. Robbins, “Differential regulation of transcription of p21 and cyclin D1 conferred by TAF(II)250.,” *Cell Growth Differ.*, vol. 8, no. 10, pp. 1099–104, 1997.
- [31] Y. Xu *et al.*, “TAF1 plays a critical role in AML1-ETO driven leukemogenesis,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–15, 2019.
- [32] M. Malumbres, “Cyclin-dependent kinases,” 2014.
- [33] C. Davy and J. Doorbar, “G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses,” *Virology*, vol. 368, no. 2, pp. 219–226, 2007.
- [34] S. R. Emmett, B. Dove, L. Mahoney, T. Wurm, and J. a Hiscox, “The cell cycle and virus infection.,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 296, pp. 197–218, 2005.
- [35] J. T. Zilfou and S. W. Lowe, “Tumor suppressive functions of p53.,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 1, no. 5, pp. 1–13, 2009.
- [36] A. C. Joerger and A. R. Fersht, “The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 85, no. 1, pp. 375–404, 2016.
- [37] Y. Wu *et al.*, “Article Phosphorylation of p53 by TAF1 Inactivates p53-

Dependent Transcription in the DNA Damage Response,” 2014.

- [38] H. H. Li, A. G. Li, H. M. Sheppard, and X. Liu, “Phosphorylation on Thr-55 by TAF1 mediates degradation of p53: A role for TAF1 in cell G1 progression,” *Mol. Cell*, vol. 13, no. 6, pp. 867–878, 2004.
- [39] A. Hafner, M. L. Bulyk, A. Jambhekar, and G. Lahav, “The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 20, no. 4, pp. 199–210, 2019.
- [40] R. Aloni-Grinstein, M. Charni-Natan, H. Solomon, and V. Rotter, “p53 and the viral connection: Back into the future,” *Cancers (Basel)*, vol. 10, no. 6, pp. 1–11, 2018.
- [41] V. Domínguez-Catzín, A.-M. Reveles-Espinoza, J. Sánchez-Ramos, R. Cruz-Cadena, D. Lemus-Hernández, and E. Garrido, “HPV16-E2 protein modifies self-renewal and differentiation rate in progenitor cells of human immortalized keratinocytes,” *Virology*, vol. 14, no. 1, 2017.
- [42] E. Cifuentes, R. Croxen, M. Menon, E. R. Barrack, and G. P. V. Reddy, “Synchronized prostate cancer cells for studying androgen regulated events in cell cycle progression from G1 into S phase,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 195, no. 3, pp. 337–345, 2003.
- [43] T. Sakuma, M. A. Barry, and Y. Ikeda, “Lentiviral vectors: basic to translational,” *Biochem. J.*, vol. 443, no. 3, pp. 603–618, 2012.
- [44] F. Yang, S. S. Teves, C. J. Kemp, and S. Henikoff, “Biochimica et Biophysica Acta Doxorubicin , DNA torsion , and chromatin dynamics,” *BBA - Rev. Cancer*, vol. 1845, no. 1, pp. 84–89, 2014.
- [45] S.-Y. Hyun and Y.-J. Jang, “p53 activates G 1 checkpoint following DNA damage by doxorubicin during transient mitotic arrest,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 7, 2014.
- [46] S. M. Lauberth *et al.*, “H3K4me3 Interactions with TAF3 Regulate Preinitiation Complex Assembly and Selective Gene Activation,” *Cell*,

vol. 152, pp. 1021–1036, 2013.

- [47] G. S. Winkler, “The mammalian anti-proliferative BTG/Tob protein family,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 222, no. 1, pp. 66–72, 2010.
- [48] A. L. Gartel and S. K. Radhakrishnan, “Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences,” *Cancer Res.*, vol. 65, no. 10, pp. 3980–3985, 2005.
- [49] I. K. Lim, “TIS21/BTG2/PC3 as a link between ageing and cancer: Cell cycle regulator and endogenous cell death molecule,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 132, no. 7, pp. 417–426, 2006.
- [50] S. R. Albright and R. Tjian, “TAFs revisited: More data reveal new twists and confirm old ideas,” *Gene*, vol. 242, no. 1–2, pp. 1–13, 2000.
- [51] S. I. Wells, D. a Francis, a Y. Karpova, J. J. Dowhanick, J. D. Benson, and P. M. Howley, “Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21(CIP)-dependent pathways.,” *EMBO J.*, vol. 19, no. 21, pp. 5762–5771, 2000.
- [52] C. Desaintes, C. Demeret, S. Goyat, M. Yaniv, and F. Thierry, “Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis,” *EMBO J.*, vol. 16, no. 3, pp. 504–514, 1997.
- [53] C. Desaintes, S. Goyat, S. Garbay, M. Yaniv, and F. Thierry, “Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells,” *Oncogene*, vol. 18, no. 32, pp. 4538–4545, 1999.
- [54] K. Webster, J. Parish, M. Pandya, P. L. Stern, A. R. Clarke, and K. Gaston, “The Human Papillomavirus (HPV) 16 E2 Protein Induces Apoptosis in the Absence of Other HPV Proteins and via a p53-dependent Pathway*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 1, pp. 87–94, 2000.
- [55] F. Thierry and C. Demeret, “Direct activation of caspase 8 by the proapoptotic E2 protein of HPV18 independent of adaptor proteins,” *Cell Death Differ.*, vol. 15, no. 9, pp. 1356–1363, 2008.

- [56] R. Kurg, K. Sild, A. Ilves, M. Sepp, and M. Ustav, "Association of Bovine Papillomavirus E2 Protein with Nuclear Structures In Vivo," *Society*, vol. 79, no. 16, pp. 10528–10539, 2005.
- [57] C. Johansson, S. V. Graham, E. S. Dornan, and I. M. Morgan, "The human papillomavirus 16 E2 protein is stabilised in S phase," *Virology*, vol. 394, no. 2, pp. 194–199, 2009.
- [58] E. J. Gauson, X. Wang, E. S. Dornan, P. Herzyk, M. Bristol, and I. M. Morgan, "Failure to interact with Brd4 alters the ability of HPV16 E2 to regulate host genome expression and cellular movement," *Virus Res.*, vol. 211, pp. 1–8, 2016.
- [59] V. Domínguez-Catzín, A.-M. Reveles-Espinoza, J. Sánchez-Ramos, R. Cruz-Cadena, D. Lemus-Hernández, and E. Garrido, "HPV16-E2 protein modifies self-renewal and differentiation rate in progenitor cells of human immortalized keratinocytes," *Viol. J.*, vol. 14, no. 65, pp. 1–13, 2017.
- [60] J. You, J. L. Croyle, A. Nishimura, K. Ozato, and P. M. Howley, "Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes," *Cell*, vol. 117, no. 3, pp. 349–360, 2004.
- [61] C. T. Fontan *et al.*, "A Critical Role for p53 during the HPV16 Life Cycle," *Microbiol. Spectr.*, vol. 10, no. 3, pp. 1–18, 2022.
- [62] J. Z. and Z. L. HONGBIN WANG, LI WEI, CHANGLI LI, *Oncology reports.*, vol. 33, no. 3. [National Hellenic Research Foundation], 2015.
- [63] V. Reiter *et al.*, "The CDK5 repressor CDK5RAP1 is a methylthiotransferase acting on nuclear and mitochondrial RNA," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 13, pp. 6235–6240, 2012.
- [64] Y. Bin Lim, J. P. Tae, and K. L. In, "B cell translocation gene 2 enhances susceptibility of HeLa cells to doxorubicin-induced oxidative

- damage,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 48, pp. 33110–33118, 2008.
- [65] K. Schlereth *et al.*, “DNA Binding Cooperativity of p53 Modulates the Decision between Cell-Cycle Arrest and Apoptosis,” *Mol. Cell*, vol. 38, pp. 356–368, 2010.
- [66] H. C. Reinhardt, A. S. Aslanian, J. A. Lees, and M. B. Yaffe, “NIH Public Access,” vol. 11, no. 2, pp. 175–189, 2009.
- [67] I. V. Narayanan *et al.*, “Transcriptional and post-transcriptional regulation of the ionizing radiation response by ATM and p53,” *Nat. Publ. Gr.*, no. November 2016, pp. 1–11, 2017.
- [68] S. Ma *et al.*, “Induction of p21 by p65 in p53 null cells treated with Doxorubicin,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1783, no. 5, pp. 935–940, May 2008.
- [69] M. G. Frattini, S. D. Hurst, H. B. Lim, S. Swaminathan, and L. A. Laimins, “Abrogation of a mitotic checkpoint by E2 proteins from oncogenic human papillomaviruses correlates with increased turnover of the p53 tumor suppressor protein,” *EMBO J.*, vol. 16, no. 2, pp. 318–331, 1997.
- [70] Y. He *et al.*, “Influenza A Virus Replication Induces Cell Cycle Arrest in G0/G1 Phase,” *J. Virol.*, vol. 84, no. 24, pp. 12832–12840, 2010.
- [71] B. Song, J. J. Liu, K. C. Yeh, and D. M. Knipe, “Herpes simplex virus infection blocks events in the G1 phase of the cell cycle.,” *Virology*, vol. 267, no. 2, pp. 326–34, 2000.

13.- APENDICE.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados.

Expresión			
Nombre	Secuencia-Fw	Secuencia-Rev	Tm
<i>BTG2</i>	5' TGAGCGAGCAGAGGCTTAAGGT 3'	5' TCCTCGTACAAGACGCAGATGGA 3'	60
<i>MDM2</i>	5' GTCTGTACCTACTGATGGTGTCTGT 3'	5' GTGCACCAACAGACTTTAATAACTTCA 3'	60
<i>P21</i>	5' TGGAGACTCTCAGGGTCGAAAACGGC3'	5' AGGGCTTCCTCTTGGAGAAGATCA 3'	60
<i>p27</i>	5' TAACTCTGAGGACACGCA T 3'	5' TTCTTCTGTTCTGTTGGCTC 3'	60
<i>Cdk5rap1</i>	5' ACAGTCTCTTTGCTCCGGGAAGTT3'	5' TCCTTCAGCCTATGATATGCCCGT 3'	60
<i>PUMA</i>	5' CCCTGCCAGATTTGTGAGACAAGA3'	5' GCAGGAGTCCCATGATGAGATTGT 3'	60
<i>IGFR1</i>	5' AGAAGCCGATGTGTGAGAAGACCA3'	5' TGGCAGCACTCATTGTTCTCGGT 3'	60
<i>DR5</i>	5' CCAAGACCCTTGTGCTCGTTGT 3'	5' AGGTGGACACAATCCCTCTGA 3'	60
<i>FAS</i>	5' CCAAGACCCTTGTGCTCGTTGT3'	5' AGGTGGACACAATCCCTCTGA 3'	60
<i>Apaf1</i>	5' CATCATGGCCCACTCAACAGCAAA 3'	5' GGCGAGCAAGATCTTTATATCCTTCA 3'	60
<i>Sertad1</i>	5' TTTCCAGAGGACAGCCAACAAGC 3'	5' AGTCGACTGCCAGAGGTTCCCTT 3'	60
<i>NOXA</i>	5' GGCTCCAGCAGTTTGGAGACAA 3'	5' GGTTCTGAGCAGAAGAGTTTGA 3'	60
<i>CCNA1</i>	5' AGA CCC AAA GCA CAC TAC AT 3'	5' TCC CTC TCA GAA CAG ACA TAC 3'	60
Chip			
<i>ChIPp27</i>	5' AGA CTC GCC GTG TCA ATC 3'	5' CCG CTC TCC AAA CCT TGC 3'	61
<i>ChIP CCND1</i>	5' ATG GCT TTT GGG CTC TCG C 3'	5' TCG GCT CTC GCT TCT GCT G 3'	61
<i>ChIP CCNA1</i>	5' AAG CGT AGG TGT GTG AGC 3'	5' ACT GTT TCC GTG ACC CGT 3'	61

14.- ANEXO.

The expression of the transcription factor TAF1 is modified by the HPV16 E2 protein

J. SÁNCHEZ-RAMOS¹, G. POZO-MOLINA², E. GARRIDO*

¹Department of Genetics and Molecular Biology, CINVESTAV-IPN, Mexico City, C.P. 07360, Mexico; ²Facultad de Estudios Superiores Iztacala-UNAM, Tlalnepantla, Estado de México, C.P. 54090, Mexico

Received April 18, 2019; revised November 4, 2019; accepted December 9, 2019

Summary.— High-risk human papillomaviruses (e.g., HPV16 and 18) are associated with cervical cancer occurrence and development. The early viral gene E2 encodes a protein involved in several key processes in HPV biology, such as replication, genome segregation, and viral gene transcription. E2's presence also affects the expression of a variety of cellular genes involved in a wide range of biological processes, including cell cycle regulation and apoptosis, which are mediated by E2's interaction with cellular proteins. In this report, a lentiviral system was used to express the HPV16 E2 gene in the HPV-negative C-33A cell line for several weeks. E2 expression was measured by RT-qPCR and its biological activity was evaluated using a reporter gene. In HPV16 E2-positive cells, we observed a statistically significant increase in mRNA and protein levels of TAF1 and p27, a basal transcription factor and one of its target genes, respectively. To our knowledge, this is the first study showing that the viral protein HPV16 E2 upregulates TAF1 expression. This suggests that E2's expression promotes a transcriptionally-favorable cellular environment that allows HPV to successfully complete its replication cycle.

Keywords: HPV16; E2 protein; transcription; TAF1 regulation

High-risk human papillomaviruses (e.g., HPV16 and HPV18) are strongly associated with cervical cancer, anogenital cancer, and a growing number of head and neck tumors (Egawa et al., 2015). The early-expressed gene E2 encodes a protein that performs several relevant functions in the viral replication cycle. E2 initiates HPV's genome replication by recruiting the viral helicase E1 and the cell's replication machinery to the viral replication origin. During mitosis, E2 segregates replicated viral genomes into daughter cells through its interaction with chromatin adaptor proteins, such as bromodomain-containing protein 4 (BRD4). E2 also binds to DNA sequence ACCG4NCGGT (E2-binding site (E2BS)) present in the viral LCR to regulate the expression of the viral

oncogenes E6 and E7 (Demeret et al., 1997). In addition to regulating viral processes, E2 modifies the expression of several cellular genes that are involved in proliferation, differentiation, apoptosis, senescence, and cell motility (Burns et al., 2010; Ramirez-Salazar et al., 2011; Gauson et al., 2014). Although multiple cellular promoters harbor potential E2BS sequences, E2 binding does not always affect the transcriptional activity of these promoters (Vösa et al., 2012). Therefore, E2 uses an indirect mechanism to modify cellular gene expression, which involves its interaction with cellular proteins (Muller and Demeret, 2012; Jang et al., 2015).

The HPV16 E2 protein interacts with a wide spectrum of cellular proteins involved replication, RNA processing, chromatin remodeling, cell cycle control, and apoptosis. From E2's interaction with TATA binding protein (TBP), Homeobox C9 (HOXC9), transducer of ERBB2 (TOB1) (Muller and Demeret, 2012), P53 (Massimi et al., 1999), p300 (Krüppel et al., 2008), BRD4 (Wu et al., 2016), and TATA-box binding protein associated factor 1 (TAF1) (Centeno et

*Corresponding author. E-mail: egarrido@cinvestav.mx; phone: +(52-55)-57473800-5373.

Abbreviations: HPV = human papillomavirus; LCR = long control region; TAF1 = TATA-box binding protein associated factor 1

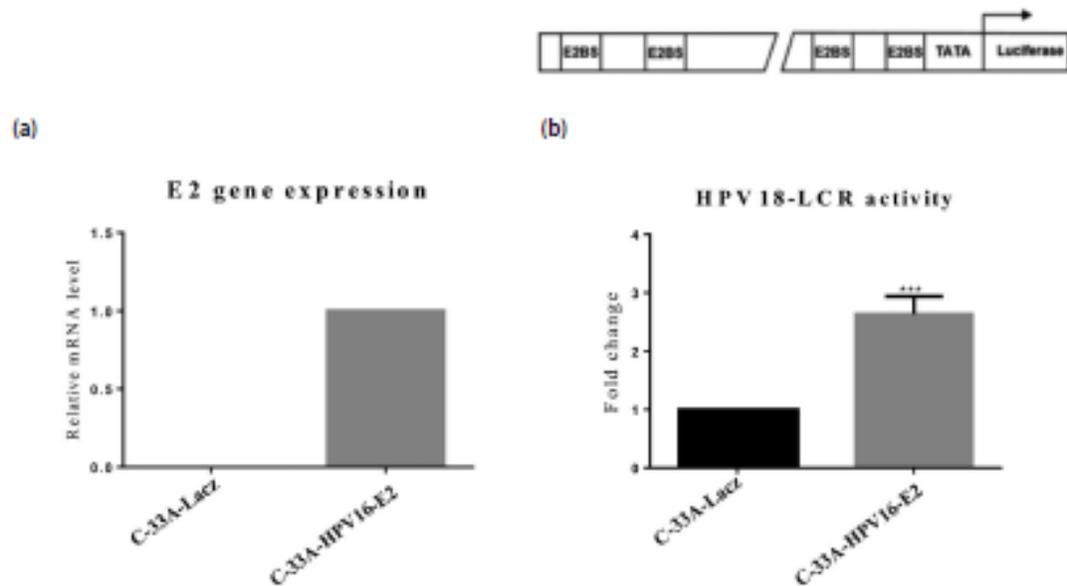


Fig. 1

HPV16 E2 expression and activity

RT-qPCR analysis of HPV16-E2 mRNA levels in C-33A-LacZ and C-33A-HPV16-E2 cells (a). Top: representation of HPV18 LCR cloned into pGL4.10vector showing four E2-binding sites and a TATA box; bottom: pGL4.10-HPV18 LCR transcriptional activity (E2 responsive promoter) in C-33A-LacZ and C-33A-HPV16-E2 cells (b). Data from three independent experiments presented as mean \pm SD (** $p < 0.05$).

et al., 2008), it can be deduced that E2 also has a significant participation in transcriptional regulation.

In a previous report, we demonstrated that E2 has a direct protein-protein interaction with TAF1, and this interaction is crucial for the transcriptional regulation of the viral early gene promoter (Centeno et al., 2008), pointing out the importance of TAF1 in transcription of HPV genes. In the present work, we evaluated whether the HPV16 E2 protein affects TAF1 expression and its activity as a transcriptional regulator.

Using a previously reported lentiviral system (Dominguez-Catrin et al., 2017), C-33A cells were infected with Lenti-HPV16-E2 or Lenti-LacZ for 24 h to allow virus adsorption. The viruses were then removed and puromycin selection (0.45 μ g/ml) was applied 48 h post infection to obtain C-33A cells that constitutively express HPV16-E2 (C-33A-HPV16-E2 cells) or control C-33A cells that express LacZ (C-33A-LacZ). To prevent loss of the lentiviral vector, cells were permanently maintained in the presence of puromycin. To determine transduction and transgene expression in cells, total RNA was extracted using TRIzolTM reagent method and treated with RQ1 DNase (Promega, USA) for 2 h at 37 °C. Two μ g of total RNA were transcribed into cDNA using the enzyme M-MLV RT at 42 °C and Oligo-dT15 (Promega, USA). Then, the relative expression of the

E2 mRNA was determined by RT-qPCR using a specific pair of primers (Fw: 5' ATTCCGAATTCATGGAGACTCT 3', Rev: 5' TTCGGGATCCTCATATAGACAT 3') that generate a 250 bp amplicon of the HPV16 E2 gene. Untranscribed RNA was used as a no template control (NTC). To assess the biological activity of E2 protein, we cloned the HPV18 LCR (6929nt-88nt from the viral genome) into the 5'-Kpn I/Xho I-3' sites of the pGL4.10-basic* vector (Promega, USA) that encodes the luciferase reporter gene to generate the pGL4.10-LCR18 construct. The HPV18 LCR promoter harbors four E2-BSs. Both cell lines, C-33A-HPV16-E2 and C-33A-LacZ, were transfected with 2 μ g the pGL4.10-LCR18 vector using Lipofectamine[®] 2000 reagent, following the manufacturer's instructions. Luciferase activity was evaluated using the Luciferase assay system (Promega, USA).

The relative levels of TAF1 and p27 mRNA were evaluated after reverse transcription by RT-qPCR with specific primers for TAF1 (Fw: 5' ACAACATCGGGAAGAGATGC 3', Rv: 5' CAGGACGCTCCTTCATTTTC 3'), p27 (Fw: 5' TAACTCT GAGGACACGCAT 3', Rv: 5' TTCTTCTGTTCTGTTGGCTC 3'), and β -actin as a housekeeping endogenous control (Fw: 5' GCGGGAAATCGTGCCTGACATT 3', Rev: 5' GATGGAGTT GAAGGTAGTTTCGTG 3'). As NTC we used untranscribed RNA. The relative expression of these genes was calculated based on $\Delta\Delta$ Ct values. The protein level was evalu-

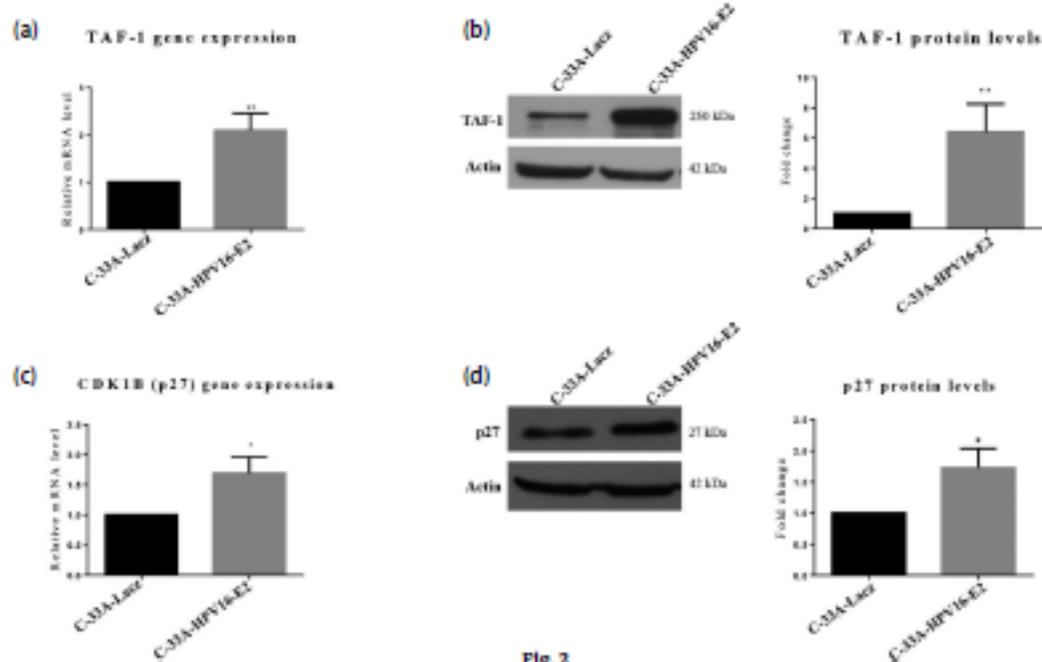


Fig. 2

An increase in TAF1 levels modifies p27 expression levels in C-33A-HPV16-E2 cells

RT-qPCR analysis of TAF1 mRNA levels in C-33A-LacZ and C-33A-HPV16-E2 cells (a). Representative western blot image (left) and densitometric analysis of the TAF1 protein (right) in C-33A-LacZ and C-33A-HPV16-E2 cells (b). RT-qPCR analysis of p27 mRNA levels in C-33A-LacZ and C-33A-HPV16-E2 cells (c). Representative western blot image (left) and densitometric analysis of the p27 protein (right) in C-33A-LacZ and C-33A-HPV16-E2 cells (d). Data from three independent experiments presented as mean \pm SD (** $p < 0.05$).

ated by western blot analysis. Briefly, cells were lysed in RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with protease inhibitors (Complete *lx*, Roche Diagnostic, Switzerland). Equal amounts of total proteins (30 μ g) from the different samples were separated on a denaturing polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and blocked with 5% non-fat milk in PBS. Membranes were incubated with anti-TAF1 (1:500) or anti-p27 (1:250) monoclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, USA), followed by horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (Jackson, ImmunoResearch Laboratories, USA). Proteins were observed using SuperSignal™ Western Pico chemiluminescent substrate (Thermo Scientific, USA). The membranes were stripped and re-blotted with anti-actin antibodies (1:100,000) (Sigma, USA). The quantification of the digital images of three independent experiments was performed using ImageJ software. The statistical significance of the difference between intergroup comparisons was obtained using Student's *t*-test. Data were expressed as mean \pm SD and were representative of at least three independent experiments. Statistical significance was defined as a *p* value < 0.05 .

Figure 1a shows the RNA expression of the HPV16 E2 gene in the transduced cells (C-33A-HPV16-E2 cells). The survival of these cells for several passages indicates that HPV16 E2 is expressed at low levels because it has been reported that high levels of HPV16 E2 induce apoptosis (Demeret et al., 2003). The luciferase activity in C-33A-HPV16-E2 cells transiently transfected with the pGL4.10-LCR18 vector demonstrates that E2 binds HPV18-LCR to promote transcription of the luciferase gene (Fig. 1b). This confirms that our cell-based system is an appropriate model for studying E2's transcriptional activity in the absence of other HPV proteins. In a previous study, we used a recombinant adenoviral system that permitted HPV16 E2 expression in C-33A cells for a short period of time to demonstrate that E2 modifies the mRNA levels of multiple cellular genes, including several TAF1 regulated genes (Ramírez-Salazar et al., 2011).

TAF1 is essential for the assembly of TBP with the rest of the TAFs to create the TFIID complex. TAF1 interacts with transcriptional activators to recruit this complex to particular promoters, thus allowing its transcription (Wassarman and Sauer, 2001). Our results indicate that the constant expression of the viral protein increases TAF1 mRNA levels (Fig. 2a). Increase in TAF1 mRNA levels could

be caused by E2-mediated transcriptional activation of TAF1's promoter. E2 may bind DNA directly or indirectly via interactions with a particular transcription factor or factors. TAF1 protein levels were considerably higher in cells that expressed E2, reaching more than six times the amount observed in control cells (Fig. 2b). To our knowledge, this is the first report that shows evidence of an increase in TAF1 protein levels induced by the presence of a viral protein. However, determining the precise mechanism by which E2 regulates TAF1 overexpression and its biological consequences requires more experiments. The increased expression of TAF1 could have biological consequences in cellular processes that involve HPV16 E2 and/or TAF1. Additionally, the E2-TAF1 protein interaction we described previously (Centeno et al., 2008) could aid in stabilizing TAF1, which is an important factor of the basal transcriptional machinery, and differentially directs its binding to particular gene promoters.

In the cell, TAF1 controls the expression of a high number of genes, including some associated with apoptosis and cell cycle regulation (Kimura et al. 2008). The CDKN1B (p27) gene is implicated in both processes (Abbastabar et al., 2018) and is a well-known TAF1 target gene. Using RT-qPCR, we analyzed p27 mRNA levels in C-33A-HPV16-E2 cells, which were about two times higher than in control cells (Fig. 2c). A similar behavior was observed at the protein level, i.e., we detected twice higher amounts of p27 in E2-expressing cells than in control cells (Fig. 2d). These results agree with those reported by Kimura et al., 2008, who demonstrated that TAF1 regulates apoptosis by controlling p27 expression. Our study also suggests that when HPV16 E2 increases TAF1 protein levels, it may modify the expression of other TAF1 target genes.

Increased levels of TAF1 protein in HPV-infected cells might benefit the virus' replication cycle in two points: first, the HPV16 E2-TAF1 interaction impedes E2 from repressing the viral p97 promoter to allow early viral gene expression (Centeno et al., 2008); and second, downstream TAF1-regulated genes could help generate a cellular environment that is favorable for several stages of HPV's replication cycle (Kim et al., 2005).

E2 expression promotes differentiation, which is required for late gene expression and viral maturation. Increased TAF1 levels, and possibly, its interaction with HPV16 E2, could participate in the regulation of many genes involved in differentiation that E2 affects, such as involucrin, flaggrin, CK1, and CK10 (Burns et al., 2010). The transcriptional promoters of some of these genes harbor a TATA box and/or an *Inr* sequence, which could be regulated by TAF1.

In this work, we demonstrated that increased TAF1 levels in C-33A-HPV16-E2 cells correlates with an increase in p27 mRNA levels, suggesting that at least a portion of

TAF1 is transcriptionally active to regulate some of its target genes. Preliminary results in our research group indicate that TAF1 binding to the *Inr* sequence in p27's promoter region of p27 is not increased in HPV16 E2-expressing cells, suggesting the existence of alternative transcription start sites in the p27 gene that involve TAF1. TAF1's role in regulating apoptosis was demonstrated using RNA interference to downregulate TAF1, in turn, p27's expression was also decreased and cells became resistant to oxidative stress-induced apoptosis (Kimura et al., 2008). Additionally, p27 downregulates the kinase activity of the cyclin E/cdk2 complex to avoid the G1-S transition in the cell cycle. Because both apoptosis and cell proliferation must be finely controlled by key regulators in response to particular stimuli, the role of TAF1 and p27 in these processes in cells expressing HPV16 E2 should be evaluated in the future.

The results in this work suggest that increasing TAF1 levels might generate a positive feedback system with E2. Initially, E2 upregulates TAF1 expression, and a portion of it interacts with E2 to regulate the viral early gene promoter and particular cellular genes. Subsequently, another portion of TAF1 that is E2-free can regulate a different group of cellular genes.

Acknowledgments. This work was supported by CONACyT (grant No. 256514). SRJ was supported by CONACyT (scholarship No. 228869). We gratefully acknowledge Pedro Chavez-Olmos for his technical assistance. The authors also acknowledge Dr. Guillermo Rivera and Dr. Christian Cuevas for the critical revision and edition process of the manuscript.

References

- Abbastabar M, Kheyrollah M, Azizian K, Bagherlou N, Tehrani SS, Maniati M, Karimian A (2018): Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA Repair (Amst.)* 69, 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.07.008>
- Burns JE, Walker HF, Schmitz C, Maitland NJ (2010): Phenotypic effects of HPV-16 E2 protein expression in human keratinocytes. *Virology* 401, 314-321. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.03.002>
- Centeno F, Ramirez-Salazar E, Garcia-Villa E, Gariglio P, Garrido E (2008): TAF1 interacts with and modulates human papillomavirus 16 E2-dependent transcriptional regulation. *Intervirology* 51, 137-143. <https://doi.org/10.1159/00014706>
- Demeret C, Desaintes C, Yaniv M, Thierry F (1997): Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J. Virol.* 71, 9343-9349. <https://doi.org/10.1128/JVI71.12.9343-9349.1997>

- Demeret C, Garcia-Carranca A, Thierry F (2003): Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein. *Oncogene* 22, 168-175. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206108>
- Domínguez-Catán V, Reveles-Espinoza A-M, Sánchez-Ramos J, Cruz-Cadena R, Lemas-Hernández D, Garrido E (2017): HPV16-E2 protein modifies self-renewal and differentiation rate in progenitor cells of human immortalized keratinocytes. *Virol. J.* 14, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0735-2>
- Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J (2015): Human papillomaviruses; Epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses* 7, 3863-3890. <https://doi.org/10.3390/v7072802>
- Gauson EJ, Windle B, Donaldson MM, Caffarel MM, Dornan ES, Coleman N, Herzyk P, Henderson SC, Wang X, Morgan IM (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>
- Jang MK, Anderson DE, van Doorslaer K, McBride AA (2015): A proteomic approach to discover and compare interacting partners of papillomavirus E2 proteins from diverse phylogenetic groups. *Proteomics* 15, 2038-2050. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400613>
- Kim TH, Barrera LO, Zheng M, Qu C, Singer MA, Richmond TA, Wu Y, Green RD, Ren B (2005): A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436, 876-880. <https://doi.org/10.1038/nature03877>
- Kimura J, Nguyen ST, Liu H, Taira N, Miki Y, Yoshida K (2008): A functional genome-wide RNAi screen identifies TAF1 as a regulator for apoptosis in response to genotoxic stress. *Nucleic Acids Res.* 36, 5250-5259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn506>
- Krüppel U, Müller-Schiffmann A, Baldus SE, Smola-Hess S, Steger G (2008): E2 and the co-activator p300 can cooperate in activation of the human papillomavirus type 16 early promoter. *Virology* 377, 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.04.006>
- Massimi P, Pim D, Bertoli C, Ronique Bouvard V, Banks L (1999): Interaction between the HPV-16 E2 transcriptional activator and p53. *Oncogene* 18, 7748-7754. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203208>
- Muller M, Demeret C (2012): The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions: A Complex Hijacking of the Cellular Network. *Open Virol. J.* 6, 173-189. <https://doi.org/10.2174/1874357901206010173>
- 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. *Virol. J.* 8, 1-10. <https://doi.org/10.1186/1743-622X-8-247>
- Vösa L, Sudakov A, Remm M, Ustav M, Kurg R (2012): Identification and analysis of papillomavirus E2 protein binding sites in the human genome. *J. Virol.* 86, 348-357. <https://doi.org/10.1128/JVI.05606-11>
- Wassarman DA, Sauer F (2001): TAF II 250: a transcription toolbox Interaction partners. *J. Cell Sci.* 1, 2895-2920.
- Wu SY, Nin DS, Lee AY, Simanski S, Kodadek T, Chiang CM (2016): BRD4 Phosphorylation Regulates HPV E2-Mediated Viral Transcription, Origin Replication, and Cellular MMP-9 Expression. *Cell Rep.* 16, 1733-1748. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.001>