



**BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS**

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE
LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR P1
DEL GEN *ST6GAL 1* POR LA
ONCOPROTEÍNA E6 DEL VIRUS
DEL PAPILOMA HUMANO**

TESIS

PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA:

Q.F.B. ROSALÍA MÉNDEZ FLORES

ASESORES DE TESIS:

D.C. VERÓNICA VALLEJO RUÍZ

D. C. ALBERTO RAMÍREZ MATA

CIBIOR-IMSS

CICM

Puebla, Pue., Noviembre 2019



BUAP

Puebla, Pue. a 12 de noviembre 2019.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Rosalía Méndez Flores**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Estudio de la regulación de la actividad del promotor P1 del gen ST6GAL1 por la oncoproteína E6 del Virus del Papiloma Humano”


A nuestro juicio, la alumna **Rosalía Méndez Flores** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.


Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. Rosa del Carmen Rocha García


D.C. Laura Patricia Martínez Morales


D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona


D.C. Lorena Milflores Flores

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A CONACyT por el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

Al Centro de Investigación Biomédica de Oriente donde fue realizado el trabajo experimental y al Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa IV. Investigación y Posgrado. Apoyar a los programas de posgrado para lograr su incorporación al Padrón Nacional de Calidad. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2017-2021.

A la D.C. Verónica Vallejo Ruíz, quien me abrió las puertas de su laboratorio y me dio la oportunidad de trabajar con ella, me brindó su apoyo, me compartió su conocimiento, sus consejos, los buenos momentos y, sobre todo, su infinita paciencia ¡Muchas gracias!

Al D.C. Alberto Ramírez Mata por las asesorías, revisiones y disponibilidad para resolver mis dudas para la correcta realización de este trabajo.

A la D.C. Paty Martínez, D.C. Rosy Rocha, D.C. Lorena Milflores y D.C. Sandra Reyes quienes enriquecieron este trabajo con sus críticas y sugerencias.

A mis compañeros de maestría gracias por su ayuda y trabajo en equipo.

A mis compañeros de laboratorio de Biología Molecular quienes me brindaron su apoyo desde el primer momento, me aportaron su conocimiento, me dieron consejos y ayuda, me han ofrecido su valiosa amistad y sobre todo, hicieron el camino y las vueltas a casa más divertidas: Gracias a Lili, Ileana, Q. Tony, Ricardo, Erick, Jesús y Angie.

“No olvides lo aprendido, no dejes de comprender. Rodéate de buenos y tú lo parecerás, rodéate de sabios y algo en ti se quedará”.

J.M.H.Gil

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres Rosy y Martín, porque con sus enseñanzas, ejemplos, valores, apoyo y amor soy lo que soy y todo lo que he logrado, porque todos los desvelos, preocupaciones y cansancio ¡han rendido frutos! ¡Gracias por todo!

A mi abuela Florinita, quien siempre me acompaña, me apoya y nunca me ha dejado sola, gracias por desvelarte conmigo, tú tejiendo y yo escribiendo.

A mi hermano Eduardo “Chepe” porque siempre (muy a su manera) está ahí apoyándome y aconsejándome. Es el mejor hermano del mundo.

A mis amigos: Yesenia, Edreí, Chucho, David y Gerardo quienes me han brindado el mejor regalo de todos, que es su valiosa amistad, sus consejos y los mejores momentos, pero, sobre todo, me alientan a salir adelante.

Al D.C. Raúl Ávila Sosa, profesor y amigo, que siempre me ofreció su ayuda incondicional.

A Julio César, por ser mi compañero de aventuras. Agradezco a la vida (¿y al destino?) que te haya puesto en mi camino. Gracias por apoyarme y alentarme a perseguir mis metas y no dejarme caer, gracias por todo tu amor y sobre todo, comprensión “*Amb tu més de mil vegades*”

A mi abuelo Ray, que ya no estás, pero sé que estarías orgulloso de mí.

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| ABREVIATURAS | III |
| ÍNDICE DE FIGURAS | IV |
| ÍNDICE DE TABLAS | VI |
| RESUMEN | |
| CAPÍTULO I | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. Cáncer cervicouterino | 1 |
| 1.1 Factores de riesgo | 2 |
| 2. Virus del Papiloma Humano (VPH) | 2 |
| 2.1 Generalidades | 2 |
| 2.2 Clasificación según su potencial oncogénico. | 3 |
| 2.3 Genoma viral | 3 |
| 2.4 Ciclo viral | 5 |
| 3. Oncoproteína E6 | 8 |
| 3.1 Estructura | 8 |
| 3.2 Mecanismos de acción de E6 | 11 |
| 4. Glicosilación | 14 |
| 4.1 Tipos de glicanos | 15 |
| 4.2 Glicosidasas | 15 |
| 4.3 Glicosiltransferasas | 15 |
| 4.4 Sialiltransferasas | 17 |
| 5. Cáncer cervicouterino y sialilación | 20 |
| 6. Gen <i>ST6GAL1</i> | 21 |
| 6.1 Promotor P1 de <i>ST6GAL1</i> | 22 |
| ANTECEDENTES | 25 |
| JUSTIFICACIÓN | 27 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 28 |
| HIPÓTESIS | 29 |
| OBJETIVO GENERAL | 30 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 30 |
| CAPITULO II | 31 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 31 |
| CAPITULO III | 38 |

| | |
|-------------------------|----|
| RESULTADOS | 38 |
| CAPITULO IV | 50 |
| DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 50 |
| CAPITULO V | 56 |
| CONCLUSIONES | 56 |
| CAPÍTULO VI | 57 |
| PERSPECTIVAS | 57 |
| BIBLIOGRAFÍA | 58 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| CaCu | Cáncer cervicouterino |
| CO₂ | Dióxido de carbono |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DNMT | ADN metiltransferasa |
| EDTA | Ácido etilendiamino tetraacético |
| EGFR | Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico |
| E6AP | Proteína asociada a E6 |
| Gal | Galactosa |
| GalNac | N-acetilgalactosamina |
| GlcNac | N-acetilglucosamina |
| GTs | Glicosiltransferasas |
| HaCaT | Línea celular de queratinocitos inmortalizados |
| HLH | Dominio Hélice – vuelta - Hélice |
| hTERT | Telomerasa transcriptasa inversa humana |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| IDH | Índice de Desarrollo Humano |
| IRF3 | Interferón antiviral 3 |
| IUBMB | International Union of Biochemistry and Molecular Biology |
| LCR | Región Larga de Control |
| LIEBG | Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado |
| LIEAG | Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado |
| mL | Mililitro |
| NLS | Señal de localización nuclear |
| µl | Microlitro |
| PBD | Dominio de unión a PDZ |
| Pb | Pares de bases |
| PBS | Buffer salino de fosfatos |
| PDZ | Motivo PDS95 / DIg / ZO |
| pRb | Proteína del Retinoblastoma |
| Rpm | Revoluciones por minuto |
| STs | Sialiltransferasas |
| VEGF | Factor de crecimiento vascular endotelial |
| VIH | Virus de Inmunodeficiencia Humana |
| VPH | Virus de Papiloma Humano |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización del genoma de Virus del Papiloma Humano.

Figura 2. Ciclo de infección del virus del Papiloma Humano.

Figura 3. Esquema general de la estructura de la proteína E6 de alto riesgo.

Figura 4. Representación de la estructura de dominios de dedos de zinc de E6.

Figura 5. Mapa genómico del gen *ST6GAL1* e isoformas del ARNm.

Figura 6. Promotor P1 de gen *ST6GAL1*.

Figura 7. Mapa del vector pGL4.12 (*luc2CP*).

Figura 8. Construcción de pGL4-1137P1.

Figura 9. Construcción pGL4-123P1.

Figura 10. Representación esquemática de vectores de expresión pcDNA3 y pcDNA-E6.

Figura 11. Actividad de luciferasa de las construcciones pGL4-1137P1 y pGL4-123P1 del gen *ST6GAL1* en la línea celular HaCaT.

Figura 12. Actividad de luciferasa de las construcciones pGL4-1137P1 y pGL4-123P1 del gen *ST6GAL1*, así como sus respectivas mutantes en c-Myc.

Figura 13. Actividad de luciferasa de las construcciones pGL4-1137P1 y pGL4-123P1 en presencia de E6 de VPH 16.

Figura 14. Actividad de luciferasa de las construcciones pGL4-1137P1 Δ c-Myc y pGL4-123P1 Δ c-Myc en presencia y ausencia de E6 VPH 16.

Figura 15. Actividad de luciferasa de la construcción pGL4-1137P1 en presencia de E6 de genotipos de VPH de alto y bajo riesgo.

Figura 16. Actividad de luciferasa de la construcción de pGL4-1137P1 Δ c-Myc en presencia de E6 de genotipos de VPH de alto y bajo riesgo.

Figura 17. Actividad de luciferasa de la construcción de pGL4-123P1 en presencia de diferentes genotipos de VPH de alto y bajo riesgo.

Figura 18. Actividad de luciferasa de la construcción pGL4-123P1 Δ c-Myc en presencia de diferentes genotipos de VPH de alto y bajo riesgo.

Figura 19. Representación esquemática de los sitios de unión a factores de transcripción encontrados en el fragmento 123 pb del promotor P1 del gen *ST6GAL1*.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas de VPH.

Tabla 2. Familias de glicosiltransferasas.

Tabla 3. Familias de sialiltransferasas.

Tabla 4. Clasificación de subfamilias de sialiltransferasas.

Tabla 5. Miembros pertenecientes a la subfamilia de las α 2,6 sialiltransferasas.

Tabla 6. Descripción de los factores de transcripción que pueden unirse a los sitios de unión localizados en el fragmento de 123 pb de promotor P1 del gen *ST6GAL1*.

RESUMEN

Durante la transformación maligna de cérvix existe un aumento en la sialilación. Específicamente en cáncer cervicouterino (CaCu) se ha reportado un aumento en los niveles de ARNm del gen *ST6GAL1*. Este gen presenta tres promotores, uno de ellos, el promotor P1 da origen a la isoforma H, cuyos niveles están aumentados en CaCu. Este promotor presenta sitios de unión a c-Myc por los cuales podría ser regulado. El agente etiológico del CaCu es el Virus de Papiloma Humano (VPH), clasificados en VPHs de alto y bajo riesgo. Su genoma codifica para la proteína oncogénica E6. Se ha reportado que E6 modifica la expresión de genes, este efecto puede ejercerlo a través de su interacción con factores de transcripción como c-myc y varía en función del genotipo viral. En este trabajo, se evaluó el efecto que ejerce la oncoproteína E6 VPH 16 transfectada de manera transitoria y E6 VPH 16, 18, 62 y 84 transfectada de manera estable sobre el promotor P1 completo y un fragmento de 123 pb así como en sus versiones mutadas en un sitio c-myc transfectados de manera transitoria en la línea celular HaCaT. Los resultados obtenidos nos indican que E6 VPH 16 disminuye la actividad del promotor P1 del gen *ST6GAL1* y que los elementos de respuesta a c-myc no están implicados en la regulación de este promotor, sin embargo las oncoproteínas E6 VPH 18 y 62 incrementan la actividad del promotor, lo que sugiere que durante una infección viral con ciertos genotipos de VPH, la proteína E6 podría tener un efecto positivo sobre la expresión del gen *ST6GAL1* y en consecuencia un aumento en la α 2,6 sialilación que se ha reportado para este tipo de cáncer.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer cervicouterino

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido y desordenado de las células que forman los tejidos, las cuales pueden diseminarse y causar la muerte al impedir el funcionamiento normal de los órganos vitales afectados. Las células malignas, en caso del Cáncer Cervicouterino (CaCu), se localizan en el cuello del útero (Organización Panamericana de la Salud, 2016).

Con un número estimado de 570,000 casos y 311,000 muertes en 2018, ocupa el cuarto lugar en incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres a nivel mundial (Bray et al., 2018). Cabe destacar, que en países con medio y bajo índice de desarrollo humano (IDH), el CaCu ocupa el segundo lugar en mortalidad por cáncer a nivel mundial. En México, CaCu ocupa el segundo lugar como causa de muerte por cáncer en la mujer lo que nos indica que es un grave problema de salud pública (IARC Global Cancer Observatory, 2018). La gran cantidad de estudios epidemiológicos, moleculares y experimentales realizados en la búsqueda de asociaciones causales ha demostrado que el Virus del Papiloma Humano (VPH) es el principal agente etiológico del CaCu (Walboomers et al., 1999; zur Hausen, 2009).

El desarrollo del CaCu comienza como una afección precancerosa denominada lesión premaligna en el cérvix que es asintomática. Estas lesiones, pueden regresar espontáneamente o evolucionar hasta transformarse en carcinoma. Dependiendo del espesor del epitelio anormal, las lesiones se denominan de alto (LIEAG) y bajo grado (LIEBG). En México el genotipo 16 del VPH es el de mayor prevalencia en CaCu, lesiones premalignas y cérvix sin lesión; sin embargo, la prevalencia de otros genotipos de VPH varía según dichas condiciones. En cérvix sin lesión los genotipos más prevalentes son: VPH- 62, 51, 84, 18; mientras que en LIEBG son: VPH- 84, 58, 59, 62 y 18, y en LIEAG los genotipos VPH- 31, 18, 70 (Flores-Miramontes et al., 2015). Específicamente en CaCu, los genotipos más prevalentes son VPH- 16 (62.8%), 18 (11.6%), 45 (8.3%), 52, 58 (6.6%), y 39 (5.8%) (Aguilar-Lemarroy et al., 2015).

1.1 Factores de riesgo

El desarrollo del CaCu y de sus lesiones precursoras está asociada a ciertos factores sexuales y reproductivos como tener múltiples parejas sexuales (Liu et al., 2015), inicio de la vida sexual antes de los 18 años, múltiples embarazos y uso de anticonceptivos orales por periodos prolongados (Bosch & de Sanjosé, 2007). También se asocia al tabaquismo como factor de riesgo porque los metabolitos de la nicotina han sido detectados en el moco cervical de las mujeres que fuman (Schiffman et al., 1987; Winkelstein, 1990).

Las coinfecciones del VPH con otros agentes infecciosos de transmisión sexual, como *Chlamydia trachomatis*, o de agentes virales como el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) o virus herpes simple tipo 2 (HSV-2) pueden ejercer un efecto sinérgico que aumente las posibilidades de provocar alteraciones celulares que conduzcan al desarrollo de esta neoplasia (Muñoz et al., 2006; Paba et al., 2008).

2. Virus del Papiloma Humano (VPH)

2.1 Generalidades

Los VPH son virus de ADN sin envoltura con un tropismo para el epitelio escamoso. Cada partícula de virus consta de una cápside icosaédrica de aproximadamente 60 nm de diámetro, que contiene una molécula única de ADN circular de doble cadena (Fields, Knipe & Howley, 2013).

La cápside está organizada en 72 capsómeros y cada uno de estos capsómeros está constituido por dos proteínas estructurales, la proteína mayor L1 (55 kDa) constituyendo el 80% del total de la cápside, y la proteína menor L2 (70 kDa) que constituye el 20% (Howley & Lowy, 2007).

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*. A la fecha, alrededor de 200 genotipos de VPH han sido identificados y se han agrupado en 5 géneros: *alfa*, *beta*, *gamma*, *mu* y *nu* papilomavirus. La clasificación de los VPH se basa en la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto para el gen L1, que codifica a la proteína mayor de la cápside viral. Los tipos de VPH que pertenecen a diferentes géneros tienen menos de 60% de similitud dentro de la parte L1 del genoma. Diferentes especies virales dentro

de un género comparten entre 60 y 70% de similitud. Para que un nuevo tipo de VPH sea reconocido como tal, debe tener menos del 90% de similitud con cualquier otro tipo de VPH (Bernard et al., 2010; de Villiers, Fauquet, Broker, Bernard & zur Hausen, 2004).

2.2 Clasificación según su potencial oncogénico.

Aproximadamente 40 genotipos infectan el epitelio anogenital y han sido agrupados de acuerdo con su asociación con lesiones benignas o con tumores malignos, en virus de bajo y alto riesgo, respectivamente. Dentro de los VPH de alto riesgo se incluyen los tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 73, 82, entre los cuales los tipos 16 y 18 son los de mayor prevalencia en lesiones malignas de cérvix. Por otro lado, los genotipos 6, 11, 32, 40, 42, 43, 54, 61, 62, 70, 72, 74, 81, 83, 84, 86, 87, 91 se consideran de bajo riesgo, ya que generalmente se encuentran asociados a lesiones benignas (Muñoz et al., 2003; Varnai et al., 2007).

A nivel mundial, los tipos más frecuentemente asociados a tumores malignos de cérvix son VPH16, 18 y 45 (IARC, 2012). Sin embargo, algunos tipos virales son encontrados con mayor frecuencia que otros, dependiendo de la región geográfica; por ejemplo, los VPH 31 y 33 son más prevalentes en Europa y Estados Unidos, mientras que los tipos 35 y 45 son más frecuentes en África y los tipos VPH 52 y 58 en Asia (de Sanjose et al., 2010). En población mexicana se ha reportado que los genotipos de VPH 16, 18, 45 fueron los más frecuentemente encontrados en CaCu, seguidos de los genotipos VPH 52, 58 y 39 (Flores-Miramontes et al., 2015).

2.3 Genoma viral

El genoma viral consiste de aproximadamente 8,000 pares de bases (Fields, Knipe & Howley, 2013) y solo una cadena del genoma de ADN de doble cadena se utiliza como plantilla para la transcripción. Esta cadena codificante contiene tres regiones principales denominadas: región larga de control (LCR o región no codificante [NCR]), región temprana o *early* y la región tardía o *late*, las cuales, en todos los virus del papiloma, están separadas por dos sitios de poliadenilación (pA): sitios pA (A_E) tempranos y pA (A_L) tardíos (Figura 1). La región LCR consta de un segmento de

aproximadamente 850 pb (10% del genoma del VPH) que no contiene ningún marco de lectura, pero tiene el origen de la replicación, así como múltiples sitios de unión a factores de transcripción que son importantes en la regulación de la ARN polimerasa II (Bernard, 2002). La región *early* contiene hasta siete ORF que codifican proteínas reguladoras virales no estructurales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) involucradas en la replicación de ADN viral, regulación transcripcional y transformación celular. Por último la región de expresión tardía contiene los genes L1 y L2, que codifican las proteínas de la cápside viral (Tabla 1) (Carreras, Xercavins & Checa, 2007).

| Proteína | Función |
|----------|--|
| E1 | Necesaria para la replicación del DNA viral. Tiene función de helicasa. |
| E2 | Es el mayor regulador transcripcional de los genes virales. Participan en la replicación del DNA viral. Facilita la unión de E1 al origen de replicación. |
| E4 | Se expresa principalmente en la etapa tardía del ciclo viral en queratinocitos diferenciados y facilita la liberación de partículas virales. Se une a los filamentos de queratina, causando cambios en la estructura celular de queratinocitos. |
| E5 | Induce proliferación celular. Inhibe apoptosis. |
| E6 | Induce síntesis de DNA. Causa activación de la telomerasa. Bloquea la diferenciación celular. Interactúa con múltiples proteínas celulares. |
| E7 | Induce proliferación celular. Interactúa con pRB. |
| L1 | Proteína estructural y mayor de la cápside. Interacciona con receptores celulares. |
| L2 | Facilita el ensamblaje de la cápside. |

Tabla 1. Función de las proteínas de VPH. Tomado de Nowińska et al., 2017

La organización del genoma viral se muestra en la Figura 1, tomando como ejemplo el genoma de VPH 16 que ha sido mayormente caracterizado. Este genoma contiene dos promotores principales: el promotor P97 que se encuentra río arriba del ORF de E6 y es responsable de toda la expresión génica temprana (Smotkin & Wettstein, 1986) y el promotor P670 que se encuentra dentro de la región ORF E7 y que es responsable de la expresión tardía (Grassmann et al., 1996) (Figura 1).

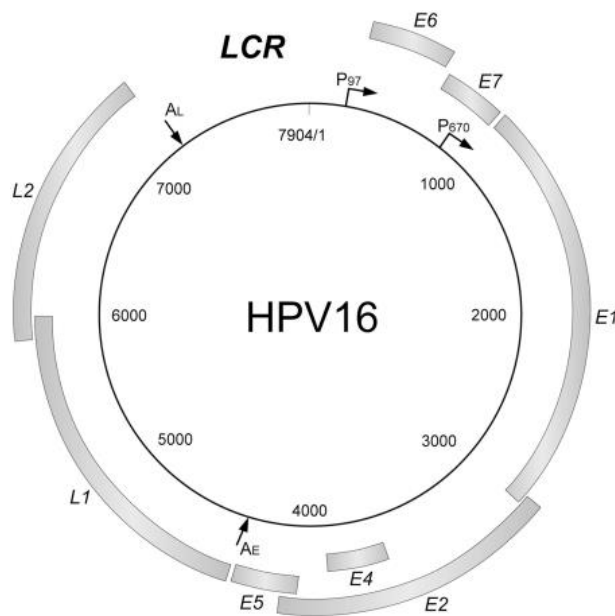


Figura 1. Organización del genoma de VPH. Se muestran las tres regiones que conforman el genoma viral del VPH. Los genes virales se transcriben en una sola dirección (en el sentido de las agujas del reloj). Los principales promotores y señales de poliadenilación están indicados respectivamente (P97, P670, AE, AL). Tomado de Kajitani et al., 2012.

El promotor P97 de VPH 16, es muy potente y está fuertemente regulado por elementos *cis* en sentido ascendente en la LCR. Estos elementos *cis*, que incluyen cuatro sitios de unión E2 (E2-BS) en una secuencia consenso ACC(N₆)GGT (Androphy, Lowy & Schiller, 1987; Sousa, Dostatni & Yaniv, 1990) a los que se unen factores de transcripción celulares y el transactivador/represor viral E2, regulando de manera diferencial la actividad del promotor P97 en función del grado de diferenciación de la célula (Bernard, 2002).

2.4 Ciclo viral

Para la replicación completa del virus (especialmente para la síntesis de proteínas capsulares y de ensamblaje) se requiere un epitelio estratificado maduro (Carreras et al., 2007). Sin embargo, la expresión y la replicación de los genes víricos se desarrollan de una manera estrechamente regulada por la diferenciación de células epiteliales (Zheng & Baker, 2006). Así, el virus puede infectar queratinocitos en las capas basales de un epitelio escamoso estratificado y conforme el epitelio se diferencia los viriones se ensamblan. Particularmente, los papilomavirus se replican exclusivamente en el núcleo de las células (Figura 2).

El ciclo replicativo de los papilomavirus se divide comúnmente en dos etapas, denominadas temprana y tardía. Estas etapas están ligadas al estado de diferenciación de la célula epitelial presente en el tejido. La introducción de los viriones en la célula es iniciada por la interacción de la proteína L1 con heparán-sulfato y sindecano 3 en la superficie celular. Se ha implicado también a la integrina alfa-6 en el ingreso del virus a la célula, cuya interacción induce señales que llevan a inhibir la apoptosis a través de Ras/MAP y PI3K/Akt. La mayoría de los papilomavirus parece entrar a la célula mediante endocitosis dependiente de clatrina. El desnudamiento del virión y la salida del genoma viral ocurren en endosomas (Howley & Lowy, 2007; Conway & Meyers, 2009; Doorbar et al., 2012). El desensamble del virión ocurre a través del rompimiento de los enlaces disulfuro internos de la cápside, debido al ambiente reductor del endosoma, lo que permite el transporte del DNA viral al núcleo de ésta con la participación de L2 (Li et al., 1998).

Una vez dentro del núcleo, el genoma es transcrito a través de una serie de procesos complejos que involucra la presencia de sus promotores, diversos mecanismos de modificación del ARNm como el *splicing* alternativo, así como, una regulación transcripcional específica asociada con el grado de diferenciación celular (Howley & Lowy, 2007).

Las proteínas E1 y E2 se expresan de manera temprana en el ciclo viral, y participan en el control del número de copias del genoma viral episomal (no integrado al genoma celular). Esas proteínas se mantienen entre 20 y 100 copias por célula, y forman un complejo para reclutar la maquinaria para la replicación del genoma. En la capa suprabasal del epitelio cervical la expresión de los genes E1, E2, E5, E6 y E7 contribuye al mantenimiento del genoma viral e induce la proliferación celular, incrementando el número de células infectadas (Conway & Meyers, 2009; Doorbar et al., 2012). El proceso de ciclo viral se esquematiza en la Figura 2.

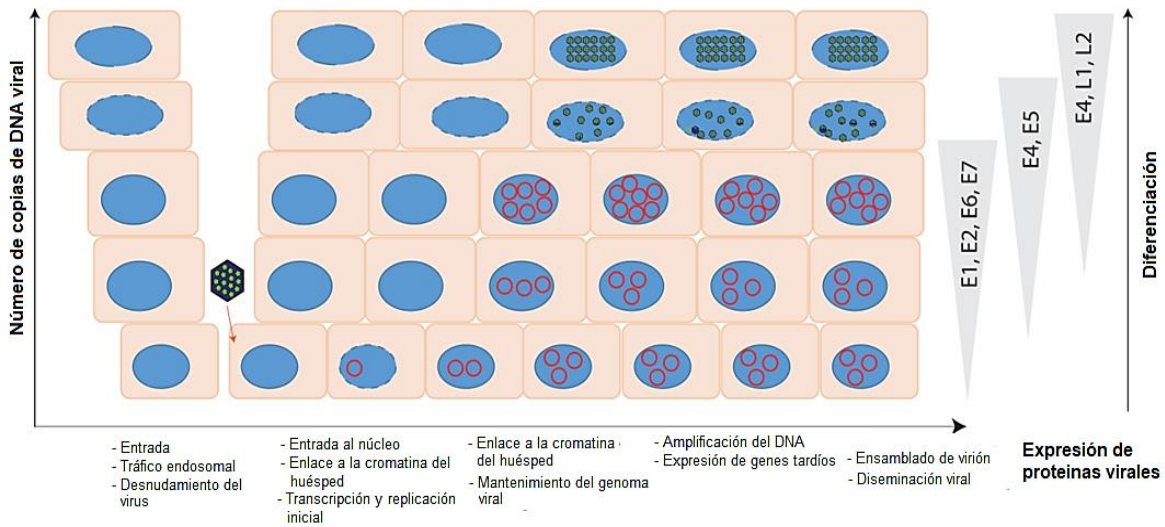


Figura 2. Ciclo de infección del virus del Papiloma Humano. El virus accede a los queratinocitos basales a través de una microabrasión. Después de entrar en la célula, el virus atraviesa el endosoma. La descomposición de la envoltura nuclear durante la mitosis permite que el virus ingrese al núcleo y se observe ADN viral en los cromosomas mitóticos, en complejo con la proteína L2. Después de una breve ráfaga de replicación, el genoma se mantiene en un número de copias bajo en las células en división en los niveles más bajos del epitelio. A medida que los queratinocitos infectados se diferencian, el genoma se amplifica a niveles altos y se expresan los genes tardíos. El genoma viral se ensambla en cápsides en las capas superficiales del epitelio, y los virus se liberan mediante la descamación celular. Los diferentes pasos en el ciclo de vida viral se enumeran debajo del diagrama. Los factores de restricción del huésped pueden interferir en muchas etapas de la infección. Modificado de Porter et al., 2017.

En las zonas donde se encuentran las células con mayor grado de diferenciación se mantiene la expresión de los genes E1, E2, E6 y E7 (Figura 2). Además, se comienza a expresar la proteína E4 que tiene la función de aumentar la replicación del genoma viral, incrementando significativamente el número de copias del genoma. Al mismo tiempo, se activa la transcripción de los genes tardíos L1 y L2, involucrados en el ensamble y en la salida de los nuevos viriones (Fernandes & De Medeiros Fernandes, 2012).

Las funciones tardías de los papilomavirus, tales como la síntesis de las proteínas de la cápside, así como el ensamble de los viriones ocurren exclusivamente en queratinocitos diferenciados. La regulación transcripcional de los genes tardíos es dirigida por un promotor específico (p670) que solo es activo en queratinocitos diferenciados. Poco es lo que se sabe del proceso de ensamble y liberación de las

partículas virales, sin embargo, la encapsidación del genoma es asistida por la proteína L2 y es facilitada por E4. Las partículas virales se han observado en la capa granular del epitelio (una de las capas más externas de la piel), pero no en estratos inferiores. Estos virus no son citolíticos y la liberación de las partículas virales ocurre con la descamación de las células de la última capa del epitelio (Howley & Lowy, 2007; Conway & Meyers, 2009; Doorbar et al., 2012 Fernandes & De Medeiros Fernandes, 2012).

En las células infectadas, el genoma del VPH puede permanecer en el estado episomal. Se estima que la duración de la infección por VPH es de 8 meses, pero esta puede variar, siendo mayor para los tipos oncogénicos, reportándose una duración de 13 meses a 2 años (Giannaki et al., 2013).

La infección por estos virus puede ser persistente y mantenerse en las células basales (Stubenrauch, Zobel & Iftner, 2001). Cuando esto ocurre, el genoma viral puede integrarse al genoma de la célula. El paso de una lesión de alto grado a cáncer invasivo se ha asociado con este proceso. No se han identificado sitios específicos para la integración del genoma viral, sin embargo, se ha detectado que ocurre en sitios de inestabilidad genómica. En las etapas tempranas de la infección la proteína E2 reprime la expresión de los genes E6 y E7, sin embargo cuando el genoma viral se integra al genoma celular, se interrumpe el marco de lectura del gen E2 lo que provoca su represión y pérdida de la síntesis de su proteína, y por tal motivo, la expresión de las proteínas E6 y E7 se incrementa, favoreciéndose los procesos de inmortalización, transformación y desarrollo de cáncer (Wentzensen, Vinokurova & Doeberitz, 2004; Moody & Laimins, 2010).

3. Oncoproteína E6

3.1 Estructura

La oncoproteína E6 (~16 a 18 kDa) es codificada por el gen *E6* (400-500 pb) que se encuentra río abajo de la región LCR del genoma del VPH (Figura 1). Esta proteína consta de 150 aminoácidos y contiene dos dominios de dedos de zinc CX₂C - X₂₉ - CX₂C, que están unidos por una región enlazadora corta de 36 aminoácidos y

flanqueada por regiones amino (N) y carboxilo (C) terminales de longitud variable (Howie, Katzenellenbogen & Galloway, 2009). Adicionalmente, las proteínas E6 de genotipos de alto riesgo poseen en la región C-terminal el motivo de unión a PDZ (PBM), que facilita las interacciones con proteínas que tienen el dominio PDZ (Kiyono et al., 1997). La esquematización de la proteína E6 se muestra en la Figura 3.

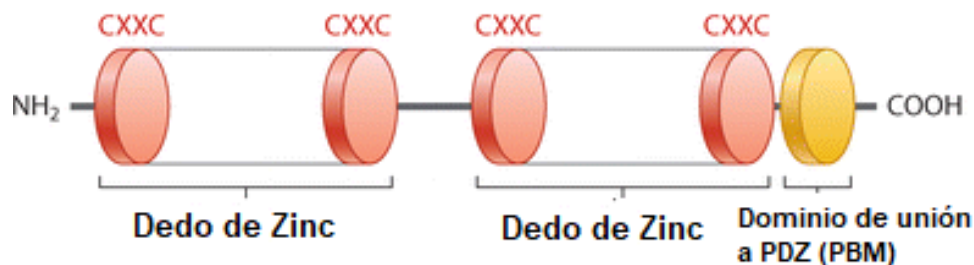


Figura 3. Esquema general de la estructura de la proteína E6 de alto riesgo. En cilindros rojos se muestran los dominios de dedos de zinc, que facilitan la interacción de E6 con proteínas que contengan el motivo LXXLL. Cada dominio está formado por dos submotivos CXXC que se unen a moléculas de zinc. Ambos dominios están separados por la región enlazadora. En la región C-terminal, se encuentra el dominio de unión a PDZ que le permite a E6 interactuar con proteínas que posean el dominio PDZ. Tomado y modificado de Wallace & Galloway, 2015.

3.1.1 Dominios de dedos de zinc

La resolución de la estructura de E6 se ha obtenido mediante resonancia magnética nuclear del dominio dedo de zinc C-terminal, y con ello se ha propuesto un modelo de la proteína completa. Cada dominio consta de tres hojas beta (S1, S2, S3) y dos hélices cortas (H1, H2). Entre H1 y H2 se encuentra un bucle largo (L2) que corresponde al sitio de unión a zinc. También consta de una hélice C-terminal corta (H3), periférica como se muestra en la Figura 4 A.

Los dos dominios de dedos de zinc se enfrentan entre sí simétricamente de forma pseudodimérica mostrado en la Figura 4 B.

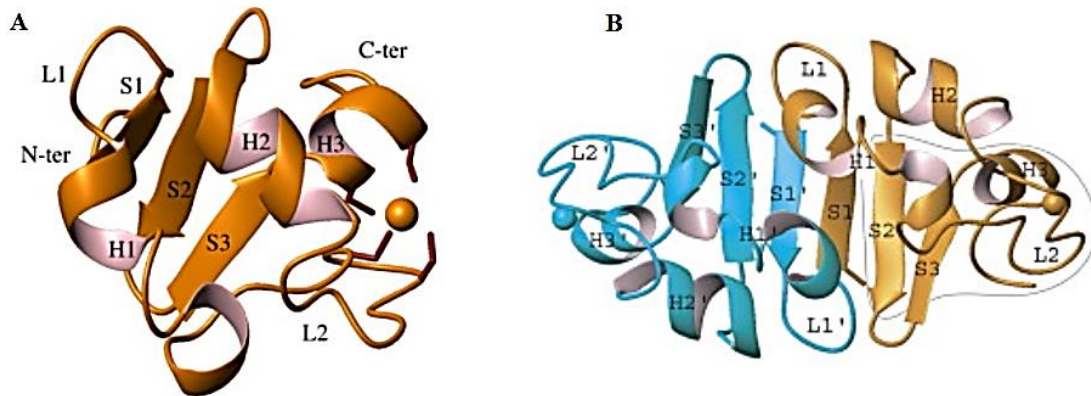


Figura 4. Representación de la estructura de dominios de dedos de zinc de E6. A) Representación de listones de uno de los dominios. B) Propuesta de disposición pseudodimérica de ambos dominios. Tomado de Nominé et al., 2006.

3.1.2 Motivo de unión a PDZ

Una de las diferencias más evidentes entre las oncoproteínas E6 de los tipos de VPH de alto y bajo riesgo es la presencia de un motivo de unión a PDZ (PSD-95 / DLG / ZO-1) de Clase I (PBM) en el extremo C-terminal de E6, que está presente en los genotipos de alto riesgo, pero está ausente o degenerado en los genotipos de bajo riesgo. Este motivo de unión está representado por la secuencia consenso (-X-S/T-X- Φ COOH) donde X es cualquier residuo y Φ es un residuo hidrófobo. A través de este PBM, E6 puede interactuar y posteriormente conducir la degradación de las proteínas que contienen un dominio PDZ, que con frecuencia (pero no siempre) se encuentra en el extremo C de las proteínas (Sonyang et al., 1997).

3.1.3 Bolsillo de unión a motivos LXXLL

Los dominios de dedos de zinc y la región enlazadora forman entre ellos un bolsillo hidrofóbico profundo, que reconoce la secuencia LXXLL conservada. Este bolsillo permite a E6 reclutar una variedad de proteínas celulares del huésped que contengan motivos LXXLL como la proteína asociada a la ubiquitín ligasa E6 (E6AP) (Huibregtse, Scheffner & Howley, 1993), la proteína de adhesión focal paxilina (Pol, Brown & Turner, 1998) o el factor de transcripción regulatorio de interferón antiviral 3 (IRF3) (Ronco, Karpova, Vidal & Howley, 1998)

3.1.4 Señales de localización nuclear

Se han identificado tres secuencias de localización nuclear (NLS1, NLS2 y NLS3), que son ricas en residuos básicos con carga positiva y que permiten que E6 sea traslocada en el núcleo. NLS1 y NLS2 tienen una influencia más fuerte que NLS3 para retener a E6 VPH 16 en el núcleo. Las secuencias aminoacídicas de las NLS se encuentran parcialmente conservada en los genotipos de alto riesgo mientras que en los genotipos de bajo riesgo presentan mayor variación, lo que sugiere una menor actividad en el núcleo celular (Tao, Kruhlak, Xia, Androphy & Zheng, 2003).

3.2 Mecanismos de acción de E6

3.2.1 Interacción proteína-proteína

La oncoproteína E6 no tiene actividad enzimática conocida, sin embargo, es capaz de reconocer e interactuar con proteínas celulares. La interacción más común es la que se lleva a cabo mediante la unión de E6 con el péptido alfa helicoidal LXXLL presente en las proteínas celulares diana, cuya unión se lleva a cabo a través del bolsillo conservado de E6 (Vande Pol & Klingelutz, 2013; Zanier et al., 2013).

3.2.1.1 Unión E6- E6AP-P53

La proteína supresora de tumores p53 regula la expresión de genes implicados en la respuesta al daño al ADN (Kastan et al., 1991). Uno de sus objetivos transcripcionales es el inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (CDK) p21. Cuando existe daño al ADN, p53 induce la transcripción de p21, el cual inhibe a las ciclinas, mediando la detención del ciclo celular (Harper et al., 1995). Una de las acciones principales de las oncoproteínas E6 de AR es promover la degradación de p53. Esta actividad requiere del reclutamiento de la ubiquitín ligasa celular E6AP (Huibregtse *et al.*, 1993). E6 interactúa con el péptido LXXLL de E6AP (Ansari, Brimer & Vande Pol, 2012) y se forma el complejo E6/E6AP/P53 que da como resultado la poliubiquitinación de p53 y su posterior degradación por proteasoma (Martinez-Zapien *et al.*, 2016). Al anular la capacidad de p53 de detener el ciclo celular de las células infectadas, E6 facilita el acceso continuo a la maquinaria replicativa de la célula, asegurando que la proliferación viral continúe sin impedimentos.

Por otro lado, las oncoproteínas E6 de los VPH de bajo riesgo son capaces de unir a p53 pero con menor afinidad y no pueden mediar su degradación, sin embargo, pueden atrapar a p53 en el citoplasma (Pietsch & Murphy, 2008), así como unirse débilmente a E6AP y estimular sus actividades de ubiquitina ligasa (Mesplede et al., 2012).

3.2.1.2 Unión de proteínas con dominio PDZ

Las oncoproteínas E6 de alto riesgo pueden interactuar con proteínas celulares que tengan un dominio PDZ e inducir su degradación mediada por el proteasoma. Las proteínas que contienen PDZ y que son objetivo de E6, regulan múltiples procesos biológicos. Algunas de ellas son Discs Large (DLG1), Scribble y MAGI 1/2/3 que son componentes de la maquinaria de control de polaridad celular (Kiyono et al., 1997; Nakagawa & Huibregtse, 2000; Thomas et al., 2002), MUPP1 que está implicada en la regulación negativa de la proliferación celular (Lee et al., 2000) y la proteína 14-3-3, que funciona como proteína adaptadora e interactúa con diversas proteínas celulares con funciones en el ciclo celular, la apoptosis, el control metabólico, el mantenimiento del citoesqueleto, la transcripción y la supresión tumoral (Dougherty & Morrison, 2004). Por lo tanto, la degradación de estas proteínas PDZ le permiten al virus colonizar y establecerse en el tejido cervical (Van Doorslaer, DeSalle, Einstein & Burk, 2015).

3.2.2 Expresión génica

3.2.2.1 E6 y su acción sobre telomerasa

Se ha demostrado que la oncoproteína E6 de VPH 16 alto riesgo tiene la capacidad de activar a la telomerasa, ribonucleoproteína que sintetiza secuencias repetidas de telómeros, en queratinocitos humanos (Klingelutz, Foster & McDougall, 1996). Posteriormente se demostró que E6 aumenta la transcripción del gen *hTERT*, que codifica para la subunidad catalítica de la telomerasa, y lo hace a través del aumento en la actividad del promotor de dicho gen, específicamente en un fragmento de 295 pb (Veldman, Horikawa, Barrett & Schlegel, 2001). Dentro de este fragmento se encuentran dos secuencias consenso denominadas E-box a las cuales se une el factor de transcripción c-Myc e induce la transactivación del promotor del gen *hTERT* (Wu et

al., 1999). Este factor de transcripción codificado por el gen *c-myc* es un regulador maestro que controla procesos celulares como proliferación y diferenciación, así como regulación del ciclo celular (Sakamuro & Prendergast, 1999). Esta proteína presenta un dominio hélice-vuelta-hélice/cierre de leucina (HLH/LZ) que reconoce las secuencias consenso E-box (Murre, McCaw & Baltimore, 1989).

Por otro lado, el promotor de hTERT contiene sitios de unión para el factor de transcripción Sp1. La mutación de estos sitios reduce parcialmente la inducción de hTERT por parte de E6. Sin embargo, cuando se mutan los sitios de unión a Sp1 y c-Myc, se pierde toda la activación por E6, lo que indica que existe una unión combinada de c-Myc y Sp1, que son responsables de la inducción de hTERT por E6 (Kyo, et al., 2000; Oh, Kyo, & Laimins, 2001).

En 2003, Veldman et al., demostraron que las interacciones c-Myc y E6 dentro de una E-box regulan la expresión del gen *hTERT*, en la que E6 ayuda a potenciar la actividad de Myc. Posteriormente, se demostró que la activación de *hTERT* por E6 también requiere de un complejo E6-E6AP para activar el promotor, y que esta activación depende de los sitios de unión a c-Myc en el promotor (Liu et al., 2005).

Estudios posteriores mostraron que se requiere el dominio de transactivación y el dominio HLH de la proteína c-Myc para la unión de E6 y para la consiguiente transactivación del promotor *hTERT* (Zhang et al., 2017).

Se ha demostrado que las oncoproteínas E6 provenientes de genotipos de VPH de alto riesgo son capaces de activar el promotor de *hTERT*, mientras que los VPH de bajo riesgo no pueden hacerlo (Van Doorslaer & Burk, 2012).

3.2.2.2 E6 y su acción sobre promotores

Además de actuar sobre el promotor de la subunidad catalítica de la telomerasa, se ha demostrado que E6 puede actuar sobre la actividad de otros promotores.

La oncoproteína E6 VPH 16 puede transactivar el promotor de la protimosina α a través de un elemento E-box localizado en el intrón 1 de este promotor. E6 también transactiva

el promotor de *c-MYC*. Protimosina α es regulado por c-Myc, por lo que el mecanismo sugerido para la activación de estos promotores es que E6 primero transactiva el promotor de *c-MYC* y posteriormente, c-Myc activa al promotor de la protimosina α (Kinoshita et al., 1997).

Por otro lado, E6, transactiva el promotor del gen que codifica para la survivina, que pertenece a la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (Ambrosini, Adida & Altieri, 1997). El efecto de E6 sobre el promotor de survivina depende de la degradación de p53, que regula negativamente a survivina, explicando de esta manera, uno de los efectos antiapoptóticos de la oncoproteína E6 (Borbely et al., 2006).

E6 del VPH 16 también ha demostrado transactivar otros promotores, como el del gen *VEGF* (Factor de crecimiento vascular endotelial) a través de sitios de unión a Sp1 (López-Ocejo et al., 2000) o el promotor del gen *c-FOS* a través de elementos de respuesta a cAMP (Morosov, Phelps & Raychaudhuri, 1994).

Por otro lado, se ha demostrado que E6 VPH 16, puede ejercer represión en el promotor de E-cadherina (D'Costa et al., 2012), mientras que E6 VPH 16 y 18 pueden reprimir la expresión de INF- κ a través de mecanismos epigenéticos (Rincón-Orozco et al., 2009).

4. Glicosilación

Durante la carcinogénesis, la célula experimenta cambios que son resultado de la alteración genética. Uno de los cambios que experimenta es la modificación en los patrones de glicosilación. Se ha documentado bien que estos cambios en la superficie celular y en las glicoproteínas secretadas ocurren durante la transformación maligna y la progresión del cáncer, y dentro de las alteraciones en la glicosilación se incluyen la síntesis y expresión incompletas de estructuras de glicánicas truncadas, expresión aumentada de N-glicanos complejos ramificados, expresión *de novo* de glicanos sialilados terminales y fucosilación alterada (Pinho & Reis, 2015).

La glicosilación es el proceso enzimático que produce enlaces glicosídicos de sacáridos a otros sacáridos, lípidos o proteínas (Pinho & Reis, 2015). Es la modificación

co- y postraducciona l más compleja de proteínas y participa en muchos eventos fisiológicos, como la interacción huésped-patógeno, la diferenciación y el tráfico de células, y la señalización intracelular e intercelular (Fuster & Esko, 2005). Las estructuras glicánicas son resultado de la acción altamente coordinada de los transportadores de nucleótidos, las glicosiltransferasas y las glicosidasas en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Peixoto et al., 2019).

4.1 Tipos de glicanos

La glicosilación produce diferentes tipos de glicanos que normalmente se adhieren a proteínas celulares y lípidos (glicoconjugados). La glicosilación de proteínas abarca los *N*-glicanos, *O*-glicanos y glicosaminoglicanos (a menudo denominados proteoglicanos). Los *N*-glicanos están unidos a los residuos de asparagina de proteínas, específicamente en el motivo Asn-X-Ser/Thr (Yan & Lennarz, 2004), mientras que los *O*-glicanos están unidos a serinas y treoninas (Schachter et al., 2000). Aunque los glicosaminoglicanos también están vinculados a la serina y la treonina, son lineales, se producen por diferentes vías biosintéticas y, a menudo, están muy sulfatados (Esko & Selleck, 2002).

4.2 Glicosidasas

Las glicosil-hidrolasas o glicosidasas (GH, EC 3.2.1.x) son enzimas que hidrolizan el enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y un resto no carbohidrato. La nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB por sus siglas en inglés) se basa en la especificidad del sustrato de las enzimas y, ocasionalmente, en su mecanismo molecular, pero esta clasificación no refleja sus características estructurales. Actualmente 133 familias de glicosidasas están establecidas por la base de datos CAZy, entre las cuales se encuentran neuraminidasas o sialidasas (Lombard et al., 2014).

4.3 Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas (GTs, EC 2.4.xy) constituyen una familia muy grande de enzimas que catalizan la transferencia de residuos de monosacáridos desde una molécula donadora de alta energía (usualmente un complejo de azúcar nucleótido) a

un aceptor (lípido, proteína u oligosacárido), creando enlaces glicosídicos. Estas reacciones requieren la participación de un catión divalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}) como cofactor y tienen una actividad óptima a pH entre 5 y 7 (Fukuda, 1994).

En los animales, los donadores de glicosilo incluyen azúcares nucleotídicos, monosacáridos y oligosacáridos unidos por dolicol-fosfato. Los aceptores son más comúnmente oligosacáridos, pero (en casos raros) pueden ser monosacáridos. Las proteínas y ceramidas son también moléculasceptoras de las glicosiltransferasas que inician la glicoproteína, el proteoglicano y la síntesis de glicolípidos (Rini, Esko & Varki, 2009).

Las GTs son, por lo tanto, responsables de la elongación de las cadenas glicánicas. Estas enzimas catalizan las reacciones de transferencia de una manera secuencial: el producto de una es el sustrato de otra y el resultado es un polímero lineal o ramificado, compuesto por monosacáridos ligados uno al otro (Martínez et al., 2002).

Según la IUBMB, los GTs han sido clasificadas en familias según el tipo de azúcar que se transfiere. Cada una de las familias de GTs adquieren el nombre según el monosacárido que transfieren, esto es: las fucosiltransferasas transfieren fucosa, galactosiltransferasa, galactosa y las sialiltransferasas transfieren ácido siálico, etc. (Tabla 2).

| Familias de glicosiltransferasas | Sustrato donante de azúcar |
|---|-----------------------------------|
| Sialiltransferasas (ST) | CMP- Ácido siálico |
| Fucosiltransferasas | GDP-Fucosa |
| Galactosiltransferasas | UDP-Galactosa |
| N- acetilglucosaminiltransferasas | UDP-Glc-NAc |
| N- acetilgalactosaminiltransferasas | UDP-Gal-NAc |
| Manosiltransferasas | GDP- Manosa |

Tabla 2. Familia de glicosiltransferasas más importantes, clasificadas acorde a la IUBMB, basada en el sustrato donante de azúcar. Tomado de Bassagañas, 2014.

4.4 Sialiltransferasas

Las sialiltransferasas son una familia de enzimas que transfieren el ácido siálico a glicoconjugados (Dall'Olio, 1996; Meany & Chan 2011). Catalizan la transferencia de residuos de ácido siálico desde un azúcar donador activado a posiciones no reductoras terminales de cadenas de oligosacáridos de glicoproteína y glicolípidos. En mamíferos se han descrito 20 tipos las cuales presentan diferencias en la afinidad por el sustrato que reconocen y se clasifican en función del tipo de enlace que forman (Tabla 3) (Harduin-Lepers et al., 2001).

| Familias de sialiltransferasas | | |
|----------------------------------|--------------------------|-----------------|
| Familia | Enlace formado | Enzimas |
| α -2-6 Sialiltransferasas | α -2,6-Gal/GalNAc | ST6Gal NAc I-VI |
| α -2-3 Sialiltransferasas | α -2,3-Gal | ST3Gal I-VI |
| α -2-8 Sialiltransferasas | α -2,8-Neu5Ac | ST8Sia I-VIII |

Tabla 3. Familias de sialiltransferasas clasificadas en función del enlace que forman. Tomado de López & Vallejo, 2007.

A su vez las sialiltransferasas se dividen en subfamilias y esta clasificación está basada en el sitio de adición del ácido siálico y el tipo de enlace que forman, mostrado en la Tabla 4.

| Subfamilia | Gen | Enzima |
|---|-------------------|----------------|
| α2,3- STs (ST3Gal) Transfieren ácido siálico formando un enlace α 2,3 con Gal | <i>ST3GAL1</i> | ST3O |
| | <i>ST3GAL2</i> | ST3Gal II |
| | <i>ST3GAL3</i> | ST3Gal III |
| | <i>ST3GAL4</i> | ST3Gal IV |
| | <i>ST3GAL5</i> | ST3Gal V |
| | <i>ST3GAL6</i> | ST3Gal VI |
| | <i>LOC343705</i> | <i>no name</i> |
| α2,6 -STs Añaden ácido siálico formando un enlace α 2,6 con Gal, GalNAc, GlcNAc | ST6Gal | |
| | <i>ST6GAL1</i> | ST6Gal I |
| | <i>ST6GAL2</i> | ST6Gal II |
| | ST6GalNAc | |
| | <i>ST6GALNAC1</i> | ST6GalNAc I |
| | <i>ST6GALNAC2</i> | ST6GalNAc II |
| | <i>ST6GALNAC3</i> | ST6GalNAc III |
| | <i>ST6GALNAC4</i> | ST6GalNAc IV |
| | <i>ST6GALNAC5</i> | ST6GalNAc V |
| | <i>ST6GALNAC6</i> | ST6GalNAc VI |
| <i>LOC390377</i> | <i>no name</i> | |
| α2,8-STs (ST8Sia) Añaden ácido siálico con enlace α 2,8 a otra molécula de ácido siálico | <i>ST8SIA1</i> | ST8 Sia I |
| | <i>ST8SIA2</i> | ST8 Sia II |
| | <i>ST8SIA3</i> | ST8 Sia III |
| | <i>ST8SIA4</i> | ST8 Sia IV |
| | <i>ST8SIA5</i> | ST8 Sia V |
| | <i>ST8SIA6</i> | ST8 Sia VI |

Tabla 4. Clasificación de subfamilias de sialiltransferasas. (Harduin-Lepers et al., 2001; Harduin-Lepers et al., 2012). Tomado y modificado de Bassagañas, 2014.

Para objeto de este estudio se muestran más a detalle los miembros pertenecientes a la subfamilia de las α 2,6 sialiltransferasas (Tabla 5).

| | Subfamilia | Gen | Localización | Enzima | Características |
|---|------------------|-------------------|--------------|---------------|---|
| α2,6-STs Añaden ácido siálico con enlace α 2,6 a Gal, GalNac o GlcNac. | ST6Gal | <i>ST6GAL1</i> | 3q27-q28 | ST6Gal I | Actúan sobre las cadenas de tipo II, que se encuentran en las N-glicoproteínas y, en menor medida, en las O-glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos libres. |
| | | <i>ST6GAL2</i> | 2q11.2-q12.1 | ST6Gal II | |
| | ST6GalNac | <i>ST6GALNAC1</i> | 17q25.1 | ST6GalNac I | Actúan sobre O-glicoproteínas: Antígeno sialil -Tn en mucinas. Amplia especificidad del sustrato. |
| | | <i>ST6GALNAC2</i> | 17q25.1 | ST6GalNac II | Actúa sobre O-glicoproteínas. Especificidad más restrictiva del sustrato. |
| | | <i>ST6GALNAC3</i> | 1p31.1 | ST6GalNac III | Actúan sobre O-glicoproteínas y glicolípidos. |
| | | <i>ST6GALNAC4</i> | 9q34 | ST6GalNac IV | |
| | | <i>ST6GALNAC5</i> | 1p31.1 | ST6GalNac V | |
| | | <i>ST6GALNAC6</i> | 9q34.11 | ST6GalNac VI | Actúa sobre glicolípidos. |

Tabla 5. Miembros pertenecientes a la subfamilia de las α 2,6 sialiltransferasas. Se describen el nombre del gen y la localización cromosómica, el nombre de la enzima y las características de la actividad (Harduin-Lepers et al., 2001; Harduin-Lepers et al., 2012). Tomado y modificado de Bassagañas, 2014.

Todas las sialiltransferasas de los vertebrados tienen una estructura similar; son glicoproteínas transmembranales de tipo II que residen predominantemente en el compartimiento *trans*-Golgi. Tienen una cola citoplasmática N-terminal corta, un dominio transmembrana único, una región de tallo y un dominio catalítico C-terminal grande. Comparten cuatro motivos conservados con péptidos en el dominio catalítico denominado *motivo sialil* que incluye un motivo grande, uno pequeño, un motivo III y un motivo más pequeño (Geremia, Harduin-Lepers & Delannoy, 1997; Jeanneau et al., 2004).

Se ha observado que el aumento en la sialilación y la fucosilación, son cambios característicos de la transformación maligna. Son modificaciones terminales típicas de proteínas que median funciones biológicas vitales y también tiene implicaciones en el cáncer (Vajaria & Patel, 2017).

La sialilación afecta la vida media de muchas glicoproteínas circulantes y desempeña un papel en una variedad de procesos biológicos, tales como la comunicación célula-célula, la interacción de la matriz celular, la adhesión y la orientación de proteínas. Alteraciones en la expresión de ácido siálico total (TSA), así como alteraciones en la regulación de la expresión de sialiltransferasas han sido reportadas en varios tipos de cáncer (Vajaria, Patel, Begum & Patel, 2015).

5. Cáncer cervicouterino y sialilación

En las células cancerosas se ha reportado un aumento de estructuras sialiladas y en los niveles de ARNm de los genes de sialiltransferasas (Harduin-Lepers et al., 2001). En CaCu se ha reportado una mayor expresión de los genes *ST6GAL1* y *ST3GAL3* asociado con invasión profunda al estroma y compromiso de los ganglios linfáticos (Wang et al., 2002).

En lesiones premalignas, se ha reportado un aumento en los niveles de ARNm de los genes *ST6GAL1*, *ST3GAL3* y *ST3GAL4*. El aumento de la expresión de ácido siálico y también los antígenos sialilados, como sLewis (x), han sido reportados en lesiones premalignas y malignas del cuello uterino (Roy & Chakraborty, 2005; López-Morales, Reyes-Leyva, Santos-López, Zenteno & Vallejo-Ruiz, 2010; Velázquez-Márquez et al., 2012).

La regulación positiva de los genes de la sialiltransferasa se ha correlacionado con el aumento de la sialilación de los glicoconjugados de membrana. La hipersialilación contribuye a una mayor invasión celular y metástasis tumoral (Christie et al., 2008; Büll et al., 2013; Fukasawa et al., 2013).

6. Gen *ST6GAL1*

El ARNm de la ST6Gal I es codificado por el gen *ST6GAL1*. El gen abarca al menos 145,000 pb de ADN genómico y reside en el cromosoma 3(q21- q28). Comprende 9 exones. El codón de iniciación de la traducción está en el exón II; Los exones I, X, Y y Z son regiones 5' no traducidas (UT) (Lo & Lau, 1996a). El mapa genómico del gen se esquematiza en la figura 5.

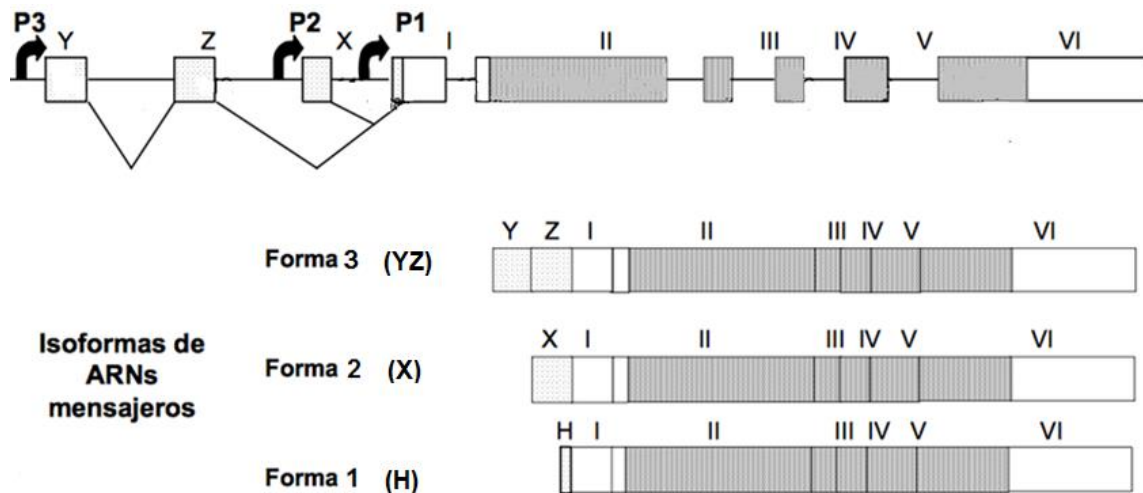


Figura 5. Mapa genómico del gen *ST6GAL1* e isoformas del ARNm. Los exones se presentan en bloques, los intrones en líneas. Las flechas indican la posición de cada promotor. La región codificante se presenta punteada entre los exones II-VI. Tomado de López & Vallejo, 2007.

La expresión se regula mediante el uso de diferentes regiones promotoras: P1, P2 y P3 de los cuales se producen diferentes transcritos (isoformas de ARNm). Se han identificado tres isoformas de ARNm generadas por estos promotores: (1) una forma corta aislada del hígado llamada forma 1 o H que carece de los exones Y, Z y X pero contiene una secuencia corta adyacente al exón I, (2) una forma denominada forma 2 o X, denominado así porque contiene el exón X cuya expresión se ha reportado en células B maduras, y (3) una forma 3 o YZ que contiene los exones Y y Z. (Wang et al., 1990; Svensson, Conley & Paulson, 1992; Stamenkovic et al., 1990; Aasheim et al.,

1993; Wang et al., 2003; Aas-Eng et al., 1995). Estas isoformas se han detectado en el tejido cervical. La isoforma YZ se detectó en niveles similares en los tejidos normales y cancerosos, las isoformas X y H se detectaron con mayores niveles en el tejido maligno de cérvix (Wang et al., 2003).

Las isoformas de ARN mensajero codifican para la misma proteína, por lo que su importancia radica en el mecanismo de regulación, ya que es regulado por diferentes promotores que pueden tener diferente actividad en función del tipo celular o bien en función de procesos de diferenciación o activación celular (López & Vallejo, 2007).

6.1 Promotor P1 de *ST6GAL1*

La expresión del ARNm de la forma H depende de la actividad del promotor P1, esta isoforma aumenta sus niveles en tejido de cérvix maligno (Wang et al., 2003). El promotor P1 se ha caracterizado previamente en líneas celulares de colon y hepáticas (Xu et al., 2003). La región de -156 a -1 es importante para la actividad transcripcional. Esta región contiene un elemento de reconocimiento HNF1, la mutación en este sitio reduce la actividad del promotor, lo que sugiere que el sitio HNF1 está implicado en la transcripción de la isoforma 1 en células de cáncer de colon y hepáticas (Xu et al., 2003). Además, el promotor P1 contiene sitios putativos de unión a factores de transcripción tales como AP1 y NF-IL6. También posee tres sitios de unión a c-Myc, que podrían estar participando en la regulación. Este promotor no tiene cajas TATA y CCAAT. Este tipo de promotores se caracterizan por la presencia de sitios iniciadores de la transcripción (Inr) que pueden funcionar como cajas TATA. En el promotor P1 se han identificado dos secuencias de iniciación en las posiciones -53 y -9 pb (Lo & Lau, 1996b). Una tercera secuencia iniciadora fue identificada en la posición +5 pb mostrado en la Figura 6 (Milflores-Flores *et al.*, 2012). El promotor presenta un sitio de unión a TFII-I. Este factor de transcripción es una proteína crucial para la actividad de los promotores sin caja TATA que contienen secuencias iniciadoras (Manzano, Novina & Roy, 1996).

Se ha estudiado la regulación de este promotor, mediante la evaluación de diferentes construcciones del promotor P1 utilizando ensayos de luciferasa en líneas celulares cervicales y hepáticas. La eliminación de un fragmento de 1048 pb (-65 a +24 pb) aumentó 5 y 3 veces la actividad del promotor en las líneas celulares C33A y HepG2, respectivamente; mientras que la eliminación de un fragmento de 1014 pb aumentó 5 y 1.5 veces la actividad del promotor en las mismas líneas celulares. La región mínima con actividad promotora fue un fragmento de 37 pb en células C33A, mientras que en HepG2 se detectó la actividad promotora mínima en el fragmento de 66 pb. Adicionalmente se realizó una mutación en el sitio Sp1 (-32) y esto aumentó la actividad del promotor solo en las células HepG2. Por otro lado, se realizó una mutación en el sitio HNF1 y provocó la disminución de la actividad del promotor en la línea celular HepG2 pero no en las células C33A. Estos resultados muestran que la expresión del gen *ST6GAL1* está modulada diferencialmente, dependiendo no sólo de las regiones promotoras, sino también de los tipos celulares. La regulación de la actividad del promotor es específica del tipo de célula (Milflores *et al.*, 2012).

ANTECEDENTES

En muestras de CaCu existe una mayor concentración de ácido siálico (Roy y Chakraborty, 2005) y del nivel de expresión del ARNm de la forma H de *ST6GAL1* con respecto a tejido sano (Wang et al 2003), y aunque se desconoce cuál isoforma, la alta expresión del ARNm de la sialiltransferasa *ST6GAL1* se ha asociado con propiedades invasivas del CaCu, como invasión del estroma profundo y metástasis a ganglios linfáticos (Wang et al., 2002).

En lesiones premalignas, se ha reportado un aumento en los niveles de ARNm de tres sialiltransferasas ST6Gal I, ST3Gal III y ST3Gal IV (López-Morales et al., 2009) y una expresión aumentada de ácido siálico con enlace $\alpha 2,3$ y enlace $\alpha 2,6$ (López-Morales, 2010), lo que nos podría indicar que existen cambios en la sialilación antes de que se produzca el desarrollo de CaCu.

Por otra parte, se ha reportado que las proteínas virales podrían estar modificando la expresión de genes que codifican para enzimas que participan en la glicosilación (glicogenes). Estudios en una línea celular derivada de CaCu con atenuación de la expresión de los genes E6 y E7 sugieren que las oncoproteínas están modificando la expresión de glicogenes, cuyos productos participan en la síntesis de estructuras glicánicas implicadas en la proliferación, adhesión y apoptosis (Aco-Tlachi et al., 2018).

Recientemente, en nuestro grupo de investigación, se ha determinado que existen cambios en los niveles de expresión de glicogenes dependiendo de si la oncoproteína E6 es de VPH de alto o bajo riesgo, Así, estas oncoproteínas tienen efectos diferentes sobre la expresión de glicogenes (Caporal Hernández, 2019)

Por otro lado, resultados de nuestro grupo de investigación revelan que las proteínas E6 y E7 de VPH 16 podrían alterar la expresión de glicogenes a través de la modificación de la actividad de promotor. Por una parte, se ha evaluado el papel de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH 16 sobre la actividad del promotor del gen *ST3GAL4*. Los resultados muestran que la actividad del promotor de la variante V3 aumenta en presencia de la oncoproteína E6, pero no en presencia de E7 (Ortiz-Mateos, 2017). Asimismo, se ha evaluado si existen cambios en la actividad del promotor V2 del gen

ST3GAL4 en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16. En esos estudios se encontró una regulación negativa en la actividad del promotor, en donde la actividad de promotor se reduce en presencia de E6 o E7 (Monterrosas Santamaría, 2018).

Con respecto al promotor de *ST6GAL1*, en 2012, Milflores y et al., caracterizaron el promotor P1 de este gen, cuya actividad conduce a la transcripción de la forma H de *ST6GAL1*. En ese trabajo se evaluó la actividad de diferentes construcciones del promotor P1 mediante ensayos de luciferasa en líneas celulares derivadas de CaCu y cáncer hepático. Los resultados indican que la actividad del promotor P1 se modula de manera diferencial dependiendo del tipo celular, ya que la eliminación de un fragmento del promotor de 1014 pb incrementa 1.5 y 5 veces la actividad del promotor en la línea celular hepática y cervical respectivamente. Hasta ahora no se ha evaluado si la actividad del promotor P1 de *ST6GAL1* podría ser modulado por la presencia de E6.

JUSTIFICACIÓN

En cáncer cervicouterino se ha reportado un aumento en el nivel de sialilación asociado con el grado de transformación maligna. Se ha reportado un aumento en los niveles de ARNm del gen *ST6GAL1* en lesiones premalignas y CaCu. Estudios preliminares revelan que la oncoproteína E6 del virus del VPH-16 puede modificar la actividad de promotores de genes de sialiltransferasas. Profundizar en el conocimiento de cómo esta oncoproteína regula al gen *ST6GAL1* ayudará a comprender mejor que factores podrían estar participando en el cambio de expresión durante la transformación maligna del cérvix.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incremento en la expresión de ARNm de *ST6GAL1* se ha reportado en cáncer cervicouterino. Se han caracterizado tres isoformas del ARNm para este gen, encontrando la isoforma H incrementada en tumores malignos de cérvix. La isoforma H es resultado de la actividad del promotor P1, por lo que la actividad de este promotor podría estar modificada en células de cérvix durante la transformación maligna. Debido a que la infección persistente con el VPH de alto riesgo es el principal agente etiológico del CaCu, y a que la oncoproteína E6 puede modificar la expresión de glicogenes y la actividad de algunos promotores de sialiltransferasas, es importante evaluar si la proteína viral E6 es capaz de modificar la actividad del promotor P1 del gen *ST6GAL1*, y determinar si ejerce efecto a través de los elementos de respuesta a C-Myc. Lo anterior permitirá comprender el papel del virus en las modificaciones de la sialilación asociadas al fenotipo maligno. Por lo anterior nos planteamos las siguientes preguntas:

- 1) ¿Qué efecto tiene la oncoproteína E6 del VPH-16 sobre la actividad del promotor P1 del gen *ST6GAL1*?
- 2) ¿Los elementos de respuesta a c-Myc están implicados en la regulación del promotor P1 por la oncoproteína E6 de VPH-16?
- 3) ¿Las oncoproteínas E6 de VPH-18, VPH-62 y VPH-84 modifican la actividad del promotor P1 del gen *ST6GAL1*?

HIPÓTESIS

- 1) La oncoproteína E6 de VPH 16 y VPH 18 aumenta la actividad del promotor P1 del gen *ST6GAL1*.
- 2) La oncoproteína E6 de VPH-16 regula la actividad del promotor P1 a través de los elementos de respuesta a c-Myc.
- 3) Las oncoproteínas E6 de virus de VPH 62 y VPH 84 no modifican la actividad del promotor P1 del gen *ST6GAL1*.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la regulación de la actividad del promotor P1 del gen *ST6GAL1* por la oncoproteína E6 del VPH.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la oncoproteína E6 del VPH16 sobre la actividad del promotor P1 en células HaCaT.
2. Determinar si el elemento de respuesta a c-Myc participa en la regulación del promotor P1 por la oncoproteína de E6 del VPH.
3. Evaluar si las proteínas E6 de VPH 16, VPH 18, VPH 62 y VPH 84 modifican la actividad del promotor P1 del gen *ST6GAL1* en un modelo de expresión estable.

CAPITULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

Línea celular

Se utilizó la línea celular HaCaT que son queratinocitos inmortalizados de piel humana negativa al VPH. Adicionalmente, se utilizaron las clonas de HaCaT transfectadas de manera estable con E6 de diferentes tipos de VPH: HaCaT-E6 VPH16, HaCaT-E6 VPH18 (alto riesgo), así como HaCaT-E6 VPH62, y HaCaT-E6 VPH84 (bajo riesgo). Como control negativo se utilizó la línea celular HaCaT transfectada de manera estable con el vector de expresión PLVx (sin E6), a la cual se denominó HaCat-PLVx. Estas líneas celulares transfectadas de manera estable fueron realizadas por la D.C. Adriana Aguilar y el D.C. Luis Felipe Jave del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO).

Plásmidos

Para evaluar el efecto de E6 sobre la actividad del promotor P1, se utilizaron vectores plasmídicos, así como varias construcciones del promotor que fueron realizadas por Milflores-Flores et al., 2012, y que se describen a continuación.

- ***Vector pGL4.12 [luc2CP]***

El vector pGL4.12 [luc2CP] codifica el gen reportero de luciferasa luc2CP (*Photinus pyralis*) (Figura 7). Es un vector sin promotor que mide 4421 pb y contiene una región de clonación múltiple para insertar el promotor, ubicado río arriba del gen reportero.

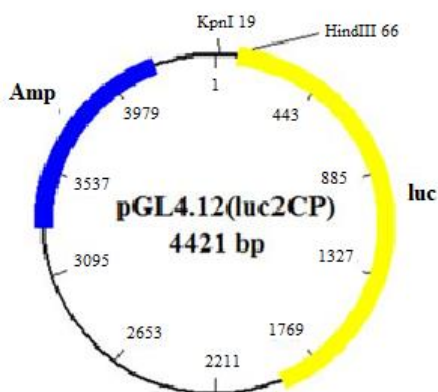


Figura 7. Mapa del vector pGL4.12 (luc2CP). Se muestra en amarillo el gen reportero luciferasa y en azul el gen de resistencia a ampicilina. Se indican los sitios *Kpn* I y *Hind* III donde fue insertado el promotor P1 del gen *ST6GAL1* de 1137 pb.

○ **Construcción pGL4-1137P1 (Promotor completo P1)**

Construcción del promotor P1 del gen *ST6GAL1* (1137pb) insertado en los sitios *Kpn I* y *Hind III* del vector pGL4.12 (*luc2CP*) (4376 pb) para formar el plásmido pGL4-1137P1 (5513 pb) (Figura 8). Comprende la región del promotor de -1113 a +24 pb.

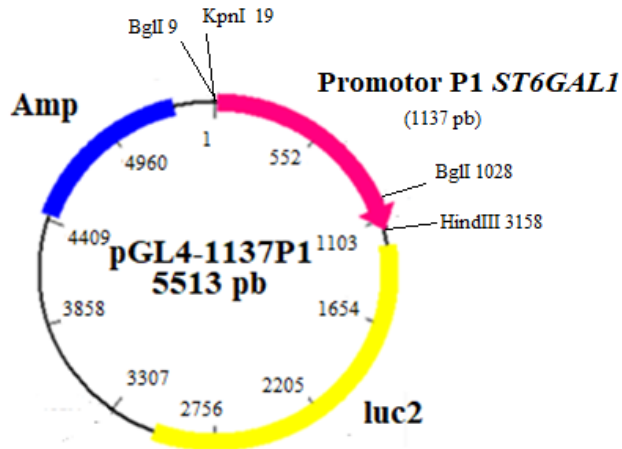


Figura 8. Esquema de la construcción de pGL4-1137P1. Se muestra la región promotora del gen *ST6GAL1* en rosa, el gen reportero luciferasa en amarillo, el gen de resistencia a ampicilina en azul y también se indican otros sitios de restricción del plásmido.

○ **Construcción pGL4-123P1**

Construcción de un fragmento del promotor P1 de 123 pb (Figura 9). Abarca la región del promotor de -99 a +24 pb.

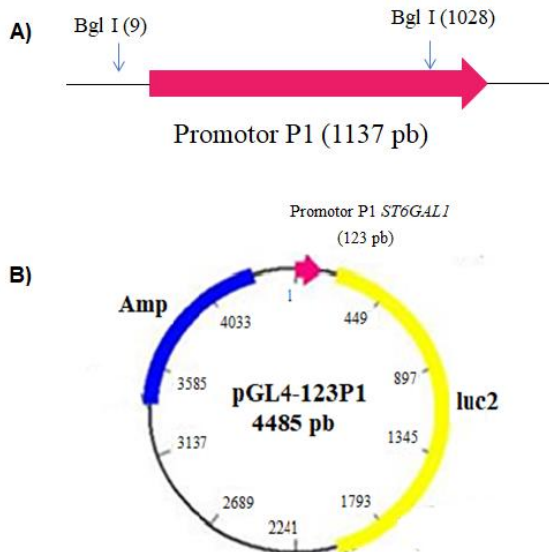


Figura 9. Esquema de la construcción pGL4-123P1. A) Se muestra la región promotora del gen *ST6GAL1* en rosa y se indican los sitios de restricción para la enzima *Bgl I*, fragmento que fue eliminado, recircularizando el vector, quedando una región del promotor P1 de 123 pb. B) Construcción pGL4-123P1, donde se muestra el fragmento de 123 pb en rosa, el gen reportero en amarillo y el gen de resistencia a ampicilina en azul. El tamaño de esta construcción es de 4485 pb.

- **Construcción pGL4-1137P1 Δc-Myc**

Vector que posee la región del promotor completa de 1137 pb (pGL4-1137P1) con una mutación sitio dirigida en el sitio de unión a c-Myc en la posición +4 a +10.

- **Construcción pGL4-123P1 Δc-Myc**

Vector que posee la región del promotor de 123 pb (pGL4-123P1) con una mutación sitio dirigida en el sitio de unión a c-Myc en la posición +4 a +10.

- **Vector pGL4.72 (control de transfección)**

Es un vector con DNA circular de 3704 pb. Carece de promotor, sin embargo contiene una región de clonación múltiple que permite la clonación de un promotor de elección. Codifica para el gen reportero de luciferasa hRlucCP (*Renilla reniformis*) (Figura 10).

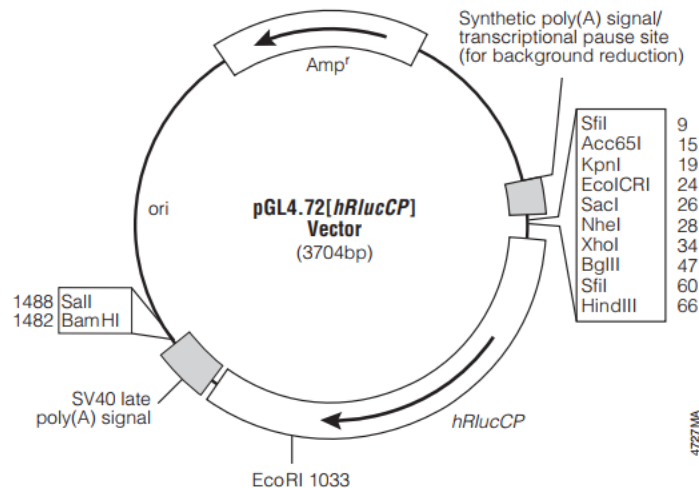


Figura 10. Mapa del Vector pGL4.72 [hRlucCP].

- **Vectores de expresión: pcDNA vector y pcDNA-E6**

El vector pcDNA3 de 5.4 kb está diseñado para la expresión estable y transitoria de alto nivel en huéspedes mamíferos. Contiene un promotor del citomegalovirus humano (CMV) para expresión en una amplia gama de células de mamíferos, así como múltiples sitios de clonación y gen de resistencia a la neomicina. Para este trabajo, este vector se ha denominado pcDNA negativo (pcDNA neg) porque no tiene el marco de lectura de E6 (Figura 6A). El constructo resultante de la clonación del marco de lectura de E6 de VPH 16 dentro del vector pcDNA3 se muestra en la figura 6B y se ha nombrado pcDNA-E6. En el laboratorio se cuentan con ambos vectores de expresión.

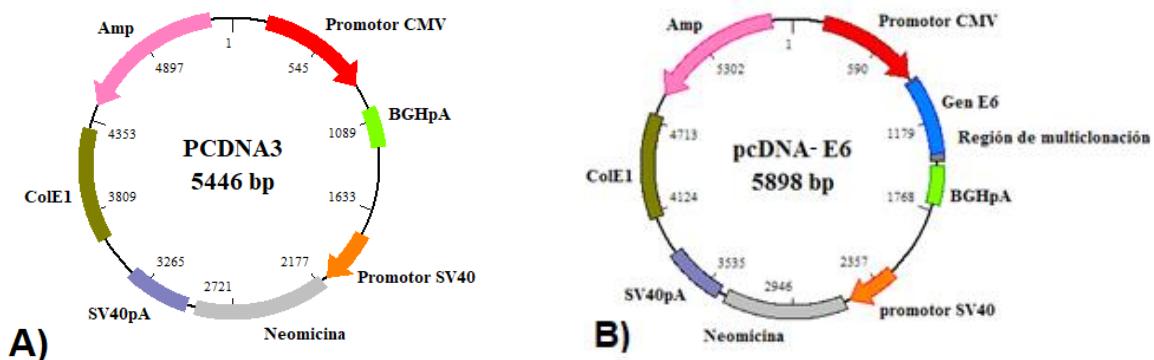


Figura 10. Representación esquemática de vectores de expresión pcDNA3 y pcDNA – E6 A) Representación esquemática pcDNA3, (pcDNA neg). B) Representación esquemática del vector pcDNA3 que contiene el marco de lectura de E6 del VPH 16 (pcDNA-E6).

Transformación y purificación

Las construcciones del promotor P1 que tenían la mutación en c-Myc (pGL4-1137P1 Δ c-Myc y pGL4-123P1 Δ c-Myc) fueron utilizadas para transformar células competentes *E. coli* DH5 α , previamente descongeladas a las cuales se les agregaron 2 μ l de cada plásmido, se colocaron en hielo y luego a 42°C para provocar choque térmico, se agregaron 900 μ l medio de cultivo Luria Bertani (LB) y se incubaron 2 h a 37 °C a 250 rpm. Posteriormente fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 45 segundos, se retiró el medio, se resuspendió el pellet y se plaquearon en cajas Petri con agar LB con 100 μ l/ml de ampicilina para seleccionar las colonias transformadas.

Cada uno de los plásmidos mutados se amplificaron y purificaron mediante una maxi de alta pureza utilizando el kit NucleoBond Xtra Maxi Plus (Macherey–Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante para posteriormente ser utilizadas para determinar la actividad del promotor mediante ensayos de transfección.

Cuantificación de ADN

El ADN se cuantificó en un nanofotómetro (IMPLEN) midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, también se obtuvo una estimación de la pureza del ADN por medio de la relación de absorbancia (A260/A280), en este trabajo se consideró una relación de 1.6 a 1.9.

Cultivos celulares

Las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado con 5% de suero fetal bovino, con penicilina G, estreptomicina y Anfotericina B (Biowest 100x).

A las células se les dio mantenimiento cada tercer día. Se lavaron tres veces con 3 mL de PBS 1X para retirar desechos celulares, se adicionó 0.4 mL de tripsina marca SIGMA (2.6 g de tripsina y 0.2g de EDTA), con suaves movimientos se bañó toda la monocapa, se incubó durante 5 minutos a 37 °C y 5% de CO₂ y se retiró la tripsina. Una vez desprendidas todas las células se adicionó 1.0 mL de DMEM y se transfirieron a un tubo de 1.5 mL para centrifugarlas a 1500 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1.0 mL de DMEM dejando el volumen necesario en función de la dilución deseada.

Ensayos de transfección y evaluación de la actividad del promotor P1

Las transfecciones plasmídicas se llevaron a cabo en la línea celular HaCaT sembrando 100,000 células por pozo en placas de 24 pozos con una confluencia del 80%, empleando Lipofectamina 3000 siguiendo las condiciones experimentales recomendadas por la casa comercial. Se co-transfectaron 800 ng de cada construcción (vector de clonación pGL4.12 que contenga el inserto del promotor), con 20 ng del plásmido pGL4.72 que codifica para la luciferasa *Renilla reniformis* que se utilizará para

normalizar la actividad de la luciferasa y como control de la eficiencia de transfección, así como, 300 ng pcDNA vector. De igual manera, para evaluar el efecto de la oncoproteína E6 de los VPHs, se realizaron las mismas co-transfecciones, sólo que en lugar de utilizar pcDNA vector, se utilizaron 300 ng de plásmido de expresión pcDNA-E6-16.

Por otro lado, las clonas transfectadas de manera estable con la oncoproteína E6 de los diferentes tipos virales, denominadas HaCaT-E6 VPH16, HaCaT-E6 VPH18, HaCaT-E6 VPH62, HaCaT-E6 VPH84, así como el control negativo HaCaT-PLVx fueron transfectadas de manera transitoria con cada una de las construcciones del promotor, como se describió anteriormente para células HaCaT. Las células transfectadas se incubaron por 24 h a 37 °C y 5% CO₂.

Ensayos de Luminiscencia

Para determinar la actividad de la enzima reportera luciferasa, así como de la luciferasa control de Renilla, se hicieron ensayos de luminiscencia utilizando el kit Dual Luciferase Reporter Assay System de Promega. Después de 24 h post-transfección, se realizaron lavados a las células con PBS 1x y después fueron lisadas con 100 µl de buffer pasivo de lisis 1X por 2 h. Al término de la lisis, se tomaron 20 µl del lisado, se colocaron en un microtubo de 1.5 ml y se les agregaron 20 µl de Luciferase Assay Reagent II, se leyó la primera actividad correspondiente a la luciferasa de *Photinus pyralis* y después se agregaron en el mismo lisado 20 µl de Stop & Glo® que detiene la actividad de la enzima anterior y además contiene el sustrato para la luciferasa de *Renilla reniformis*. Las lecturas se realizaron en un luminómetro Glomax 20/20 (Promega). Los valores de luminiscencia obtenidos de las diferentes construcciones del promotor fueron normalizados con los valores obtenidos a partir del control interno pGL4.72(hRLucCP).

Análisis estadístico

El valor de actividad de luciferasa obtenido en las construcciones de los promotores en los diferentes ensayos se normalizó dividiéndolo entre el valor de actividad de luciferasa obtenido con el plásmido control pGL4.72 (hRLucCP).

Para establecer significancia estadística, se realizó una prueba de One-way ANOVA. Para determinar la diferencia estadística entre las diferentes condiciones experimentales de los ensayos de actividad de luciferasa, se consideró un valor de $P < 0.05$ como estadísticamente significativo. Para ello se empleó el programa GraphPad Prism 5.

Análisis de Promotor in sílico

Se realizó el análisis del promotor para la búsqueda de nuevos sitios de unión a factores de transcripción, por lo que se empleó el programa Patch 1.0 disponible en <http://gene-regulation.com/> y el programa Softberry Nsite <http://www.softberry.com/>

CAPITULO III

RESULTADOS

Evaluación de la actividad de las diferentes construcciones del promotor P1 de *ST6GAL1* en línea celular HaCaT

Se realizó transfección transitoria de las construcciones del promotor completo pGL4-1137P1 y del fragmento de 123 pb pGL4-123P1 en la línea celular HaCaT para saber cómo era la actividad de estas fusiones transcripcionales. Los valores se normalizaron con pGL4-1137P1, al cual se le asignó el valor de 1. Los resultados muestran que la actividad de la construcción pGL4-123P1 fue alrededor de 29.5 veces mayor que la del promotor completo pGL4-1137P1, como se muestra en la Figura 11.

Actividad relativa de luciferasa de promotor PGL4-1137P1 y PGL4-123P1 de *ST6GAL1* en línea celular HaCaT

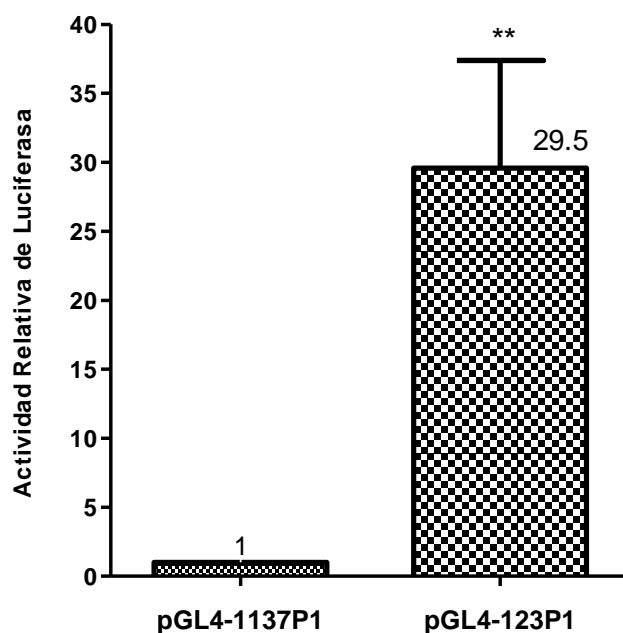


Figura 11. Actividad de luciferasa de las construcciones pGL4-1137P1 y pGL4-123P1 del gen *ST6GAL1* en la línea celular HaCaT. Los ensayos fueron realizados por triplicado mostrando los valores de la media de cada grupo (n=3). Se realizó una prueba t-Student. Se tomó un valor P <0.05, ocupando el software GraphPad Prism 5. **Diferencias significativas entre el promotor completo y el fragmento de 123pb.

Evaluación de la actividad de las diferentes construcciones del promotor P1 con mutación en c-myc de *ST6GAL1* en línea celular HaCat

Para evaluar el efecto de la mutación en el sitio de unión para el factor de transcripción c-Myc situado en la posición +4 a +10, se realizó la transfección de las diferentes construcciones del promotor con sus respectivas mutaciones. Se normalizaron los datos con el valor de pGL4-1137P1 al que se le asignó el valor de 1. Observamos que la actividad del pGL4-1137 Δ c-myc no muestra diferencias significativas al compararla con el promotor completo sin mutación. Por otro lado, al comparar pGL4-123P1 Δ c-myc con la versión sin mutación, vemos una disminución de la actividad de la versión mutante alrededor de 10 veces. Por último, al comparar ambas mutantes con el promotor completo, no se observa diferencia significativa (Figura 12).

Actividad relativa de luciferasa de diferentes construcciones del promotor P1 en línea celular HaCaT

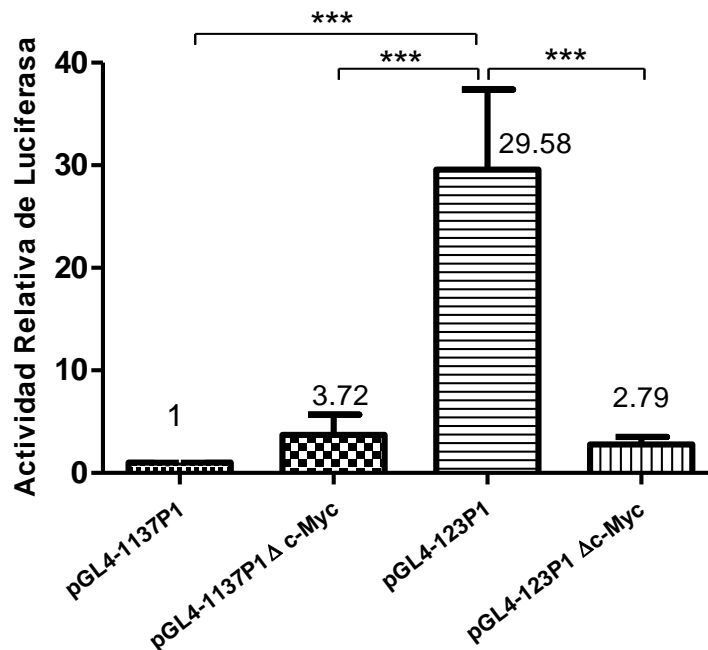


Figura 12. Actividad de luciferasa de las construcciones pGL4-1137P1 y pGL4-123P1 del gen *ST6GAL1* así como sus respectivas mutantes en c-Myc. Los ensayos fueron realizados por triplicado mostrando los valores de la media de cada grupo (n=3). Se realizó One Way ANOVA y posterior análisis de Tukey. Se tomó un valor P <0.05, ocupando el software GraphPad Prism 5.

Evaluación de la actividad de las diferentes construcciones del promotor P1 de *ST6GAL1* en presencia de E6 VPH 16 en línea celular HaCat

Se evaluó la actividad del promotor completo, así como el fragmento de 123pb en ausencia y presencia de E6 VPH 16. Se normalizaron los datos con el valor de pGL4-1137P1 + pcDNA neg, al que se le asignó el valor de 1. Se observa que en presencia de E6, la actividad del promotor completo disminuye completamente. Por otro lado, en el fragmento de promotor de 123pb, su actividad disminuye 4 veces en presencia de E6, (Figura 13). Por lo tanto, observamos que E6 ejerce un efecto negativo sobre la actividad del promotor en sus dos versiones, siendo más evidente su efecto en el promotor completo.

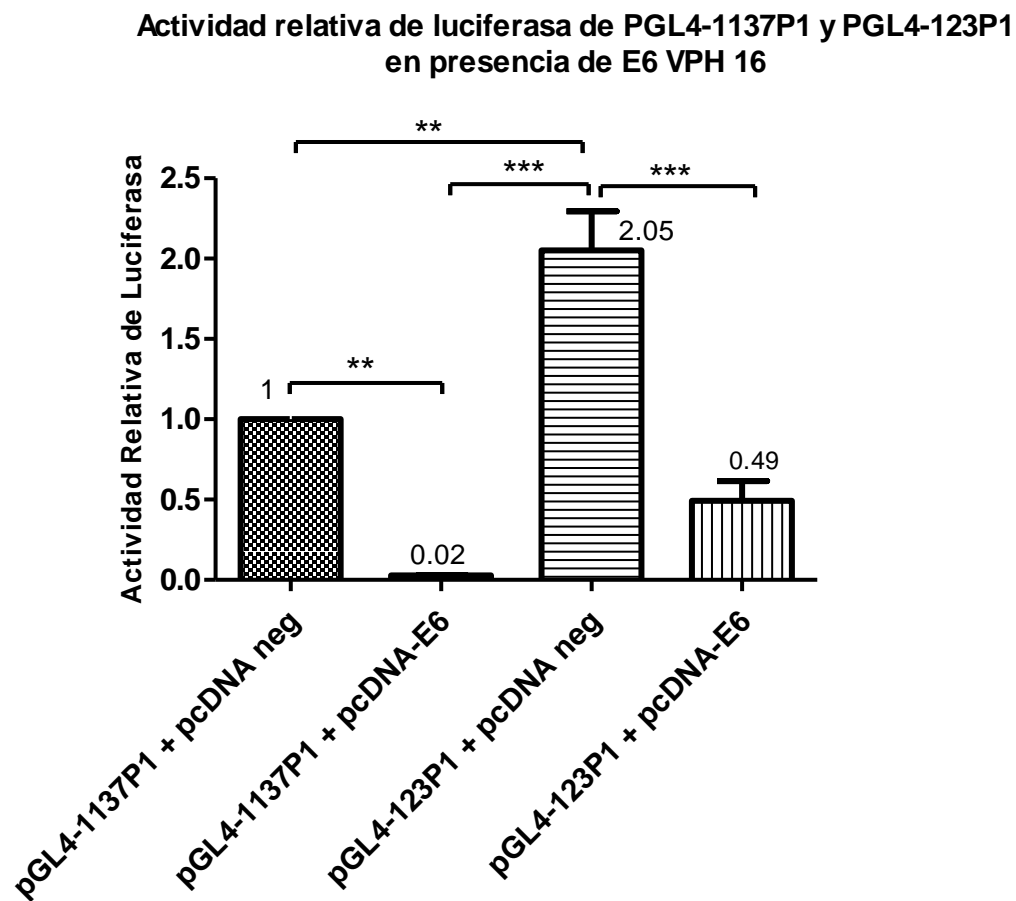


Figura 13. Actividad de luciferasa de las construcciones pGL4-1137P1 y pGL4-123P1 en presencia de E6 de VPH 16. Los ensayos fueron realizados por triplicado mostrando los valores de la media de cada grupo (n=3). Se realizó One Way ANOVA y posterior análisis de Tukey. Se tomó un valor $P < 0.05$, ocupando el software GraphPad Prism 5.

Evaluación de la actividad de pGL4-1137P1 Δ c-Myc y pGL4-123P1 Δ c-Myc en presencia de E6 VPH 16 en línea celular HaCat

Para saber si existía un efecto de E6 VPH 16 sobre las construcciones del promotor con mutación en c-Myc, se evaluó la actividad de cada promotor con la mutación en c-Myc en presencia y ausencia de E6. Se normalizaron los datos con el valor de pGL4-1137P1 Δ c-Myc + pcDNA neg, al que se le asignó el valor de 1. Se observó que E6 VPH 16 ejerce un efecto negativo al anular la actividad del promotor completo y del fragmento 123 pb (Figura 14).

Actividad relativa de luciferasa de PGL4-1137P1 Δ c-Myc y PGL4-123P1 Δ c-Myc en presencia y ausencia de E6 VPH 16

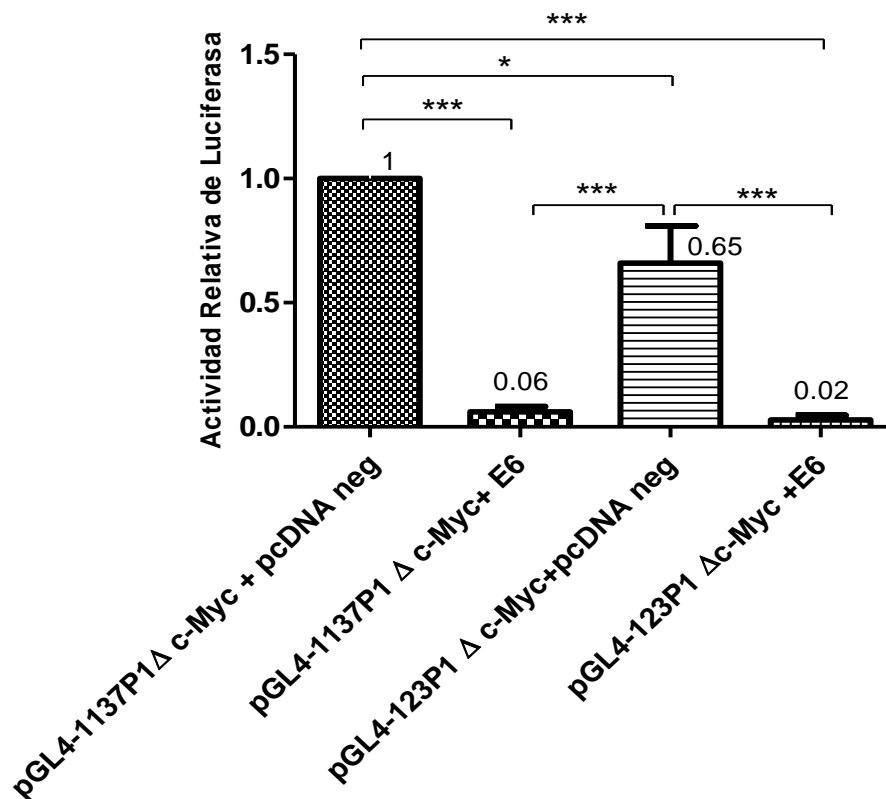


Figura 14. Actividad de luciferasa de las construcciones pGL4-1137P1 Δ c-Myc y pGL4-123P1 Δ c-Myc en presencia y ausencia de E6 VPH 16. Los ensayos fueron realizados por triplicado mostrando los valores de la media de cada grupo (n=3). Se realizó One Way ANOVA y posterior análisis de Tukey. Se tomó un valor $P < 0.05$, utilizando el software GraphPad Prism 5.

Hasta ahora, podemos decir que E6 ejerce un efecto negativo sobre la actividad del promotor completo y del fragmento de 123 pb. Independientemente de que haya mutación en c-myc, la actividad de cualquiera de las construcciones de promotor disminuye en presencia de E6. Estos resultados sugieren que c-myc no participa en la regulación del promotor P1 del gen *ST6GAL1* en la línea celular HaCaT.

Evaluación de la actividad de pGL4-1137P1 en presencia de E6 de diferentes genotipos de VPH de alto y bajo riesgo en un modelo de transfección estable.

Se realizó una transfección transitoria de la construcción del promotor pGL4-1137P1 en la línea celular HaCaT transfectada de manera estable con el marco de lectura abierto de E6 de diferentes genotipos de VPH. Se normalizaron los resultados con los valores obtenidos en la línea HaCaT-PLVx, que se tomó como control y se le asignó el valor de 1. Se observa que E6 VPH 18 (alto riesgo) aumenta la actividad del promotor 4 veces a comparación del control. Por otro lado, E6 VPH 62 de bajo riesgo tiende a aumentar la actividad del promotor 1.5 veces, aunque no fue estadísticamente significativo, mientras que E6 VPH 84 disminuye la actividad casi 4 veces en comparación con el control negativo, aunque tampoco es estadísticamente significativo (Figura 15).

**Actividad relativa de luciferasa de PGL4-1137
en presencia de E6 de genotipos de alto y bajo riesgo.**

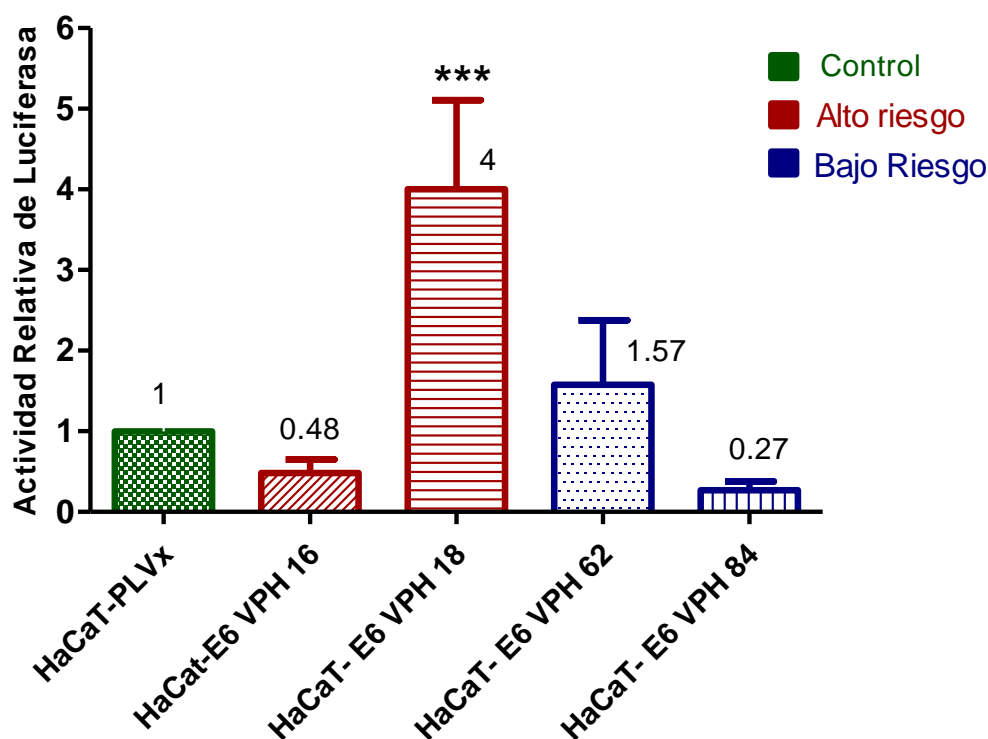


Figura 15. Actividad de luciferasa de la construcción pGL4-1137P1 en presencia de E6 de genotipos de VPH de alto y bajo riesgo. Los ensayos fueron realizados por triplicado y se muestran los valores de la media de cada grupo (n=3). Se realizó One Way ANOVA y posterior análisis de Dunnet. Se tomó un valor $P < 0.05$, utilizando el software GraphPad Prism 5.

Evaluación de la actividad de pGL4-1137P1 Δ c-Myc en presencia de E6 de diferentes genotipos de VPH de alto y bajo riesgo en un modelo de transfección estable.

Se realizó una transfección transitoria de la construcción del promotor pGL4-1137P1 Δ c-Myc en la línea celular HaCaT transfectada de manera estable con el marco de lectura abierto de E6 de diferentes genotipos de VPH. Se normalizaron los datos con HaCaT-PLVx, que se tomó como control y se le asignó el valor de 1. Se observa que E6 VPH 18 (alto riesgo) aumenta la actividad del promotor 10.5 veces a comparación

del control. Por otro lado, E6 VPH 62 (bajo riesgo) también aumentó la actividad del promotor 3.5 veces (Figura 16). Al comparar esta gráfica con la anterior, se observa que se mantiene el mismo comportamiento. E6 VPH 16 y E6 VPH 84 no modificaron la actividad del promotor de manera significativa.

Actividad relativa de luciferasa de PGL4-1137P1 Δ c-Myc en presencia de E6 de genotipos de alto y bajo riesgo.

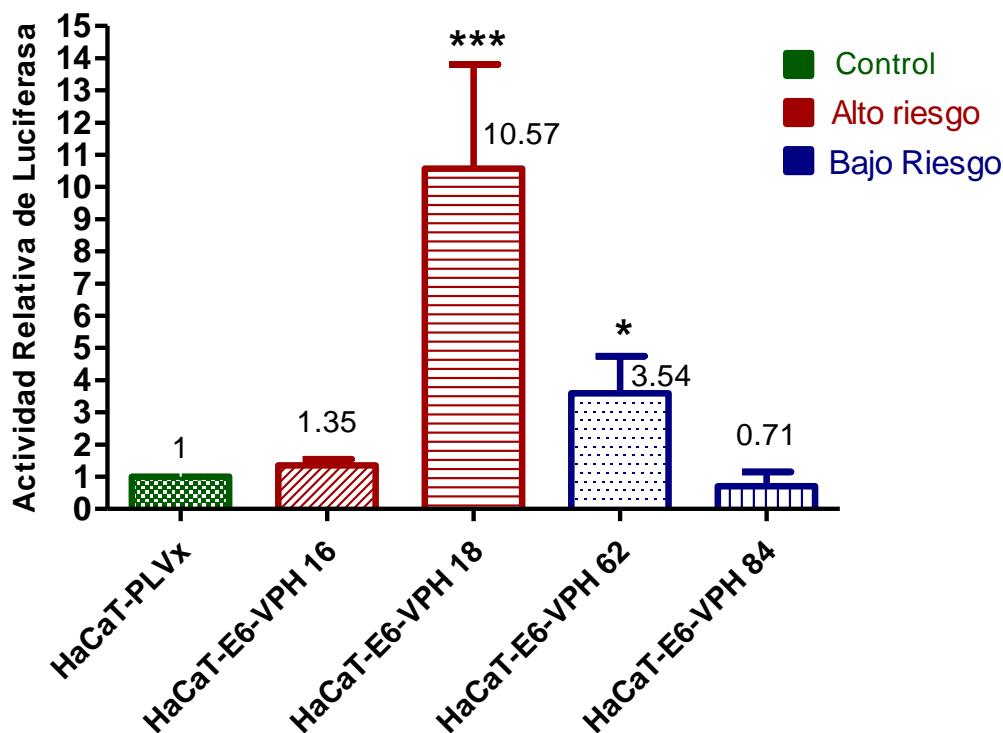


Figura 16. Actividad de luciferasa de la construcción de pGL4-1137P1 Δ c-Myc en presencia de E6 de genotipos de VPH de alto y bajo riesgo. Los ensayos fueron realizados por triplicado y se muestran los valores de la media de cada grupo (n=3). Se realizó One Way ANOVA y posterior análisis de Dunnet. Se tomó un valor P <0.05, utilizando el software GraphPad Prism 5.

Evaluación de la actividad de pGL4-123P1 en presencia de E6 de diferentes genotipos de VPH de alto y bajo riesgo en un modelo de transfección estable.

Dado que el fragmento del promotor de 123 pb muestra una mayor actividad que la del promotor completo, ahora nos interesa saber si las oncoproteínas de E6 de VPH, pueden modificar su actividad. Para ello se realizó una transfección transitoria de la

construcción pGL4-123P1 en la línea celular HaCaT transfectada de manera estable con el marco de lectura abierto de E6 de diferentes genotipos. Se normalizaron los datos con HaCaT-PLVx, que se tomó como control y se le asignó el valor de 1. Se observa que E6 VPH 18 aumenta la actividad del fragmento del promotor 3 veces al compararlo con el control. De igual forma, E6 VPH 62 tiende a aumentar la actividad del fragmento del promotor casi 2 veces, aunque no parece estadísticamente significativo. E6 VPH 16 y E6 VPH 84 no muestran diferencias significativas respecto al control (Figura 17).

Actividad relativa de luciferasa de PGL4-123P1 en presencia de E6 de genotipos de alto y bajo riesgo.

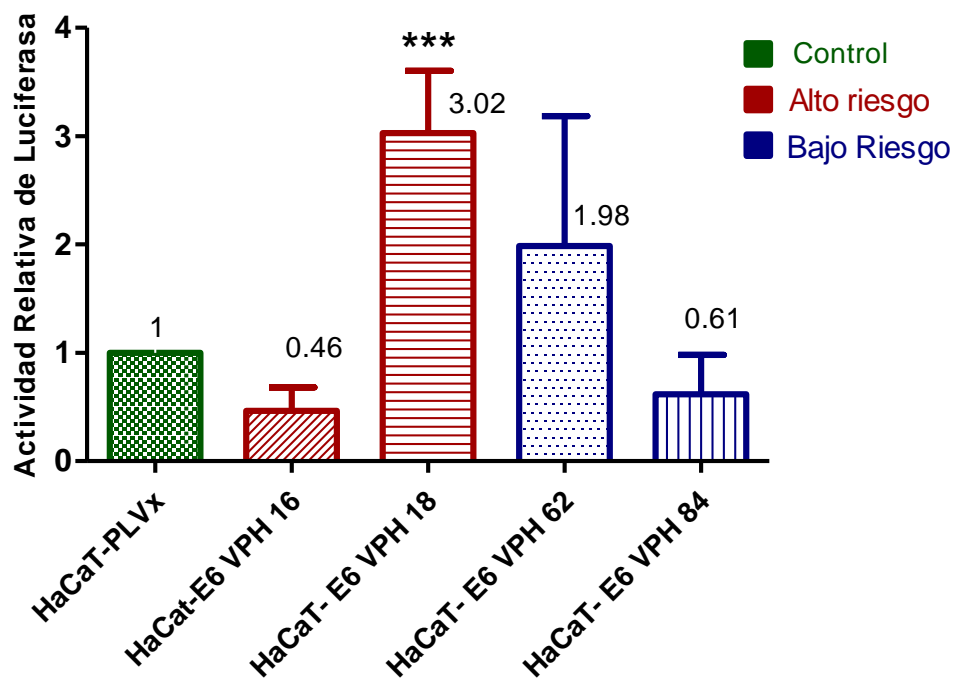


Figura 17. Actividad de luciferasa de la construcción de pGL4-123P1 en presencia de diferentes genotipos de VPH de alto y bajo riesgo. Los ensayos fueron realizados por triplicado y se muestran los valores de la media de cada grupo (n=3). Se realizó One Way ANOVA y posterior análisis de Dunnet. Se tomó un valor $P < 0.05$, utilizando el software GraphPad Prism 5.

Evaluación de la actividad de pGL4-123P1 Δ c-Myc en presencia de E6 de diferentes genotipos de VPH de alto y bajo riesgo en un modelo de transfección estable.

Se realizó una transfección transitoria de la construcción pGL4-123P1 Δ c-myc en la línea celular HaCaT transfectada de manera estable con el marco de lectura abierto de E6 de diferentes genotipos. Se normalizaron los datos con HaCaT-PLVx, que se tomó como control y se le asignó el valor de 1. Se observa que E6 VPH 18 y 62 aumentan la actividad del fragmento del promotor 3.8 y 2.5 veces, respectivamente al compararlo con el control. Por otro lado, E6 VPH 16 y 84 no modifican la actividad del promotor (Figura 18).

Actividad relativa de luciferasa de PGL4-123P1 Δ c-Myc en presencia de E6 de genotipos de alto y bajo riesgo.

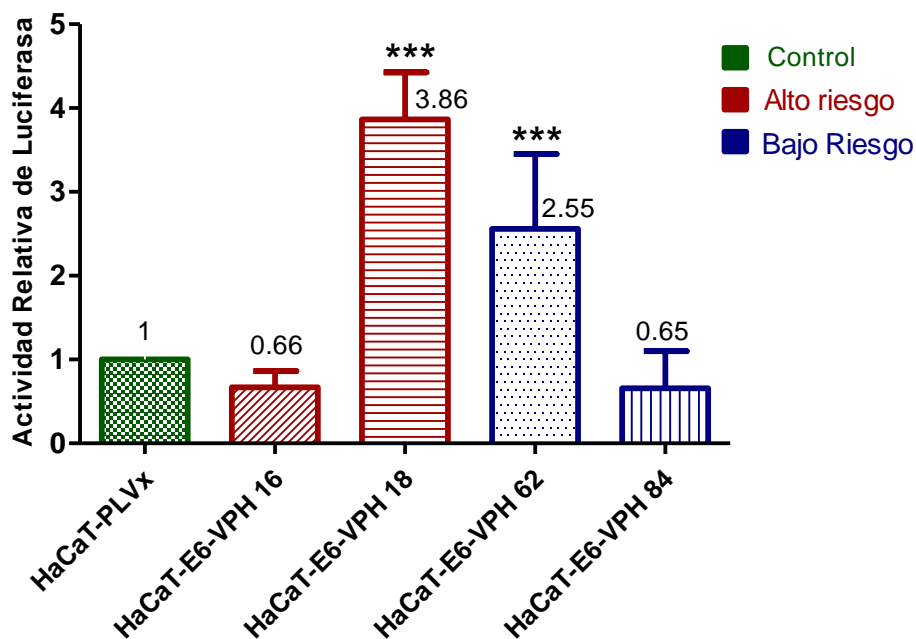


Figura 18. Actividad de luciferasa de pGL4-123 Δ c-myc en presencia de diferentes genotipos de VPH de alto y bajo riesgo. Los ensayos fueron realizados por triplicado y se muestran los valores de la media de cada grupo (n=3). Se realizó One Way ANOVA y posterior análisis de Dunnet. Se tomó un valor $P < 0.05$, utilizando el software GraphPad Prism 5.

Búsqueda de factores de transcripción

De acuerdo con los resultados obtenidos, observamos que el promotor completo y el fragmento de 123 pb con el sitio de unión a c-Myc en la posición +4 a +10 mutado y sin mutar, modifican su actividad de la misma manera en presencia de E6, lo que sugiere que el efecto de E6 no es a través de este sitio. Es por ello que se realizó un nuevo análisis *in silico* del fragmento del promotor de 123 pb para identificar sitios de unión no reportados previamente por Milflores en 2012.

El programa identificó diferentes sitios de unión a factores de transcripción. La localización de estos sitios se muestra en la Figura 19.

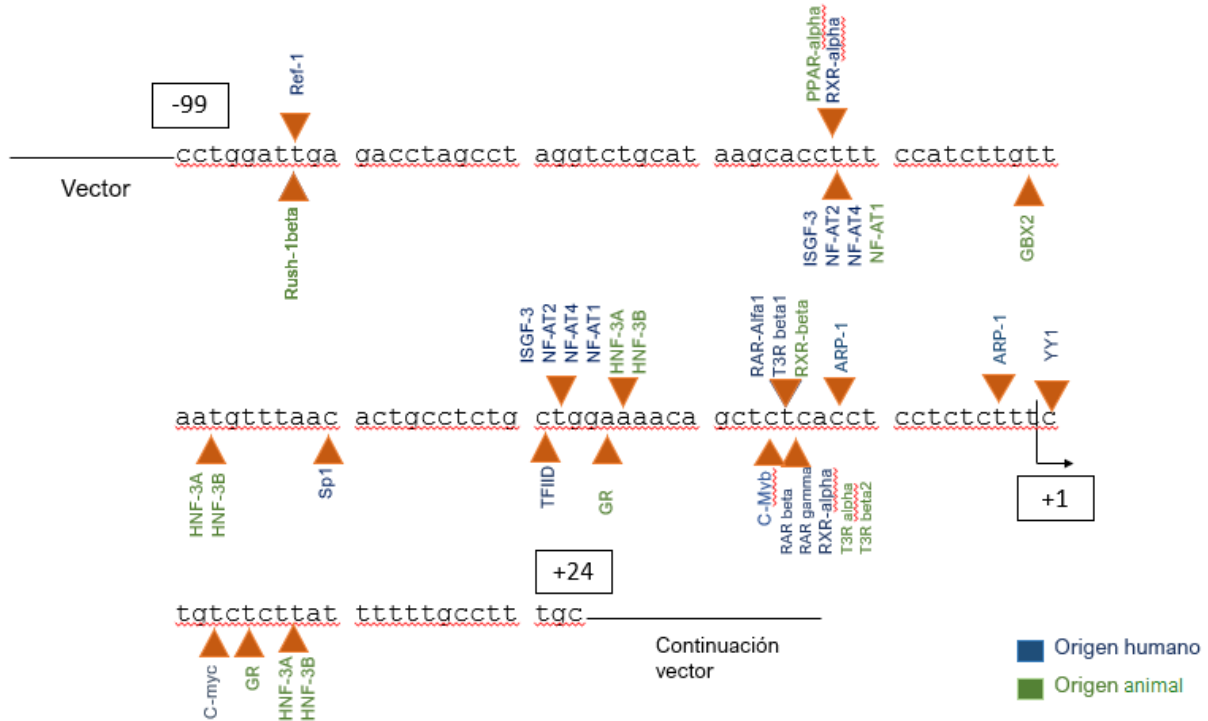


Figura 19. Representación esquemática de los sitios de unión a factores de transcripción encontrados en el fragmento 123 pb del promotor P1 del gen *ST6GAL1*. Se muestran la secuencia del fragmento de 123 pb y los diferentes sitios de unión a factores de transcripción, clasificados en origen humano y animal. Los triángulos naranjas indican el sitio de unión. Los números dentro de las cajas indican la posición del fragmento 123 pb respecto al sitio de inicio de la transcripción. La flecha negra indica el sitio de inicio de la transcripción.

Además del sitio Sp1 que se había reportado anteriormente, se encontraron nuevos sitios de unión a: receptores de ácido retinoico, a TFIIID, c-myc, YY1, NF-AT2 y 4,

ISGF3 y ARP1. Algunas de sus funciones y las vías en las que participan se describen en la Tabla 6. Por lo tanto, este fragmento del promotor contiene múltiples sitios a los que diferentes factores de transcripción pueden unirse y regularlo.

Tabla 6. Descripción de los factores de transcripción que pueden unirse a los sitios de unión localizados en el fragmento de 123 pb de promotor P1 del gen *ST6GAL1*.

| Factor de transcripción | Función | Referencia |
|---|---|--|
| Ref-1 | Reparación del ADN y la regulación redox de los factores transcripcionales. | Fritz & Kaina, 1999 |
| RXR alpha | Receptor para el ácido retinoico que actúa como factor de transcripción. Forma homo o heterodímeros con receptores de ácido retinoico (RAR) y se une a los elementos de respuesta objetivo en respuesta a sus ligandos | Tsutsumi et al., 2002 Harish et al., 2000 |
| ISGF-3 Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta | Transductor de señal y activador de la transcripción que media las respuestas celulares a los interferones (IFN) | Chen et al., 2017 |
| NF-AT2 Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1 | Desempeña un papel en la expresión inducible de genes de citoquinas en células T, especialmente en la inducción de la transcripción del gen IL-2 o IL-4. | Chuvpilo et al., 1999 |
| NF-AT4 Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 3 | Participa en la inducción de genes de citocina en células T, especialmente en la inducción de IL-2 | Li et al., 2008. |
| Sp1 Transcription factor Sp1 isoform a | Factor de transcripción que puede activar o reprimir la transcripción en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos. Se une con alta afinidad a motivos ricos en GC y regula la expresión de una gran cantidad de genes involucrados el crecimiento celular, la apoptosis, la diferenciación y la respuesta inmune. | Suske, 1999 |
| TIIFD Transcription initiation factor TFIID | Complejo proteico multimérico que desempeña un papel central en la mediación de las respuestas del promotor a varios activadores y represores. | Shao et al., 2004 |

Tabla 6. Descripción de los factores de transcripción que pueden unirse a los sitios de unión localizados en el fragmento de 123 pb de promotor P1 del gen *ST6GAL1* (continuación)

| Factor de transcripción | Función | Referencia |
|---|--|---|
| RAR-Alpha1 retinoic acid receptor alpha isoform X1 | Receptor para el ácido retinoico. Los receptores de ácido retinoico se unen como heterodímeros a sus elementos de respuesta diana en respuesta a sus ligandos, ácido retinoico todo-trans o 9-cis, y regulan la expresión génica en diversos procesos biológicos. Los heterodímeros RXR / RAR se unen a los elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE) compuestos por sitios en tándem 5'-AGGTCA-3' conocidos como DR1-DR5. En ausencia o presencia de ligando hormonal, actúa principalmente como un activador de la expresión génica debido a la débil unión a los corepresores | Hauksdottir, Farboud & Privalsky, 2003. |
| RAR-beta Retinoic acid receptor beta isoform 1 | | |
| RAR-gamma Retinoic acid receptor gamma | | |
| c-myb Transcriptional activator Myb | Activador transcripcional, que puede unirse a DNA. Juega un papel importante en el control de la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas. | Vaquerizas et al., 2009 |
| ARP-1 Apolipoprotein A-I regulatory protein 1 | Factor de transcripción activado por ligando. Activado por altas concentraciones de ácido 9-cis-retinoico | Kruse et al., 2008 |
| YY1 Transcriptional repressor protein YY1 | Factor de transcripción multifuncional que exhibe control positivo y negativo en una gran cantidad de genes celulares y virales al unirse a sitios que se superponen al sitio de inicio de la transcripción. Se une a la secuencia de consenso 5'-CCGCCATNTT-3'. El efecto sobre la regulación de la transcripción depende del contexto en el que se une y diversos mecanismos de acción incluyen activación o represión directa, activación o represión indirecta a través del reclutamiento de cofactores, o activación o represión por interrupción de sitios de unión o cambios de ADN conformacional. | Shi, Seto, Chang & Shenk, 1991 Deng et al., 2010 |
| c-myc Myc proto-oncogene protein | Factor de transcripción que se une al ADN de una manera no específica, pero también reconoce específicamente la secuencia central 5'-CAC [GA] TG-3'. Activa la transcripción de genes relacionados con el crecimiento. Se une al promotor VEGFA, promoviendo la producción de VEGFA y la posterior angiogénesis | Shi et al., 2014 |

CAPITULO IV

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Durante la transformación maligna de las células se han descrito cambios en la glicosilación (Pinho & Reis, 2015). Estos cambios pueden deberse a modificación en la expresión de enzimas como glicosiltransferasas, que pueden ser consecuencia de una desregulación a nivel transcripcional (Kannagi et al., 2008). El agente etiológico del CaCu es el VPH, la oncoproteína viral E6, es una de las responsables de la transformación maligna de la célula. En este trabajo, investigamos si la oncoproteína E6, modifica la actividad del promotor P1 del gen *ST6GAL1*, cuyos niveles de ARNm se encuentran elevados en lesiones premalignas de cuello uterino y en CaCu (López et al., 2009; Wang *et al.*, 2003).

En primer lugar, evaluamos la actividad el promotor completo (pGL4-1137P1) y del fragmento de 123 pb (pGL4-123P1) en la línea celular HaCaT mediante ensayos de transfección transitoria. Observamos que la actividad de pGL4-123P1 es alrededor de 30 veces mayor que la actividad del promotor completo (Figura 11). En un estudio previo de Milflores et al, 2012 se evaluó la actividad de ambas construcciones en líneas celulares HepG2 (de origen hepático) y C33A (de carcinoma de cérvix), obteniendo una actividad para la construcción pGL4-123P1 de 2.5 y 6 veces mayor, respectivamente, al comparar con la actividad del promotor completo. Una posible explicación es que, en el fragmento de 1000 pb, se eliminaron sitios de unión a factores de transcripción que pueden actuar como represores, por ejemplo, YY1, que se ha reportado que puede actuar como represor (Deng et al., 2010) y también es capaz de inducir cambios conformacionales en el ADN al evitar la unión de otros factores de transcripción (Furlong, Rein & Martin, 1996). La diferencia en el número de veces que aumenta la actividad entre cada línea celular puede ser resultado de diferencias en la expresión de factores de transcripción entre las líneas celulares estudiadas. La diferencia en las actividades del promotor completo con respecto al truncado es muy grande en la línea celular HaCaT, aunque presenta el mismo comportamiento que lo observado en las líneas celulares HepG2 y C33A.

Posteriormente, evaluamos la actividad de las construcciones del promotor completo y el fragmento de 123 pb con mutación en el sitio c-Myc de la posición +4 a +10 (Construcciones pGL4-1137P1 Δ c-Myc y pGL4-123P1 Δ c-Myc) y comparamos su actividad con la de las construcciones sin mutar (Figura 12). Observamos que la mutación en el sitio c-myc del promotor completo no genera cambios significativos en la actividad, sin embargo, en pGL4-123P1 Δ c-Myc se observa una disminución de actividad alrededor de 10 veces en comparación con el fragmento sin mutar. En la construcción con el promotor completo la actividad es mucho más baja que en la construcción de 123 pb, quizás esta alta actividad permita detectar el efecto de la mutación en c-myc, que no es posible observar cuando se muta este sitio en el promotor completo, ya que finalmente la actividad de ambas mutantes es semejante a la del promotor completo. En el trabajo de Milflores et al., 2012 se observó este mismo comportamiento en las células C33A derivadas de carcinoma de cérvix, pero no se observó en las células hepáticas HepG2, donde la actividad del fragmento 123 pb con y sin la mutación del sitio c-myc, es similar en ambos. Esto nos indica que la regulación del promotor es diferente en cada línea celular, y que depende de los factores de transcripción presentes en cada una.

Se ha reportado que la oncoproteína E6 de VPH puede inducir cambios en la expresión génica a través de su actividad sobre promotores. Se ha observado que E6 aumenta la transcripción del gen *hTERT*, que codifica para la subunidad catalítica de la telomerasa, y lo hace a través del aumento en la actividad del promotor de dicho gen (Veldman *et al*, 2003). Con este antecedente, quisimos ver si E6 ejercía un efecto sobre la actividad del promotor P1 del gen *ST6GAL1*. Para ello, se realizaron transfecciones transitorias de la construcción pGL4-1137P1 y de pGL4-123P1 co-transfectando con pcDNA neg ó con pcDNA-E6 (VPH 16). Obtuvimos que en pGL4-1137P1 la actividad se anuló por completo en presencia de E6, mientras que en pGL4-123P1 la actividad disminuyó 4 veces, lo que nos sugiere que E6 está ejerciendo un efecto negativo en la actividad del promotor (Figura 13). En ambas construcciones se observa que E6 disminuye la actividad, por lo que el efecto de la oncoproteína debe ejercerse a través de la región de 123 pb (Figura 13) . La actividad del promotor completo se vuelve nula en presencia de E6, quizás porque la actividad del promotor completo es mucho más

baja que en el fragmento de 123 pb, y no permite visualizar un efecto de manera tan evidente como en la construcción de 123 pb, donde la actividad es muy alta.

Existen antecedentes que señalan que la oncoproteína E6 puede tener un efecto represor sobre algunos promotores. En un trabajo previo de Monterrosas en 2018, se observó que las proteínas virales E6 y E7 ejercen un efecto negativo sobre el promotor V2 del gen *ST3GAL4*. De igual forma E6 reprime el promotor de E-cadherina y se sugiere que esta represión es causada por metilación en el promotor mediante DNMT, sin embargo, el mecanismo no está descrito completamente. Por lo tanto, podemos especular que la represión mediada por E6, también se lleve a cabo por metilación en el promotor.

Un punto importante a mencionar que la actividad del fragmento de 123 pb aumenta casi 30 veces en comparación con el promotor completo. Sin embargo, cuando se co-transfecta el fragmento de 123 pb junto con pcDNA neg, y lo comparamos con el promotor completo co-transfectado con pcDNA neg, el fragmento de 123 pb tiene mayor actividad que el completo, pero no en la misma magnitud, ya que solo aumenta en 1 vez, y no 30 veces como las transfecciones sin pcDNA neg. Esto nos indica que el pcDNA neg está ejerciendo un efecto sobre la actividad del promotor, la cual no hemos podido explicar. Esto podría ser resultado de un problema al co-transfectar una mayor cantidad de plásmido, y que de alguna manera interfiriera con la entrada del DNA, sin embargo, consideramos esto y modificamos las condiciones de transfección y el efecto seguía observándose.

Se sabe que E6 puede interaccionar con la proteína c-Myc y potenciar al promotor de *hTERT* e incrementar la actividad de telomerasa (Veldman et al., 2013; Zhang et al., 2017). El promotor P1 de *ST6GAL1* contiene tres sitios de unión a c-Myc, por lo que nos llevó a preguntarnos si estos sitios participan en la regulación de dicho promotor en presencia de E6. Para ello, co-transfectamos de manera transitoria el promotor completo que contiene 2 sitios c-myc sin mutar y una mutación en el sitio +4 a +10 (pGL4-1137P1Δc-myc) y el fragmento del promotor de 123 pb que sólo contiene un sitio c-Myc mutado +4 a +10 (pGL4-123P1Δc-myc). Ambas construcciones fueron co-transfectadas con pcDNA neg ó pcDNA-E6. Nuestros resultados arrojaron que E6 tiene

un efecto negativo sobre la actividad de ambas construcciones del promotor, ya que, en presencia de E6, la actividad prácticamente se anula. Esto nos sugiere que independientemente de la presencia o ausencia del sitio de unión, la actividad se reprime, por lo que llegamos a la conclusión de que c-Myc no participa en la regulación de este promotor, sin embargo, E6 podría estar interactuando con otros factores de transcripción que regulen la actividad (Figura 14).

Ante estos resultados, propusimos investigar que otros factores de transcripción pueden unirse a este promotor en la región de 123 pb. Milflores-Flores et al., 2012 identificaron un sitio de unión a HNF1, (-44), un sitio de unión TFIID (-8) y un sitio de unión a Sp1 en la posición -32, un sitio c-Myc en +4, y dado que los programas y softwares para buscar sitios de unión están en constante actualización, volvimos a realizar otro análisis. Encontramos 14 sitios de unión a factores de transcripción de origen humano que están involucrados en respuesta inmune (ISGF-3, NF-AT2, NF-AT4), receptores de ácido retinoico (RXR alpha, RAR-Alpha1, RAR-beta, RAR-gamma, ARP-1) y transcripción (Ref-1, Sp1, TIIFD, c-myb, YY1, c-Myc).

Sin embargo, algunos de estos sitios donde se unen factores de transcripción como los involucrados en respuesta inmune o los receptores de ácido retinoico no tendrían efecto en la actividad de este promotor, dado que en nuestros ensayos experimentales no incubamos con moléculas que se unan a estos factores de transcripción o activen vías en las que están involucrados. Sin embargo, se podría evaluar el efecto de estos sitios en la regulación de este promotor para trabajos posteriores.

Por otro lado, existen otros sitios de unión que son reconocidos por factores de transcripción que pueden estar siendo modulados por E6. Un factor de transcripción que interacciona con E6 es Sp1. Se sabe que la acción combinada de Sp1 y c-Myc con E6, es la responsable de la inducción del gen *hTERT*, aumentando la actividad de la telomerasa (Kyo et al., 2000; Oh, Kyo, & Laimins, 2001). E6 VPH 16 es capaz de transactivar otros promotores, como el de VEGF a través de sitios de unión a Sp1 (López-Ocejo et al., 2000). Estos resultados se enfocan en la activación de la expresión génica, sin embargo, nosotros estamos obteniendo el efecto contrario, por lo que queda abierta la interrogante de a través de que mecanismo o vía E6 ejerce un efecto negativo

sobre la actividad del promotor P1 del gen *ST6GAL1*. Una propuesta, sería evaluar la actividad del promotor en presencia de E6 y realizar mutaciones en el sitio de unión a Sp1.

Posteriormente, evaluamos la actividad de las diferentes versiones del promotor en un sistema de transfección estable, utilizando la línea celular HaCaT cuyo genoma tiene integrado el marco de lectura abierto para E6 de diferentes genotipos de VPH de alto (16 y 18) y bajo riesgo (62 y 84). Se transfectaron de manera transitoria las diferentes construcciones del promotor y de acuerdo a los resultados obtenidos, encontramos que sólo E6 VPH 18 aumentó la actividad del promotor en todas sus versiones, lo que nos sugiere que, en estas condiciones, la regulación del promotor también es independiente de c-Myc.

Al analizar el efecto de E6 VPH 16 transfectado de manera estable, observamos que tiene una tendencia a disminuir la actividad del promotor (excepto en pGL4-1137P1 Δ c-myc, donde la actividad es similar al control), aunque no es estadísticamente significativa. Este es un efecto que también se obtuvo en las transfecciones transitorias, donde se observa que E6 disminuye la actividad del promotor, pero de una manera más drástica, lo que sugiere que E6 VPH16 reprime la actividad del promotor independientemente si se encuentra integrado en el genoma.

Al realizar un análisis de resultados, encontramos que E6 VPH 62 (bajo riesgo) también tiende a aumentar la actividad del promotor completo y el fragmento 123 pb, pero su aumento solo es estadísticamente significativo en las versiones mutadas en c-Myc.

La integración de E6 en el genoma de la célula provoca que siempre se esté expresando, lo que podría sugerir que hay E6 suficiente para provocar cambios en la actividad del promotor. Se ha reportado que la integración de E6 al genoma de la célula puede inducir modificaciones epigenéticas. La regulación positiva de las metiltransferasas de ADN por las oncoproteínas del VPH puede contribuir a un aumento de la metilación del ADN del genoma del huésped y la inhibición de la transcripción de genes supresores de tumores. Los datos recientes demuestran que los mecanismos epigenéticos juegan un papel esencial en la regulación de la expresión

génica viral tanto del ADN del VPH episomal como integrado (Durzynska, Lesniewicz & Poreba, 2017).

VPH 18 y VPH 62 forman parte del género *Alfapapillomavirus*, pero pertenecen a especies diferentes ($\alpha 7$ y $\alpha 3$, respectivamente), por lo que se encuentran filogenéticamente alejados; también pertenecen a grupos de riesgo oncogénico diferente (alto y bajo riesgo, respectivamente). Sin embargo, la oncoproteína E6 de ambos genotipos modifica la actividad del promotor P1 del gen *ST6GAL1*, y esto puede deberse a que los dos pueden interaccionar con ciertos factores de transcripción en común. En el trabajo previo de Caporal Hernández de 2019, se reporta que E6 de VPH 18 y 62 comparten tres motivos dentro de su estructura: sitio de unión a proteína 14-3-3, motivo FxDxF y motivo de unión a APC, lo que nos hace pensar que es a través de estas regiones estructurales estén interactuando con proteínas celulares en común y puedan regular la actividad del promotor P1 del gen *ST6GAL1*.

Se ha reportado que, en muestras de cáncer cervical, VPH 62 se encuentra en coinfecciones con al menos un tipo de alto riesgo (Artaza-Irigaray et al., 2017), por lo que las oncoproteínas E6 de estos genotipos podrían incrementar *in vivo* la expresión del gen *ST6GAL1* y como consecuencia aumentar la presencia de ácido siálico en el epitelio positivo a estos genotipos virales.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

La oncoproteína E6 del VPH 16 disminuye la actividad del promotor P1 del gen *ST6GAL1*.

Los elementos de respuesta a c-myc no están implicados en la regulación del promotor P1 del gen *ST6GAL1*, sin embargo, Sp1 podría estar modulando su actividad. Los resultados obtenidos no permiten concluir si E6 ejerce un efecto sobre la actividad del promotor a través de la interacción con algún factor de transcripción, ya que E6 podría modificar su actividad a través de otros mecanismos.

La oncoproteína E6 VPH 18 incrementa la actividad del promotor P1 del gen *ST6GAL1*, este comportamiento se observa para la E6 de VPH 62, lo que sugiere que, durante una infección viral con ciertos genotipos de VPH, la proteína E6 podría tener un efecto positivo sobre la expresión del gen *ST6GAL1* y en consecuencia un aumento en la α 2,6 sialilación que se ha reportado para este tipo de cáncer.

CAPÍTULO VI

PERSPECTIVAS

1. Evaluar el efecto de E6 sobre promotor P1 en condiciones donde estén presentes moléculas que activen a los factores de transcripción que puedan unirse a los sitios identificados en el fragmento de 123 pb.
2. Evaluar el efecto de E6 sobre el promotor P1 con mutación en sitio Sp1 (-32) para determinar si este elemento de respuesta participar en la regulación de dicho promotor.
3. Realizar análisis *in silico* de interacción proteína-proteína de E6 con los factores de transcripción localizados en la región 123 pb del promotor P1 del gen *ST6GAL1*.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Aas-Eng, D. A., Åsheim, H. C., Deggerdal, A., Smeland, E., & Funderud, S. (1995). Characterization of a promoter region supporting transcription of a novel human β -galactoside α -2,6-sialyltransferase transcript in HepG2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1261(1), 166–169. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(94\)00250-7](https://doi.org/10.1016/0167-4781(94)00250-7)
- 2) Aasheim, H., Aas-Eng, D. A., Deggerdal, A., Blomhoff, H. K., Funderud, S., & Smeland, E. B. (1993). Cell-specific expression of human beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase transcripts differing in the 5' untranslated region. *European Journal of Biochemistry*, 213(1), 467–475. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17783.x>
- 3) Aco-Tlachi, M., Carreño-López, R., Martínez-Morales, P. L., Maycotte, P., Aguilar-Lemarroy, A., Jave-Suárez, L. F., . . . Vallejo-Ruiz, V. (2018). Glycogene expression profiles based on microarray data from cervical carcinoma HeLa cells with partially silenced E6 and E7 HPV oncogenes. *Infectious Agents and Cancer*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13027-018-0197-2>
- 4) Aguilar-Lemarroy, A., Vallejo-Ruiz, V., Cortés-Gutiérrez, E., Salgado-Bernabé, M., Ramos-González, N., & Ortega-Cervantes, L. et al. (2015). Human papillomavirus infections in Mexican women with normal cytology, precancerous lesions, and cervical cancer: Type-specific prevalence and HPV coinfections. *Journal Of Medical Virology*, 87(5), 871-884. doi: 10.1002/jmv.24099
- 5) Ambrosini, G., Adida, C., & Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Medicine*, 3(8), 917–921. <https://doi.org/10.1038/nm0897-917>
- 6) Androphy, E., Lowy, D., & Schiller, J. (1987). Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature*, 325(6099), 70-73. doi: 10.1038/325070a0
- 7) Ansari, T., Brimer, N., & Vande Pol, S. B. (2012). Peptide interactions stabilize and restructure human papillomavirus type 16 E6 to interact with p53. *Journal of virology*, 86(20), 11386–11391. doi:10.1128/JVI.01236-12
- 8) Artaza-Irigaray, C., Flores-Miramontes, M. G., Olszewski, D., Magaña-Torres, M. T., López-Cardona, M. G., Leal-Herrera, Y. A., . . . Aguilar-Lemarroy, A. (2017). Genetic variability in E6, E7 and L1 genes of Human Papillomavirus 62 and its prevalence in Mexico. *Infectious agents and cancer*, 12, 15. doi:10.1186/s13027-017-0125-x
- 9) Bassagañas, S. (2014). *Regulation and function of silayltransferases in pancreatic cancer* (Doctorado). Universitat de Girona.
- 10) Bernard, H. U. (2002). Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approach. *Antiviral Therapy*, 7(4), 219–237. Recuperado de <https://www.intmedpress.com/serveFile.cfm?sUID=41131f33-5cd9-49c2-ba05-261ff9360a5a>
- 11) Bernard, H., Burk, R., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H., & de Villiers, E. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401(1), 70-79. doi: 10.1016/j.virol.2010.02.002

- 12) Borbely, A. A., Murvai, M., Kónya, J., Beck, Z., Gergely, L., Li, F., & Veress, G. (2006). Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *Journal of General Virology*, 87(2), 287–294. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81067-0>
- 13) Bosch, F., & de Sanjosé, S. (2007). The Epidemiology of Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer. *Disease Markers*, 23(4), 213-227. doi: 10.1155/2007/914823
- 14) Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- 15) Bull, C., Boltje, T. J., Wassink, M., De Graaf, A. M. A., Van Delft, F. L., Den Brok, M. H., & Adema, G. J. (2013). Targeting Aberrant Sialylation in Cancer Cells Using a Fluorinated Sialic Acid Analog Impairs Adhesion, Migration, and In Vivo Tumor Growth. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(10), 1935–1946. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-13-0279>
- 16) Caporal Hernández, L. (2019). *Análisis de la expresión de glicogenes modulados por la oncoproteína E6 del Virus de VPH de alto y bajo riesgo* (Maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- 17) Carreras, R., Xercavins, J., & Checa, M. A. (2007). *Virus del papiloma humano y cáncer de cuello de útero*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- 18) Chen, K., Liu, J., Liu, S., Xia, M., Zhang, X., Han, D., . . . Cao, X. (2017). Methyltransferase SETD2-Mediated Methylation of STAT1 Is Critical for Interferon Antiviral Activity. *Cell*, 170(3), 492–506. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.042>
- 19) Christie, D. R., Shaikh, F. M., Lucas, J. A., Lucas, J. A., & Bellis, S. L. (2008). ST6Gal-I expression in ovarian cancer cells promotes an invasive phenotype by altering integrin glycosylation and function. *Journal of Ovarian Research*, 1(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-1-3>
- 20) Chuvpilo, S., Avots, A., Berberich-Siebelt, F., Glöckner, J., Fischer, C., Kerstan, A., Escher, C., Inashkina, I., Hlubek, F., Jankevics, E., Brabletz, T. & Serfling, E. (1999). Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *Journal of Immunology* 162(12):7294-7301.
- 21) Conway, M., & Meyers, C. (2009). Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. *Journal of Dental Research*, 88(4), 307–317. <https://doi.org/10.1177/0022034509333446>
- 22) Dall'olio F. (1996). Protein glycosylation in cancer biology: an overview. *Clinical molecular pathology*, 49(3), M126–M135. doi:10.1136/mp.49.3.m126
- 23) D'Costa, Z. J., Jolly, C., Androphy, E. J., Mercer, A., Matthews, C. M., & Hibma, M. H. (2012). Transcriptional repression of E-cadherin by human papillomavirus type 16 E6. *PloS one*, 7(11), e48954. doi:10.1371/journal.pone.0048954
- 24) De Sanjose, S., Quint, W. G., Alemany, L., Geraets, D. T., Klaustermeier, J. E., Lloveras, B., . . . Bosch, F. X. (2010). Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet Oncology*, 11(11), 1048–1056. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(10\)70230-8](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(10)70230-8)

- 25) de Villiers, E., Fauquet, C., Broker, T., Bernard, H., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17-27. doi: 10.1016/j.virol.2004.03.033
- 26) Deng, Z., Cao, P., Wan, M. M., & Sui, G. (2010). Yin Yang 1: a multifaceted protein beyond a transcription factor. *Transcription*, 1(2), 81–84. doi:10.4161/trns.1.2.12375
- 27) Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I., Stoler, M., Broker, T., & Stanley, M. (2012). The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*, 30, F55-F70. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.083
- 28) Dougherty, M. K., & Morrison, D. K. (2004). Unlocking the code of 14-3-3. *Journal of Cell Science*, 117(10), 1875–1884. <https://doi.org/10.1242/jcs.01171>
- 29) Durzynska, J., Lesniewicz, K., & Poreba, E. (2017). Human papillomaviruses in epigenetic regulations. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 772, 36–50. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.09.006>
- 30) Esko, J. D., & Selleck, S. B. (2002). Order Out of Chaos: Assembly of Ligand Binding Sites in Heparan Sulfate. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 435–471. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135458>
- 31) Fernandes, J. V., & De Medeiros Fernandes, T. A. (2012). Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis. In D. V. Broeck (Ed.), *Human Papillomavirus and Related Diseases From Bench to Bedside - A Clinical Perspective* (pp. 3–40). Recuperado de <https://www.intechopen.com/books/human-papillomavirus-and-related-diseases-from-bench-to-bedside-a-clinical-perspective/human-papillomavirus-biology-and-pathogenesis>
- 32) Fields, B., Knipe, D., & Howley, P. (2013). *Fields virology* (6th ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- 33) Flores-Miramontes, M., Torres-Reyes, L., Aguilar-Lemarroy, A., Vallejo-Ruiz, V., Piña-Sánchez, P., Cortés-Gutiérrez, E., Reyes-Leyva, J., & Jave-Suárez, L. (2015). Prevalencia de genotipos de VPH en México y en el mundo detectados mediante linear array. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(Supl 2), s122-s130. Recuperado de http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revista_medica/article/view/179
- 34) Fritz, G., & Kaina, B. (1999). Phosphorylation of the DNA repair protein APE/REF-1 by CKII affects redox regulation of AP-1. *Oncogene*, 18(4), 1033–1040. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202394>
- 35) Fukasawa, T., Asao, T., Yamauchi, H., Ide, M., Tabe, Y., Fujii, T., Kuwano, H. (2013). Associated expression of α 2,3sialylated type 2 chain structures with lymph node metastasis in distal colorectal cancer. *Surgery Today*, 43(2), 155–162. <https://doi.org/10.1007/s00595-012-0141-9>
- 36) Furlong, E. E., Rein, T., & Martin, F. (1996). YY1 and NF1 both activate the human p53 promoter by alternatively binding to a composite element, and YY1 and E1A cooperate to amplify p53 promoter activity. *Molecular and cellular biology*, 16(10), 5933–5945. doi:10.1128/mcb.16.10.5933
- 37) Fuster, M. M., & Esko, J. D. (2005). The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, 5(7), 526–542. <https://doi.org/10.1038/nrc1649>
- 38) Geremia, R. A., Harduin-Lepers, A., & Delannoy, P. (1997). Identification of two novel conserved amino acid residues in eukaryotic sialyltransferases: implications for their mechanism of action. *Glycobiology*, 7(2), 161. <https://doi.org/10.1093/glycob/7.2.161>

- 39) Giannaki, M., Kakourou, T., Theodoridou, M., Syriopoulou, V., Kabouris, M., Louizou, E., & Chrousos, G. (2013). Human Papillomavirus (HPV) Genotyping of Cutaneous Warts in Greek Children. *Pediatric Dermatology*, 30(6), 730–735. <https://doi.org/10.1111/pde.12113>
- 40) Grassmann, K., Rapp, B., Maschek, H., Petry, K. U., & Iftner, T. (1996). Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *Journal of virology*, 70(4), 2339–2349.
- 41) Harduin-Lepers, A., Krzewinski-Recchi, M. A., Colomb, F., Foulquier, F., Groux-Degroote, S., & Delannoy, P. (2012). Sialyltransferases functions in cancers. *Frontiers in Bioscience*, E4(1), 499–515. <https://doi.org/10.2741/e396>
- 42) Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M., Samyn-Petit, B., Julien, S., & Delannoy, P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie*, 83(8), 727–737. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(01\)01301-3](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(01)01301-3)
- 43) Harish, S., Ashok, M., Khanam, T., & Rangarajan, P. (2000). Serine 27, a Human Retinoid X Receptor α Residue, Phosphorylated by Protein Kinase A Is Essential for CyclicAMP-Mediated Downregulation of RXR α Function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(3), 853–857. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4043>
- 44) Harper, J. W., Elledge, S. J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L. H., Zhang, P., . . . Swindell, E. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21.. *Molecular Biology of the Cell*, 6(4), 387–400. <https://doi.org/10.1091/mbc.6.4.387>
- 45) Hauksdottir, H., Farboud, B., & Privalsky, M. L. (2003). Retinoic Acid Receptors β and γ Do Not Repress, But Instead Activate Target Gene Transcription in Both the Absence and Presence of Hormone Ligand. *Molecular Endocrinology*, 17(3), 373–385. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0340>
- 46) Howie, H. L., Katzenellenbogen, R. A., & Galloway, D. A. (2009). Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, 384(2), 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.017>
- 47) Howley, P. M., & Lowy, D. R. (2007). Papillomaviruses. In D. M. Knipe, & P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (pp. 2299–2354). Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- 48) Huibregtse, J. M., Scheffner, M., & Howley, P. M. (1993). Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 13(8), 4918–4927. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.8.4918>
- 49) IARC Global Cancer Observatory. (2018). Global Cancer Observatory. Recuperado 25 mayo, 2019, de <http://gco.iarc.fr/>
- 50) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Human Papillomaviruses. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2007. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 90.) Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK321760/>

- 51) Jeanneau, C., Chazalet, V., Augé, C., Soumpasis, D. M., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., . . . Breton, C. (2004). Structure-Function Analysis of the Human Sialyltransferase ST3Gal I. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 13461–13468. <https://doi.org/10.1074/jbc.m311764200>
- 52) Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A., & Sakai, H. (2012). Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Frontiers in microbiology*, 3, 152. doi:10.3389/fmicb.2012.00152
- 53) Kannagi, R., Yin, J., Miyazaki, K., & Izawa, M. (2008). Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants—Hakomori's concepts revisited. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780(3), 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.10.007>
- 54) Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Craig, R. W. (1991). Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. *Cancer Research*, 51(23 Pt 1), 6304–6311. Recuperado de https://cancerres.aacrjournals.org/content/51/23_Part_1/6304
- 55) Kinoshita, T., Shirasawa, H., Shino, Y., Moriya, H., Desbarats, L., Eilers, M., & Simizu, B. (1997). Transactivation of Prothymosin α and c-myc Promoters by Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein. *Virology*, 232(1), 53–61. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8536>
- 56) Kiyono, T., Hiraiwa, A., Fujita, M., Hayashi, Y., Akiyama, T., & Ishibashi, M. (1997). Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), 11612–11616. doi:10.1073/pnas.94.21.11612
- 57) Klingelhutz, A. J., Foster, S. A., & McDougall, J. K. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 380(6569), 79–82. <https://doi.org/10.1038/380079a0>
- 58) Kruse, S. W., Suino-Powell, K., Zhou, X. E., Kretschman, J. E., Reynolds, R., Vorrhein, C., . . . Xu, H. E. (2008). Identification of COUP-TFII orphan nuclear receptor as a retinoic acid-activated receptor. *PLoS biology*, 6(9), e227. doi:10.1371/journal.pbio.0060227
- 59) Kyo, S., Takakura, M., Taira, T., Kanaya, T., Itoh, H., Yutsudo, M., . . . Inoue, M. (2000). Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic acids research*, 28(3), 669–677. doi:10.1093/nar/28.3.669
- 60) Lee, S. S., Glaunsinger, B., Mantovani, F., Banks, L., & Javier, R. T. (2000). Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *Journal of virology*, 74(20), 9680–9693. doi:10.1128/jvi.74.20.9680-9693.2000
- 61) Li, G., Zhang, X., Li, R., Wang, Y., Wang, Y., Han, K., . . . Zhang, Y. (2008). CHP2 Activates the Calcineurin/Nuclear Factor of Activated T Cells Signaling Pathway and Enhances the Oncogenic Potential of HEK293 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32660–32668. <https://doi.org/10.1074/jbc.m806684200>
- 62) Li, M., Beard, P., Estes, P. A., Lyon, M. K., & Garcea, R. L. (1998). Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *Journal of virology*, 72(3), 2160–2167.

- 63) Liu, X., Yuan, H., Fu, B., Disbrow, G. L., Apolinario, T., Tomaić, V., . . . Schlegel, R. (2005). The E6AP Ubiquitin Ligase Is Required for Transactivation of the hTERT Promoter by the Human Papillomavirus E6 Oncoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 10807–10816. <https://doi.org/10.1074/jbc.m410343200>
- 64) Liu, Z., Liu, W., Liu, Y., Ye, X., & Chen, S. (2015). Multiple Sexual Partners as a Potential Independent Risk Factor for Cervical Cancer: a Meta-analysis of Epidemiological Studies. *Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention*, 16(9), 3893-3900. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.9.3893
- 65) Lo, N., & Lau, J. T. (1996a). Novel Heterogeneity Exists in the 5'-Untranslated Region of the β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase mRNAs in the Human B-Lymphoblastoid Cell Line, Louckes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 228(2), 380–385. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1670>
- 66) Lo, N., & Lau, J. T. (1996b). Transcription of the β -galactoside α 2,6-sialyltransferase gene in B lymphocytes is directed by a separate and distinct promoter†. *Glycobiology*, 6(3), 271–279. <https://doi.org/10.1093/glycob/6.3.271>
- 67) Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), D490–D495. doi:10.1093/nar/gkt1178
- 68) López, M. D., & Vallejo, V. (2007). Expresión de ácido siálico y de la β -Galactósido- α -2, 6-Sialiltransferasa en cáncer. *Revista de Educación Bioquímica*, 26(3), 93–98. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=37728>
- 69) López-Morales, D., Reyes-Leyva, J., Santos-López, G., Zenteno, E., & Vallejo-Ruiz, V. (2010). Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions. *Diagnostic Pathology*, 5(1), 74. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-5-74>
- 70) López-Morales, D., Velázquez-Márquez, N., Valenzuela, O., Santos-López, G., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2009). Enhanced sialyltransferases transcription in cervical intraepithelial neoplasia.. *Investigación Clínica*, 50(1), 45–53. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=372937675006>
- 71) López-Ocejo, O., Vilorio-Petit, A., Bequet-Romero, M., Mukhopadhyay, D., Rak, J., & Kerbel, R. S. (2000). Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene*, 19(40), 4611–4620. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203817>
- 72) Manzano, B., Novina, C. D., & Roy, A. L. (1996). TFII Is Required for Transcription of the Naturally TATA-less but Initiator-containing V Promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 271(20), 12076–12081. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.20.12076>
- 73) Martínez, M. C., Trejo, A., Herrera, A., Romero, J. L., Chávez, R., Lascuráin, R., & Zenteno, E. (2002). Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 15(1), 39–47. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-2002/in021g.pdf>

- 74) Martínez-Zapien, D., Ruiz, F. X., Poirson, J., Mitschler, A., Ramirez, J., Forster, A., . . . Zanier, K. (2016). Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature*, *529*(7587), 541–545. <https://doi.org/10.1038/nature16481>
- 75) Meany, D. L., & Chan, D. W. (2011). Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. *Clinical proteomics*, *8*(1), 7. doi:10.1186/1559-0275-8-7
- 76) Mesplède, T., Gagnon, D., Bergeron-Labrecque, F., Azar, I., Sénéchal, H., Coutlée, F., & Archambault, J. (2012). p53 degradation activity, expression, and subcellular localization of E6 proteins from 29 human papillomavirus genotypes. *Journal of virology*, *86*(1), 94–107. doi:10.1128/JVI.00751-11
- 77) Milflores-Flores, L., Millán-Pérez, L., Santos-López, G., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2012). Characterization of P1 promoter activity of the β -galactoside α 2,6sialyltransferase I gene (siat 1) in cervical and hepatic cancer cell lines. *Journal of Biosciences*, *37*(2), 259–267. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9194-6>
- 78) Monterrosas Santamaría, J. (2018). *Evaluación de La Actividad del Promotor V2 del Gen ST3GAL4 en queratinocitos humanos y el efecto de las oncoproteínas E5, E6 y E7 del VPH16* (Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- 79) Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, *10*(8), 550–560. <https://doi.org/10.1038/nrc2886>
- 80) Morosov, A., Phelps, W. C., & Raychaudhuri, P. (1994). Activation of the c-fos gene by the HPV16 oncoproteins depends upon the cAMP-response element at -60.. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(28), 18434–18440. Recuperado de <http://www.jbc.org/content/269/28/18434.long>
- 81) Muñoz, N., Bosch, F. X., De Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., . . . Meijer, C. J. (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*, *348*(6), 518–527. <https://doi.org/10.1056/nejmoa021641>
- 82) Muñoz, N., Castellsagué, X., De González, A. B., & Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, *24*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.115>
- 83) Murre, C., McCaw, P. S., & Baltimore, D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*, *56*(5), 777–783. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90682-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90682-x)
- 84) Nakagawa, S., & Huibregtse, J. M. (2000). Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Molecular and cellular biology*, *20*(21), 8244–8253. doi:10.1128/mcb.20.21.8244-8253.2000
- 85) Nominé, Y., Masson, M., Charbonnier, S., Zanier, K., Ristriani, T., Deryckère, F., . . . Travé, G. (2006). Structural and Functional Analysis of E6 Oncoprotein: Insights in the Molecular Pathways of Human Papillomavirus-Mediated Pathogenesis. *Molecular Cell*, *21*(5), 665–678. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.024>
- 86) Nowińska, K., Ceisielska, U., Podhorska-Okółów, M., & Dzięgiel, P. (2017). The role of human papillomavirus in oncogenic transformation and its contribution to the etiology of precancerous

lesions and cancer of the larynx: A review. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(3), 539–547. <https://doi.org/10.17219/acem/67461>

- 87) Oh, S. T., Kyo, S., & Laimins, L. A. (2001). Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *Journal of virology*, 75(12), 5559–5566. doi:10.1128/JVI.75.12.5559-5566.2001
- 88) Organización Panamericana de la Salud. (2016). *Comprehensive Cervical Cancer Control: A Guide to Essential Practice* (2ª ed.). Washington, DC, USA: World Health Organization.
- 89) Ortíz Mateos, C. (2017). *Identificación y caracterización del promotor de la variante V3 del gen ST3GAL4 y la evaluación del efecto de las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH16 sobre su actividad*. (Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- 90) Paba, P., Bonifacio, D., Di Bonito, L., Ombres, D., Favalli, C., Syrjänen, K., & Ciotti, M. (2008). Co-Expression of HSV2 and Chlamydia trachomatis in HPV-Positive Cervical Cancer and Cervical Intraepithelial Neoplasia Lesions Is Associated with Aberrations in Key Intracellular Pathways. *Intervirology*, 51(4), 230–234. <https://doi.org/10.1159/000156481>
- 91) Peixoto, A., Relvas-Santos, M., Azevedo, R., Santos, L. L., & Ferreira, J. A. (2019). Protein Glycosylation and Tumor Microenvironment Alterations Driving Cancer Hallmarks. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00380>
- 92) Pietsch, E. C., & Murphy, M. E. (2008). Low risk HPV-E6 traps p53 in the cytoplasm and induces p53-dependent apoptosis. *Cancer biology & therapy*, 7(12), 1916–1918. doi:10.4161/cbt.7.12.7169
- 93) Pinho, S. S., & Reis, C. A. (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, 15(9), 540–555. <https://doi.org/10.1038/nrc3982>
- 94) Pol, S. B. V., Brown, M. C., & Turner, C. E. (1998). Association of Bovine Papillomavirus Type 1 E6 oncoprotein with the focal adhesion protein paxillin through a conserved protein interaction motif. *Oncogene*, 16(1), 43–52. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201504>
- 95) Porter, S. S., Stepp, W. H., Stamos, J. D., & McBride, A. A. (2017). Host cell restriction factors that limit transcription and replication of human papillomavirus. *Virus research*, 231, 10–20. doi:10.1016/j.virusres.2016.11.014
- 96) Rincon-Orozco, B., Halec, G., Rosenberger, S., Muschik, D., Nindl, I., Bachmann, A., . . . Rosl, F. (2009). Epigenetic Silencing of Interferon- in Human Papillomavirus Type 16-Positive Cells. *Cancer Research*, 69(22), 8718–8725. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-0550>
- 97) Rini, J., Esko, J., & Varki, A. (2009). Chapter 5 Glycosyltransferases and Glycan-processing Enzymes. In A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, P. Stanley & C. Bertozzi et al., *Essentials of Glycobiology. 2nd edition*. (2nd ed.). New York: Cold Spring Harbor. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1921/>
- 98) Ronco, L. V., Karpova, A. Y., Vidal, M., & Howley, P. M. (1998). Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes & Development*, 12(13), 2061–2072. <https://doi.org/10.1101/gad.12.13.2061>

- 99) Roy, A., & Chakraborty, S. (2005). Detection of cancer cervix by estimation of sialic acid. *Journal of the Indian Medical Association*, 103(11), 589–590.
- 100) Sakamuro, D., & Prendergast, G. C. (1999). New Myc-interacting proteins: a second Myc network emerges. *Oncogene*, 18(19), 2942–2954. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202725>
- 101) Schachter MD, PhD, FRSC, H. (2000). The joys of HexNAc. The synthesis and function of N-and O-glycan branches. *Glycoconjugate Journal*, 17(7/9), 465–483. <https://doi.org/10.1023/a:1011010206774>
- 102) Schiffman, M. H., Haley, N. J., Felton, J. S., Andrews, A. W., Kaslow, R. A., Lancaster, W. D., . . . Hoffman, D. (1987). Biochemical Epidemiology of Cervical Neoplasia: Measuring Cigarette Smoke Constituents in the Cervix. *Cancer Research*, 47(14), 3886–3888. Recuperado de <https://cancerres.aacrjournals.org/content/47/14/3886.full-text.pdf>
- 103) Shao, H., Revach, M., Moshonov, S., Tzuman, Y., Gazit, K., Albeck, S., . . . Dikstein, R. (2004). Core Promoter Binding by Histone-Like TAF Complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 25(1), 206–219. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.1.206-219.2005>
- 104) Shi, Y., Seto, E., Chang, L., & Shenk, T. (1991). Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Krüppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell*, 67(2), 377–388. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90189-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90189-6)
- 105) Shi, Y., Xu, X., Zhang, Q., Fu, G., Mo, Z., Wang, G. S., . . . Yang, X. (2014). tRNA synthetase counteracts c-Myc to develop functional vasculature. *eLife*, 3. <https://doi.org/10.7554/elife.02349>
- 106) Smotkin, D., & Wettstein, F. (1986). Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 83(13), 4680-4684. doi: 10.1073/pnas.83.13.4680
- 107) Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., . . . Cantley, L. C. (1997). Recognition of Unique Carboxyl-Terminal Motifs by Distinct PDZ Domains. *Science*, 275(5296), 73–77. <https://doi.org/10.1126/science.275.5296.73>
- 108) Stamenkovic, I., Asheim, H. C., Deggerdal, A., Blomhoff, H. K., Smeland, E. B., & Funderud, S. (1990). The B cell antigen CD75 is a cell surface sialyltransferase. *The Journal of experimental medicine*, 172(2), 641–643. doi:10.1084/jem.172.2.641
- 109) Stubenrauch, F., Zobel, T., & Iftner, T. (2001). The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *Journal of virology*, 75(9), 4139–4149. doi:10.1128/JVI.75.9.4139-4149.2001
- 110) Suske G. (1999) The Sp-Family of transcription factors. *Gene*, 238, 291–300.
- 111) Tao, M., Kruhlak, M., Xia, S., Androphy, E., & Zheng, Z. (2003). Signals That Dictate Nuclear Localization of Human Papillomavirus Type 16 Oncoprotein E6 in Living Cells. *Journal of Virology*, 77(24), 13232–13247. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.24.13232-13247.2003>
- 112) Thomas, M., Laura, R., Hepner, K., Guccione, E., Sawyers, C., Lasky, L., & Banks, L. (2002). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene*, 21(33), 5088–5096. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205668>

- 113) Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Shintani, Y., . . . Miyamura, T. (2002). Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor α modulates its transcriptional activity. *Hepatology*, 35(4), 937–946. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.32470>
- 114) Vajaria, B. N., Patel, K. R., Begum, R., & Patel, P. S. (2015). Sialylation: an Avenue to Target Cancer Cells. *Pathology & Oncology Research*, 22(3), 443–447. <https://doi.org/10.1007/s12253-015-0033-6>
- 115) Vajaria, B. N., & Patel, P. S. (2017). Glycosylation: a hallmark of cancer? *Glycoconjugate Journal*, 34(2), 147–156. <https://doi.org/10.1007/s10719-016-9755-2>
- 116) Van Doorslaer, K., & Burk, R. D. (2012). Association between hTERT activation by HPV E6 proteins and oncogenic risk. *Virology*, 433(1), 216–219. doi:10.1016/j.virol.2012.08.006
- 117) Van Doorslaer, K., DeSalle, R., Einstein, M. H., & Burk, R. D. (2015). Degradation of Human PDZ-Proteins by Human Alphapapillomaviruses Represents an Evolutionary Adaptation to a Novel Cellular Niche. *PLoS pathogens*, 11(6), e1004980. doi:10.1371/journal.ppat.1004980
- 118) Vande Pol, S. B., & Klingelutz, A. J. (2013). Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, 445(1-2), 115–137. doi:10.1016/j.virol.2013.04.026
- 119) Vaquerizas, J. M., Kummerfeld, S. K., Teichmann, S. A., & Luscombe, N. M. (2009). A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nature Reviews Genetics*, 10(4), 252–263. <https://doi.org/10.1038/nrg2538>
- 120) Várnai, A. D., Bollmann, M., Bánkfalvi, A., Griefingholt, H., Pfening, N., Schmitt, C., . . . Bollmann, R. (2007). The spectrum of cervical diseases induced by low-risk and undefined-risk HPVs: implications for patient management. *Anticancer Research*, 27(1B), 563–570. Recuperado de <http://ar.iiarjournals.org/content/27/1B/563.long>
- 121) Velázquez-Márquez, N., Santos-López, G., Jiménez-Aranda, L., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2012). Sialyl Lewis x expression in cervical scrapes of premalignant lesions. *Journal of Biosciences*, 37(S1), 999–1004. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9261-z>
- 122) Veldman, T., Horikawa, I., Barrett, J. C., & Schlegel, R. (2001). Transcriptional Activation of the Telomerase hTERT Gene by Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein. *Journal of Virology*, 75(9), 4467–4472. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.9.4467-4472.2001>
- 123) Walboomers, J., Jacobs, M., Manos, M., Bosch, F., Kummer, J., & Shah, K. et al. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal Of Pathology*, 189(1), 12-19. doi: 10.1002/(sici)1096-9896(199909)189:1<12::aid-path431>3.0.co;2-f
- 124) Wallace, N. A., & Galloway, D. A. (2015). Novel Functions of the Human Papillomavirus E6 Oncoproteins. *Annual Review of Virology*, 2(1), 403–423. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055021>
- 125) Wang, P., Lee, W., Lee, Y., Juang, C., Chen, Y., Chao, H., . . . Yuan, C. (2003). Enhanced expression of α 2,6-sialyltransferase ST6Gal I in cervical squamous cell carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 89(3), 395–401. [https://doi.org/10.1016/s0090-8258\(03\)00127-6](https://doi.org/10.1016/s0090-8258(03)00127-6)

- 126) Wang, P., Li, Y. F., Juang, C., Lee, Y., Chao, H., Ng, H., . . . Yuan, C. (2002). Expression of Sialyltransferase Family Members in Cervix Squamous Cell Carcinoma Correlates with Lymph Node Metastasis. *Gynecologic Oncology*, 86(1), 45–52. <https://doi.org/10.1006/gyno.2002.6714>
- 127) Wang, X., O'Hanlon, T. P., Young, R. F., & Lau, J. T. (1990). Rat β -galactoside α 2,6-sialyltransferase genomic organization: alternate promoters direct the synthesis of liver and kidney transcripts. *Glycobiology*, 1(1), 25–31. <https://doi.org/10.1093/glycob/1.1.25>
- 128) Wentzensen, N., Vinokurova, S., & Doeberitz, M. K. (2004). Systematic Review of Genomic Integration Sites of Human Papillomavirus Genomes in Epithelial Dysplasia and Invasive Cancer of the Female Lower Genital Tract. *Cancer Research*, 64(11), 3878–3884. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-0009>
- 129) Winkelstein, W. (1990). Smoking and cervical cancer-current status: a review.. *American Journal of Epidemiology*, 131(6), 945–957. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115614>
- 130) Wu, K., Grandori, C., Amacker, M., Simon-Vermot, N., Polack, A., Lingner, J., & Dalla-Favera, R. (1999). Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nature Genetics*, 21(2), 220–224. <https://doi.org/10.1038/6010>
- 131) Xu, L., Kurusu, Y., Takizawa, K., Tanaka, J., Matsumoto, K., & Taniguchi, A. (2003). Transcriptional regulation of human β -galactoside α 2,6-sialyltransferase (hST6Gal I) gene in colon adenocarcinoma cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307(4), 1070–1074. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01314-7](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01314-7)
- 132) Yan, A., & Lennarz, W. J. (2004). Unraveling the Mechanism of ProteinN-Glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3121–3124. <https://doi.org/10.1074/jbc.r400036200>
- 133) Zanier, K., Charbonnier, S., Sidi, A. O. M. O., McEwen, A. G., Ferrario, M. G., Poussin-Courmontagne, P., . . . Trave, G. (2013). Structural Basis for Hijacking of Cellular LxxLL Motifs by Papillomavirus E6 Oncoproteins. *Science*, 339(6120), 694–698. <https://doi.org/10.1126/science.1229934>
- 134) Zhang, Y., Dakic, A., Chen, R., Dai, Y., Schlegel, R., & Liu, X. (2017). Direct HPV E6/Myc interactions induce histone modifications, Pol II phosphorylation, and hTERT promoter activation. *Oncotarget*, 8(56). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22036>
- 135) Zheng, Z. M., & Baker, C. C. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 11, 2286–2302. doi:10.2741/1971
- 136) zur Hausen, H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*, 384(2), 260-265. doi: 10.1016/j.virol.2008.11.046