



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Análisis de la influencia del estatus del gen p53 en los cambios en la actividad transcripcional de TAF1 inducidos por la expresión de E2 de VPH16”

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Sofía Luna García

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. J. Efraín Garrido Guerrero, DGBM-CINVESTAV-IPN



Puebla, Pue.

Mayo, 2021

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. José Efraín Garrido Guerrero, jefe del Laboratorio 1 DGBM-CINVESTAV, a quien agradezco enormemente la oportunidad brindada para desarrollar este trabajo. Gracias Dr. Garrido por todo el apoyo y conocimiento proporcionado y por motivar siempre el desarrollo de actividades académicas a favor del aprendizaje de todos sus alumnos.

Gracias al auxiliar de Laboratorio, el Biol. Pedro Chávez Olmos, por compartir siempre sus conocimientos y asesorar en el manejo del laboratorio. Gracias, señor Pedro.

Quiero agradecer también a todos los compañeros del Laboratorio: Mariana, Brenda, Liliana, Patricia, Diana, Maricarmen, Tita y Víctor, porque de ustedes he aprendido mucho, agradezco enormemente sus comentarios constructivos en los seminarios. Muy especialmente, quiero agradecer a Mayte Rodríguez Saavedra, por acompañarme durante mi servicio social en este mismo laboratorio, fue una gran experiencia trabajar contigo May.

Agradezco a la Dra. Lourdes Guerrero Ontiveros, catedrática de la FCB-BUAP, por confiar en mí y motivarme siempre a cumplir mis metas profesionales, porque desde que tuve la oportunidad de ser su alumna pude enfocar mis intereses gracias a sus valiosos consejos y conocimientos. Muchas gracias Dra., el apoyo que he recibido de usted es invaluable.

A todas las amigas que tuve la dicha de conocer en la FCB, Bety, Arancita, Jan, Vane, Brend, Jimenita, Vale, muchas gracias, sin ustedes esta etapa no hubiera sido tan amena. De forma particular quiero agradecer a Eri, por ser una excelente amiga durante toda la carrera, por escucharme siempre y aconsejarme en momentos difíciles.

Por último, quiero agradecer a mi familia, especialmente a mi mamá, la señora Juana Anastasia García Arriaga, a quien dedico este trabajo porque siempre ha estado ahí para apoyarme en todos mis proyectos, porque siempre me motiva a ser una mejor persona y a seguir adelante a pesar de las dificultades. Muchas gracias mamá, todo esto es por ti.

***“Esta investigación fue realizada gracias al apoyo del Consejo de
Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla”***

Contenido

Agradecimientos	2
Resumen	6
1. Introducción	7
1.1. Cáncer Cervicouterino	7
Cáncer	7
Descripción general.....	7
Epidemiología.....	8
Etiología	9
1.2. Papilomavirus	10
Clasificación	10
Estructura.....	11
1.3. Virus de Papiloma Humano Tipo 16	12
Organización del Genoma.....	12
Ciclo de vida	13
Carcinogénesis	16
1.4. Proteína Viral E2	17
Funciones	18
Interactoma de E2	21
1.5. Proteína celular TAF1	22
1.6. Proteína p53	24
2. Marco teórico	25
3. Justificación	27
4. Hipótesis	28
5. Objetivos	28
5.1. Objetivo General	28
5.2. Objetivos Específicos	28
6. Metodología	29
7. Resultados	30
7.1. Revisión	30
E2 regula genes celulares específicos.....	30
E2 regula positivamente factores de <i>splicing</i>	39
E2 es capaz de regular una gran cantidad de genes celulares	43

Trabajos recientes	50
7.2. Análisis del promotor TAF1 en EPD	55
7.3. Factores de transcripción con sitios de unión en el Promotor del gen TAF1.....	56
7.4. Factores de transcripción con sitio de unión en el Promotor TAF1 interactúan con p53.....	57
7.5. Consecuencias de las interacciones p53-TFs con sitio de unión en el promotor TAF1	59
7.6. ATF3 en un gen que responde a p53.....	63
7.7. Modelos regulación transcripcional TAF1	64
8. Discusión	69
Propuesta Experimental	74
10. Conclusiones	76
11. Referencias.....	77

Resumen

La proteína E2 de VPH posee funciones esenciales para el ciclo de vida del virus, como la replicación, mantenimiento y transcripción del genoma viral, pero además es capaz de modificar la expresión de muchos genes celulares mediante mecanismos no muy claros. Aquí se presenta una recopilación de artículos que informan acerca de esta capacidad de E2 para regular la expresión principalmente a nivel transcripcional de genes celulares y las posibles consecuencias fisiológicas de estos cambios.

De acuerdo con trabajos previos de nuestro grupo de investigación E2 es capaz de regular significativamente la expresión del gen TAF1 a nivel de RNA mensajero y proteína, pero de manera antagónica en dos líneas celulares que difieren en el estatus del gen p53. Nuestra hipótesis es que p53 influye en la actividad transcripcional del gen TAF1 inducida por E2 de VPH16. Siguiendo esta idea, se analizó la secuencia promotora de TAF1 y se encontraron sitios de unión para 19 factores de transcripción, p53 no estuvo entre ellos; sin embargo, un análisis más detallado reveló que 6 de los 19 factores son capaces de interactuar con p53 e inducir efectos negativos y positivos en la actividad de este supresor tumoral frente a situación de estrés.

Un análisis similar realizado con anterioridad en nuestro grupo mostró que en el promotor de TAF1 existe un sitio consenso de unión de E2 en la posición -605 bp respecto al sitio de inicio de la transcripción. En el presente trabajo se encontró que en el promotor de TAF1, existe un sitio de unión específico para el factor ATF3, quien interactúa con p53 y responde a esta proteína colaborando en su actividad en presencia de estímulo de daño. Por tanto, se consideró a ATF3 en la elaboración de dos modelos de regulación del gen TAF1 en presencia de E2 de VPH16 y bajo la influencia del estatus de la proteína p53.

Finalmente, se discuten las posibles implicaciones de la proteína E2 de VPH sobre procesos postranscripcionales y se propone el abordaje experimental para evaluar puntos esenciales de los modelos de regulación propuestos.

1. Introducción

1.1. Cáncer Cervicouterino

Cáncer

El término “cáncer” agrupa un conjunto de entidades clínicas caracterizadas por el crecimiento incontrolado de células anormales de origen diverso capaces de generar tumores e invadir otros tejidos del cuerpo (Sánchez et al., 2013). Estas células anormales se denominan “células cancerosas” y se originan a partir de células normales mediante un proceso de carcinogénesis. En general, la carcinogénesis ocurre debido a la acumulación de mutaciones, alteraciones en el genoma, que confieren a las células la capacidad de dividirse con mayor rapidez y generar descendencia con ventajas proliferativas (Sánchez, 2013). De acuerdo con Hanahan y Weinberg, 2011, todas las células cancerosas presentan 8 características comunes: independencia de señales de crecimiento, insensibilidad a estímulos que inhiben el crecimiento, evasión de apoptosis, invasividad y metástasis, activación de un potencial de replicación inmortal, angiogénesis sostenida, reprogramación del metabolismo energético y evasión de la destrucción inmune (Hanahan & Weinberg, 2011).

Existen diversos tipos de cáncer cuya denominación se basa en el tipo de tejido donde se origina la carcinogénesis. El término carcinoma refiere a cualquier cáncer que comienza a desarrollarse en tejido epitelial, este recubre la superficie de ciertos órganos internos o externamente forma parte de la piel. Comúnmente se incluyen algunos datos específicos en la nomenclatura de los tipos de cáncer, como el órgano del cuerpo afectado y el tipo particular de célula que desencadena la transformación maligna.

Descripción general

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un carcinoma que se origina en el epitelio que recubre el cuello uterino o cérvix denominado epitelio cervical. El epitelio cervical se divide en dos porciones histológicamente diferentes, dando nombre a dos regiones en el cérvix: endocérvix y exocérvix. El endocérvix es la parte del cuello uterino que proyecta hacia el cuerpo del útero, está recubierto por epitelio columnar de células glandulares secretoras y su nombre se debe a su ubicación más interna. Por otro lado, la parte externa del cuello

uterino se denomina exocérvis y conecta directamente con la vagina; se recubre de epitelio escamoso estratificado no queratinizante (Kyle & Lauren, 2020).

Existen dos tipos principales de cáncer cervicouterino de acuerdo con el sitio de inicio de la carcinogénesis, estos son: carcinoma de células escamosas, originado en el exocérvis; y adenocarcinoma, cuyo origen radica en las células secretoras del endocérvis (American Cancer Society [ACS], 2020). El punto de encuentro entre el epitelio columnar del endocérvis y el epitelio escamoso estratificado perteneciente al exocérvis se denomina unión escamocolumnar (UEC) (Kyle & Lauren, 2020).

De forma natural a partir de la menarquía y en el embarazo se produce la eversión del epitelio columnar sobre el exocérvis, ocasionada por el crecimiento del cuello uterino por influencia estrogénica. Este hecho desencadena un cambio metaplásico que implica la transformación citológica del epitelio columnar evertido para dar origen a epitelio escamoso (Sellors & Sankaranarayanan, 2003). La región en la que se produce dicho cambio metaplásico se denomina zona de transformación (fig. 1 c)). Se sabe que la zona de transformación es un sitio particularmente susceptible al desarrollo de cáncer (ACS, 2020) y variable en posición y/o longitud de acuerdo con la etapa de vida de la mujer (fig. 1).

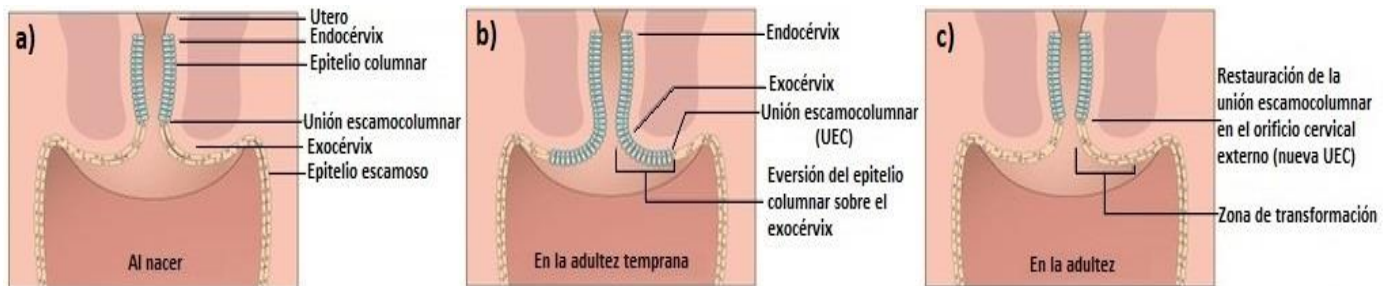


Figura 1. Epitelio Cervical. a) En el esquema se aprecia el endocérvis y el exocérvis recubiertos por epitelio columnar y escamoso respectivamente, la unión escamocolumnar (UEC) entre ambos. b) Representación de la eversión del epitelio columnar sobre el exocérvis en la adultez temprana, la UEC se reubica fuera del orificio cervical externo. c) El epitelio evertido genera epitelio escamoso a través de un proceso metaplásico, restaurando la UEC en el orificio cervical externo y estableciendo la zona de transformación (Modificado de Cuba H., s. f.)

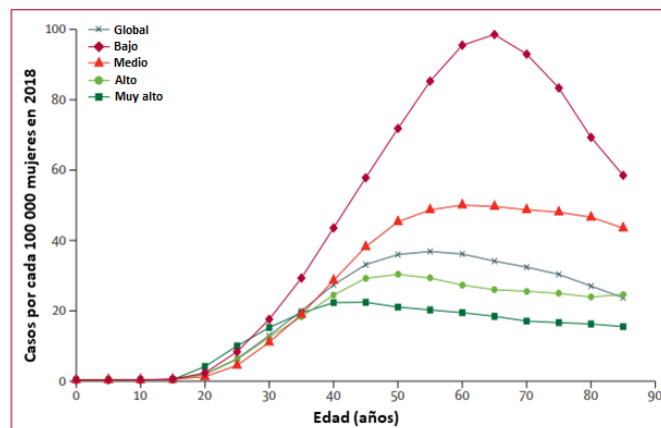
Epidemiología

El cáncer cervicouterino representa un grave problema de salud pública. Es el cuarto cáncer más común en mujeres en el mundo, solo por debajo del cáncer de pulmón, colorrectal y cáncer de mama, siendo este último el más frecuente (Organización Mundial

de la Salud [OMS], 2019). En 2018, 570 000 mujeres fueron diagnosticadas con cáncer cervicouterino en todo el mundo y aproximadamente 311 000 murieron a causa de esta enfermedad (Global Cancer Observatory [Globocan], 2018).

Aproximadamente 84% de la incidencia mundial y 88% de todas las muertes por esta enfermedad ocurren en países con un índice de Desarrollo Humano (HDI) < 0.80 (gráfica 1) (Arbyn, et al., 2018).

En México el CaCu es el tercer cáncer con mayor incidencia en mujeres. En 2018 se reportaron 7869 nuevos casos, 7.5% del total de nuevos casos de cáncer, solo por debajo del cáncer de tiroides y el cáncer de mama. Además, es el segundo cáncer con mayor mortalidad en mujeres en este país, con 4121 muertes en 2018 (Global Cancer Observatory [Globocan], 2018).



Gráfica 1. Incidencia mundial de cáncer cervicouterino en función de la edad. Se muestran los casos nuevos por cada 100 000 mujeres en función de la edad y de acuerdo con el índice de Desarrollo Humano (HDI). Las cuatro categorías del HDI son: bajo, medio, alto y muy alto. Se observa un incremento global notable en la incidencia a partir de 25 años, lo que corresponde con una vida sexual activa. Es notable que los picos de mayor incidencia varían numéricamente y se presentan en edades diferentes de acuerdo con el HDI (Arbyn, et al., 2018).

Etiología

El cáncer cervicouterino fue asociado por primera vez a la infección por Virus del Papiloma Humano en la década de 1970 cuando el Dr. Harold zur Hausen hipotetizó que jugaba un papel central en el desarrollo de este cáncer. En 2008 este investigador recibió el Premio Nobel de Medicina por su importante contribución para dilucidar la etiología del CaCu al demostrar la presencia del genoma viral de VPH en tejido de cáncer cervicouterino.

Numerosas investigaciones posteriores han revelado que la infección persistente con Virus del Papiloma Humano de cierto genotipo es una causa necesaria para el desarrollo de cáncer cervicouterino (Sánchez, Huerta, Rivera & Rosales, 2005). Este virus se transmite por contacto sexual, de forma que factores relacionados con la actividad sexual son importantes para el desarrollo de CaCu, por ejemplo: el aumento en el número de parejas sexuales, la edad temprana al momento del primer coito y la multiparidad se consideran factores de riesgo (Saavedra & Soberón, 2006).

1.2. Papilomavirus

Los Papilomavirus son pequeños virus icosaédricos de DNA bicatenario sin envoltura que infectan epitelio cutáneo y mucoso de una variedad de vertebrados, se encuentran agrupados dentro de la familia Papillomaviridae (International Agency for Research on Cancer [IARC], 2007).

Clasificación

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus incluye 53 géneros dentro de la familia Papillomaviridae, solo 5 de ellos contienen virus capaces de infectar a Humanos (Virus del Papiloma Humano, [VPH]) (Gheit, 2019). Los géneros de VPH son: alfa, beta, gamma, mu y nu. De acuerdo con el Centro Internacional de Referencia del VPH, existen más de 200 tipos diferentes distribuidos en estos 5 géneros. El género gamma agrupa el mayor número (99 tipos), seguido del género alfa con 65 tipos (www.hpvcenter.se, 30/01/2019 (Gheit, 2019)).

Los VPH infectan las células epiteliales basales de la piel o del revestimiento interno de algunos tejidos. En función de esta característica, se clasifican como tipos cutáneos y tipos de mucosa. Los tipos cutáneos infectan la epidermis de la piel de manos y pies principalmente, mientras que los tipos mucosos el revestimiento de la boca, garganta, tracto respiratorio y epitelio anogenital (Burd, 2003).

Los tipos de VPH de mucosa, 40 aproximadamente, se han dividido en dos grupos de acuerdo con su relación con el desarrollo de carcinomas. Uno de estos grupos, se integra de tipos virales que se han asociado fuertemente con el desarrollo de cáncer, por lo que

se denominan en conjunto VPH de Alto Riesgo. Este grupo incluye los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59, clasificados dentro del género *Alfapapillomavirus*; dichos tipos virales son considerados agentes etiológicos de varios cánceres, como los de cuello uterino (CaCu), vagina, vulva, pene y un subconjunto de cánceres de cabeza y cuello (Gheit, 2019).

El otro grupo, designado como de Bajo Riesgo, incluye tipos no carcinogénicos asociados a lesiones benignas sin implicación en el desarrollo de cáncer y raramente en lesiones precancerosas. Los tipos de Bajo Riesgo más descritos son el tipo 6, 11, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81 (Gheit, 2019).

El 99% de todos los casos de cáncer de cuello uterino están relacionados con la infección por VPH de Alto Riesgo. Dentro de estos VPH de Alto Riesgo, los tipos 16 y 18 juegan un papel trascendental en el desarrollo de cáncer cervicouterino, ya que se han relacionado con el 70% de los casos y con lesiones cervicales precancerosas (OMS, 2019).

Estructura

Los virus del Papiloma Humano tienen forma icosaédrica, son pequeños, de un diámetro aproximado entre 52-55 nm y no poseen envoltura ([IARC], 2007). Las partículas virales poseen un genoma de ADN circular de doble cadena de un tamaño aproximado entre 6800 y 8400 bp rodeada de una cápside compuesta por 72 capsómeros. Un capsómero es la unidad constitutiva de la cápside viral y se forma por un pentámero de la proteína L1 unido a un monómero de la proteína L2, ambas proteínas estructurales se encuentran codificadas en el genoma viral (Santos-López, Márquez-Domínguez, Reyes-Leyva & Vallejo-Ruíz, 2015).

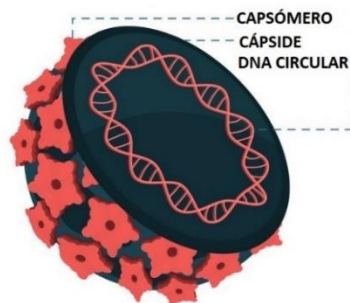


Figura 2. Estructura general de los VPH. Las partículas virales de VPH poseen un genoma de DNA circular de doble cadena dentro de una cápside compuesta por dos proteínas estructurales: L1 y L2, las cuales se organizan en unidades constitutivas denominadas capsómeros (Modificado de Freepik Company S.L., 2020).

1.3. Virus de Papiloma Humano Tipo 16

El Virus de Papiloma Humano tipo 16 pertenece al grupo de VPH de Alto Riesgo oncogénico, aproximadamente 60% de los casos de cáncer cervicouterino invasivo se asocian a este tipo viral. Además, VPH16 posee importancia biológica y clínica en las neoplasias asociadas con VPH, ya que también predomina en otros cánceres anogenitales y orofaríngeos (National Cancer Institute, 2020).

Organización del Genoma

El genoma de VPH16 posee una longitud de 8000 bp aproximadamente; al igual que otros tipos virales del género alfa, está organizado en tres regiones principales.

- I) Una región reguladora llamada Región Larga de Control (LCR) o Región Reguladora Río Arriba (URR)
- II) La Región Temprana, codifica para las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7, involucradas en la expresión, replicación y mantenimiento del genoma viral mediante diferentes mecanismos moleculares (Tabla 1).
- III) La Región Tardía, codifica para las proteínas estructurales de la cápside L1 y L2, las cuales se expresan de forma tardía en el ciclo viral (Graham, 2017).

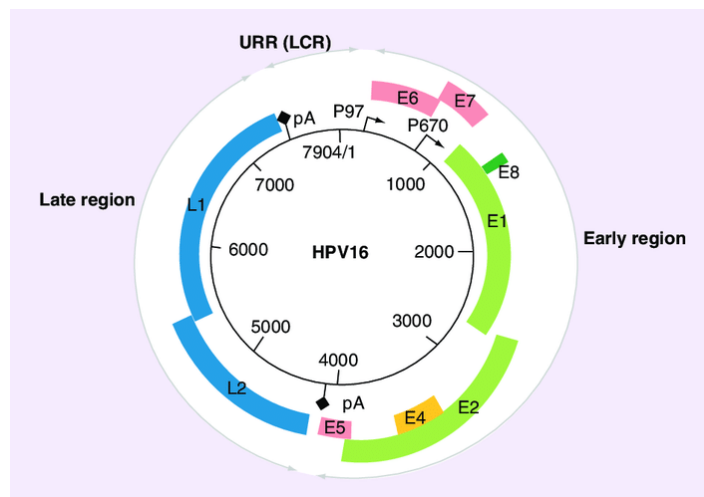


Figura 3. Organización del genoma de VPH16. El genoma de VPH16 se divide en tres regiones: la región reguladora río arriba LCR, una región temprana y una región tardía. En el esquema se muestran dentro de la región LCR el promotor temprano p97 y el sitio de poliadenilación tardío (pA). La región temprana comprende ORFs (Open Reading Frames) para las proteínas reguladoras del ciclo viral E6, E7, E1, E2, E4 y E5, además se esquematiza el promotor tardío p670 y el sitio de poliadenilación temprano pAE. La región tardía codifica para las proteínas estructurales de la cápside L1 y L2 (Nakahara & Kiyono, 2016).

La región reguladora no codificante (LCR), de aproximadamente 1kb, contiene al menos 5 elementos *cis* reguladores: el promotor viral temprano, una región enhancer o potenciador transcripcional, el origen viral de replicación (ori), el sitio de poliadenilación tardía (p(A)L) y el elemento regulador tardío o negativo (LRE, NRE) (Graham, 2017).

Ciclo de vida

En el epitelio estratificado normal, la célula basal se divide y origina una nueva célula basal de mantenimiento y una célula hija que se separa de la membrana basal. Ésta última cambia su patrón de expresión génica para iniciar su proceso de diferenciación en las capas superiores del epitelio. Después de diferenciarse en una célula escamosa funcional, muere y se desprende del epitelio debido a un proceso de recambio continuo (Kajitani, Satsuka, Kawate & Sakai, 2012).

El VPH16 infecta las células basales del epitelio estratificado en la zona de transformación del cérvix; su ciclo de vida se encuentra acoplado con el programa de diferenciación de la célula huésped y se divide en tres etapas que difieren en los niveles de replicación de su DNA:

Una fase inicial de amplificación del genoma acontece tras la entrada al núcleo y la activación de la expresión génica viral, en ese momento se establecen cientos de copias episomales por célula. Ocurre en la capa basal epitelial y constituye una etapa temprana de la infección (Kadaja, Silla, Ustav & Ustav, 2009).

Posteriormente una fase de mantenimiento conserva constante el número de copias del genoma a través de las divisiones celulares en capas suprabasales del epitelio. La prolongación de esta fase genera una infección persistente que puede durar años y parece ser necesaria para promover los eventos carcinogénicos que desencadenan la progresión hacia CaCu (Kadaja, et al., 2009).

Finalmente, la fase de amplificación vegetativa consiste en un segundo incremento en el número de copias del genoma, llegando a miles de ellas por célula (Kadaja, et al., 2009). Acontece en una etapa tardía de la infección viral, en células diferenciadas terminalmente pertenecientes a la capa intermedia y superficial. Esta fase de replicación exponencial se sincroniza con la expresión de las proteínas estructurales de la cápside L1 y L2,

favoreciéndose el ensamblaje de nuevos viriones infectivos (Kadaja, et al., 2009) y dando lugar a una etapa productiva de la infección.

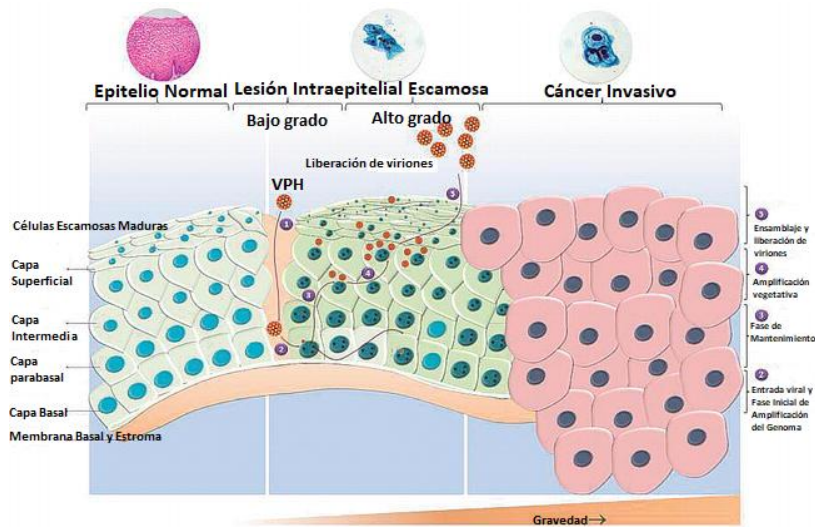


Figura 4. Ciclo de vida de VPH16. El ciclo de vida de VPH16 está relacionado con el programa de diferenciación de las células del epitelio cervical al que infectan, se ilustran los principales eventos en el ciclo de vida de este virus, desde que infectan las células de la capa basal a través de microlesiones hasta la liberación de nuevos viriones infectivos, pasando por las diferentes etapas de replicación de su genoma y el ensamblaje de las partículas virales. Además, se muestran las diferentes capas epiteliales donde ocurren estos eventos y los cambios tisulares observados en las lesiones precancerosas y el estadio de cáncer invasivo (modificado de Saxena, et al., 2018).

Posteriormente, los viriones se liberan a través del desprendimiento de las células escamosas muertas de la capa más superficial del epitelio (Kadaja, et al., 2009).

La replicación del genoma viral requiere de la maquinaria de replicación de la célula hospedera. Sin embargo, las células completamente diferenciadas suprimen la replicación del DNA y abandonan el ciclo celular, esto supone un problema para la replicación del genoma viral en las capas suprabasales. A pesar de ello, el VPH garantiza la replicación de su genoma reactivando mediante diferentes mecanismos la división celular en estas capas del epitelio (Moody, 2017).

Expresión de las proteínas virales

Tras la entrada del virus a la célula, el genoma del VPH se deposita en el núcleo y comienza la expresión de la región temprana del genoma que posee Marcos de Lectura Abiertos (ORFs) para al menos 7 proteínas reguladoras del ciclo viral: el factor de replicación E1, el factor transcripcional E2, las oncoproteínas E6 y E7, la proteína E4, la

proteína E5 y E8^{E1} (Graham, 2017); las funciones de cada una de ellas se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Funciones de las proteínas de VPH en el ciclo de vida viral

Proteína	Funciones asociadas
E1	Replicación del genoma viral
E2	Transcripción, replicación y mantenimiento del genoma viral
E4	Regulación del ciclo celular Remodelación de queratinocitos diferenciados para permitir la liberación de partículas virales
E5	Señalización de queratinocitos y evasión inmunitaria
E6	Promueve la degradación de p53 mediada por proteosoma
E7	Se une e induce la degradación de pRb
E8^{E1}	Antagoniza las funciones de E2

La transcripción de la región temprana que acontece en las primeras fases de la infección se encuentra regulada por el promotor temprano p97 y el sitio de poliadenilación temprano pAE (Graham, 2017), y suele denominarse Expresión Génica Temprana.

Una vez que las células infectadas comienzan a diferenciarse en las capas suprabasales, inicia la expresión génica tardía del ciclo de vida viral, la cual se encuentra regulada por el promotor tardío p670 y el sitio de poliadenilación tardío ubicado dentro de la LCR (Graham, 2017). Las proteínas que incrementan su expresión en este momento son E1, E2, E4 y E5 ya que parecen ser necesarias para la amplificación vegetativa del genoma viral. Además, la expresión de las proteínas de la cápside L1 y L2 son parte esencial en los eventos de expresión tardía puesto que se reservan a las capas más superficiales del epitelio (Kajitani, Satsuka, Kawate & Sakai, 2012).

Se ha observado que existe un patrón de expresión característico de las proteínas virales a través de las capas del epitelio estratificado y que se relaciona con eventos importantes en el ciclo de vida del virus (Figura 5).

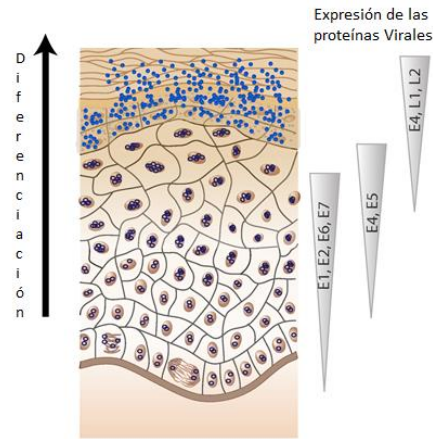


Figura 5. Patrón de expresión de las proteínas de VPH a través del epitelio infectado. La expresión de las diferentes proteínas de VPH sigue un patrón temporal y espacial acoplado al programa de diferenciación de las células infectadas en el epitelio cervical definiendo eventos imprescindibles en el ciclo de vida viral. Los niveles de expresión de las diferentes proteínas se esquematizan con las figuras grises, donde la punta representa la expresión mínima y la porción ancha la expresión máxima; los niveles de diferenciación se representan con la flecha negra (Modificado de Van Doorslaer et al., 2018).

Carcinogénesis

Los VPH de Alto Riesgo son capaces de inducir carcinogénesis a través de diferentes mecanismos durante la infección (Moody, 2017). Las proteínas de la región temprana del genoma viral son capaces de incidir en procesos celulares importantes y orquestar una serie de cambios patológicos que conducen al desarrollo de cáncer.

Proliferación

Las proteínas virales E6 y E7 son consideradas oncoproteínas, ya que promueven la desregulación del ciclo celular a través de unirse e inducir la degradación de dos proteínas supresoras de tumores: p53 y Rb, respectivamente.

La familia pRb regula la transición G1-S secuestrando los factores de transcripción E2F, los cuales son necesarios para la entrada en la fase S del ciclo celular. De manera normal, las cinasas dependientes de ciclinas inducen la hiperfosforilación de pRb conduciendo a la liberación de E2F, cuya función es transactivar a sus genes diana, los cuales codifican para proteínas esenciales en la fase S. Sin embargo, en las células infectadas con VPH, E7 es capaz de unirse a Rb induciendo su desestabilización, esto origina una activación continua de E2F y una entrada no regulada a la fase S (Moody, 2017).

Por su parte, la proteína p53 funge como un sensor de señales de estrés celular y en función de ello, regula procesos como proliferación, muerte celular y diferenciación. Se

trata de un factor transcripcional capaz de activar la expresión de genes involucrados en el arresto del ciclo celular en las transiciones G1-S y G2-M. La expresión de E6 durante la infección por VPH promueve la degradación de p53 mediada por proteosoma, ya que esta proteína viral se une a p53 y estimula su ubiquitinación. Esto conduce a la eliminación de los puntos de control antes mencionados en el ciclo celular, favoreciendo la proliferación celular independiente de las señales de estrés (Moody, 2017). Aunado a lo anterior, la función inductora de apoptosis de p53 se ve inhibida por los bajos niveles celulares, consecuencia de su degradación proteosómica.

Integración del genoma

Un evento clave en la promoción de la carcinogénesis es la integración del ADN viral al genoma de la célula hospedera e incluso se ha llegado a considerar la causa de la transformación maligna. Este evento no es un paso normal en el ciclo de vida de VPH sino un acontecimiento azaroso que le confiere ventajas proliferativas a la célula infectada (Moody, 2017).

La integración del ADN viral ocurre preferentemente en sitios frágiles del genoma celular. Normalmente E2 reprime la transcripción de las oncoproteínas E6 y E7, sin embargo, la integración rompe el marco de lectura de E2, lo que favorece la expresión elevada de estas oncoproteínas (Moody, 2017). La pérdida de la expresión de E2 trae como consecuencia la sobreexpresión y mayor estabilidad de E6 y E7, lo que genera proliferación e inmortalización celular. También se ha reportado inestabilidad genómica por la irrupción de regiones genómicas importantes tras la integración.

1.4. Proteína Viral E2

La proteína E2 de VPH es una proteína reguladora codificada en la región temprana del genoma viral, se expresa en etapas tempranas e intermedias del ciclo de vida del virus, con un patrón de expresión ascendente a través de las capas del epitelio cervical infectado (Figura 5). Se trata de una proteína de unión al DNA específica de secuencia codificada por todos los papilomavirus e involucrada en procesos esenciales en el ciclo de vida de VPH (McBride, 2013).

La longitud de la proteína E2 es variable dependiendo del tipo viral, constituida por entre 350 y 500 aminoácidos; se expresa a partir del Marco de Lectura Abierto (ORF) de E2 codificado dentro de la región temprana del genoma viral (Figura 3) (Graham, 2017).

Estructuralmente E2 se divide en dos dominios funcionales: un dominio de transactivación (TAD) hacia la región N-terminal formado por alrededor de 200 aminoácidos y un dominio de unión al DNA (DBD) de aproximadamente 100 aminoácidos hacia la región C-terminal. Ambos dominios se hayan separados por una región bisagra, la cual se caracteriza por ser flexible, no estructurada, poco conservada y de longitud variable entre los genotipos de VPH (McBride, 2013).



Figura 6. Dominios de la proteína E2 de VPH. Se muestran los dominios funcionales de la proteína E2 de VPH separados por la región bisagra. El Dominio de transactivación se encuentra en la región N-terminal de la proteína, mientras que el Dominio de unión a DNA en la C-terminal, ésta última región posee una interfase de dimerización que permite que E2 forme homodímeros al unirse al DNA (Modificado de Graham, 2016).

En los alfa-papilomavirus, como VPH16, los transcritos que codifican la proteína E2 se transcriben a partir de los promotores temprano y tardío, por lo que la proteína E2 se expresa tanto en células basales indiferenciadas como en células diferenciadas de las capas superiores del epitelio (McBride, 2013).

Funciones

E2 es una proteína multifuncional involucrada en procesos esenciales durante el ciclo de vida del VPH, tales como replicación, transcripción y segregación mitótica del genoma del virus (McBride, Oliveira & McPhillips, 2006). La participación de E2 en estos procesos depende enteramente de su capacidad para unirse a secuencias específicas de DNA viral a través de su dominio de unión al DNA, el cual posee una interfase de dimerización que permite que la proteína E2 se una al DNA como homodímero reconociendo de manera específica la secuencia ACCGN₄CGGT denominada sitio de unión para E2 (E2BS), donde N representa cualquier nucleótido (McBride, 2013).

Replicación viral

La proteína E2 de VPH desempeña un papel importante en el inicio de la replicación viral; se une a un motivo consenso E2BS en el origen de replicación ubicado dentro de la LCR del genoma de VPH (Figura 7). Debido a que su dominio TAD se une específicamente a la helicasa viral E1, ésta se dirige también a su sitio de unión en el origen de replicación (E1BS), promoviendo la activación de la replicación del DNA viral (McBride, 2013). Además, se postula que E2 participa en el proceso de replicación del DNA viral reclutando, por interacción directa, factores de replicación de la célula huésped, tales como TOP1 (DNA Topoisomerasa I) o RPA (Proteína de Replicación A) (Muller & Demeret, 2012).

Un análisis del interactoma de E2 mostró que es capaz de interactuar con POLDIP2, proteína cuya función es contactar con la DNA polimerasa delta y su cofactor el Antígeno Nuclear de Células en Proliferación (PCNA). En ese mismo estudio, se encontró que E2 también interactúa con ORC3L (Origin recognition complex 3), necesario para el ensamblaje del complejo de pre-replicación (Muller & Demeret, 2012). Todas estas interacciones apuntan a que E2 desempeña un papel fundamental en el proceso de replicación viral.

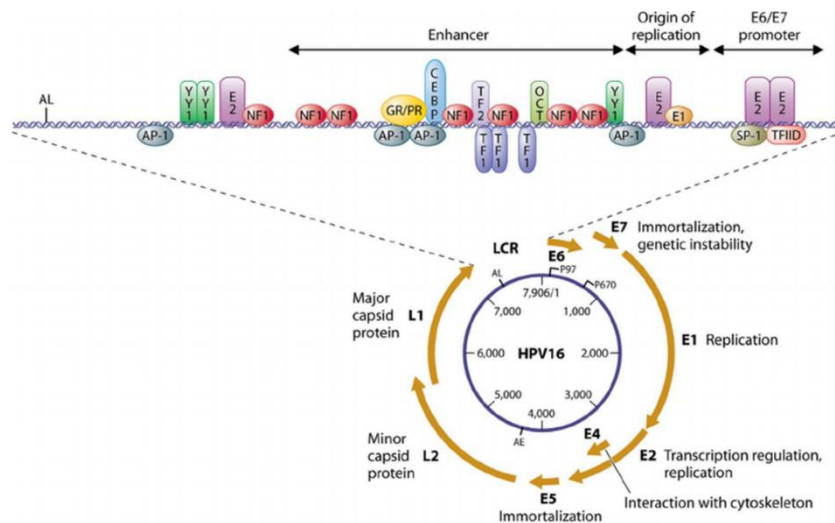


Figura 7. Sitios de unión para E2 en la LCR. El genoma de VPH16 posee cuatro sitios de unión para la proteína E2 en la Región Larga de Control (LCR) distribuidos como se muestra (rectángulos morados): 2 sitios proximales al sitio de inicio de la transcripción se ubican dentro del promotor de E6/E7, 1 sitio dentro del origen de replicación y un sitio más distalmente en una región considerada enhancer de la transcripción de los genes virales. También se representa la unión de otros factores de transcripción celulares con sitio de reconocimiento en dicha región y el sitio de unión de

E1 en el origen de replicación. Se postula que E2 regula la transcripción de los genes virales principalmente a través de interactuar con los factores aquí mostrados (Lazarczyk, et al., 2009).

Dada la participación indispensable de E2 en la replicación del DNA viral y el incremento en su expresión en capas suprabasales del epitelio, es posible que E2 se requiera para la amplificación vegetativa del ADN viral (Ozbun & Meyers, 1998; McBride, 2013).

Mantenimiento del genoma viral

La conservación persistente y estable del número de copias del genoma de VPH durante la etapa de mantenimiento en el ciclo de vida se debe a la proteína E2. Ésta es crítica en la segregación del DNA viral durante la mitosis, actúa enlazando el genoma episomal del virus a los cromosomas celulares, para ello se une a los sitios E2BS en la LCR del genoma episomal e interactúa a su vez con diferentes factores del aparato mitótico (Muller & Demeret, 2012). La primera interacción descrita en este sentido fue con la proteína BRD4 (You, Croyle, Nishimura, Ozato & Howley, 2004), involucrada en la transmisión de la memoria epigenética a través de las divisiones celulares. Sin embargo, se han encontrado más interacciones de E2 que promueven esta función durante el proceso de mitosis, como las descritas con la helicasa ChLR1 (Parish, Bean, Park & Androphy, 2006), la kinesina MKlp2 (Yu, Peng & Androphy, 2007) o el factor CEP350 asociado al huso mitótico (Muller & Demeret, 2012).

E2 es un factor de transcripción viral

Una de las funciones más estudiadas de la proteína E2 de VPH es fungir como regulador a nivel transcripcional de la expresión génica viral. Como factor transcripcional E2 posee dos dominios funcionales indispensables: su dominio de unión al DNA contacta secuencias específicas de DNA (promotores, enhancers, elementos de respuesta) adyacentes a los genes regulados y su dominio de transactivación, contiene sitios de unión para otras proteínas correguladoras de la transcripción (Muller & Demeret, 2012).

La proteína E2 posee 4 sitios de unión consenso dentro de la LCR del genoma viral (E2 Binding Site [E2BS]), la distribución de estos motivos de secuencia en la LCR del genoma de VPH16 se muestra en la figura 7. Dos E2BS se ubican dentro del promotor de las oncoproteínas E6 y E7, de forma proximal al sitio de inicio de la transcripción; otro E2BS

se localiza en el origen de replicación y uno más distalmente al sitio de inicio de la transcripción (Lazarczyk et al., 2009).

Se ha descrito que E2 puede activar o reprimir la transcripción de los genes virales en función de su unión diferencial a sus E2BS: cuando E2 se une a los sitios E2 proximales reprime la actividad transcripcional, por impedimento estérico para la unión de factores celulares como Sp1 y TFIID, dado su posicionamiento sobre elementos *cis* importantes dentro del promotor viral. Por otro lado, si se une a los sitios distales funge como un activador transcripcional (McBride, 2013). Se ha propuesto que los niveles de E2 pueden ser determinantes para su afinidad por unos u otros sitios dentro de la LCR (Hamid, Brown & Gaston, 2009), sin embargo, aún falta por dilucidar la base del rol dual de E2 en la transcripción del genoma viral, y su papel en la regulación que ejerce sobre genes celulares.

La actividad transcripcional de la proteína E2, ya sea como activador o represor, depende de su interacción con otros factores de transcripción celulares (Muller & Demeret, 2012; McBride, 2013). Específicamente, en nuestro grupo de investigación creemos que el contexto celular, dado por la naturaleza de los factores celulares asociados a los sitios de unión para E2, influencia fuertemente la actividad transcripcional esta proteína viral. Por lo que resulta de interés conocer las interacciones de la proteína E2 de VPH con proteínas celulares, especialmente factores involucrados en el proceso de transcripción.

Interactoma de E2

La proteína E2, al igual que otras proteínas virales, ejerce sus funciones uniéndose a diferentes factores celulares, de tal forma que el ambiente celular se vuelve indispensable en la regulación de las actividades de esta proteína. La mayoría de sus funciones descritas han sido relacionadas a su interacción directa con factores celulares (Muller & Demeret, 2012), posiblemente en pro del establecimiento de condiciones celulares óptimas que favorezcan una infección productiva.

E2 de VPH es capaz de interactuar con proteínas celulares que cumplen funciones en procesos importantes para la célula, como procesamiento de RNA, ciclo celular, apoptosis y transcripción. Dentro del grupo de Factores de transcripción que interactúan con E2 se encuentran factores basales, factores reguladores: activadores, represores,

coactivadores, correpresores, adaptadores de unión a la cromatina, proteínas acetiltransferasa de histonas y remodeladores de la cromatina (Muller & Demeret, 2012).

En nuestro grupo de trabajo se demostró la interacción física entre E2-VPH16 y el factor de transcripción basal TAF1 con consecuencias importantes para el proceso de transcripción dependiente de E2 (Centeno, et al., 2008). La interacción de E2 con la proteína p53 se describió desde el año 1999 (Massimi, Pim, Bertoli, Bouvard & Banks, 1999), los autores reportaron que p53 era capaz de inhibir la activación transcripcional dependiente de E2 y posteriormente, en el año 2008 se corroboraron dichos datos concluyendo que p53 es capaz de modular la actividad transcripcional de E2 a nivel de transcripción de genes virales (Brown, Kowalczyk, Taylor, Morgan & Gaston, 2008).

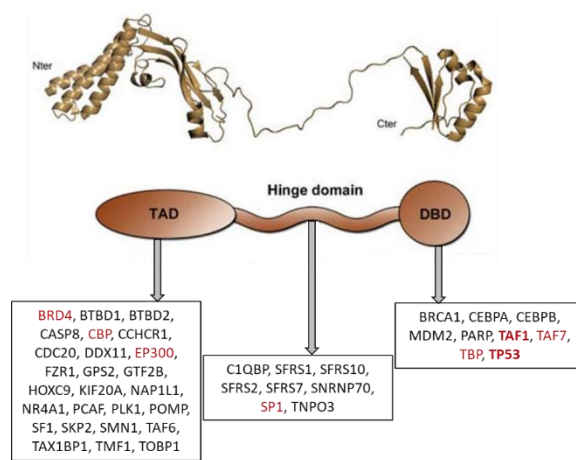


Figura 8. Interacciones de E2 de VPH con factores celulares involucrados en el proceso de transcripción. Se muestran las interacciones descritas de cada uno de los dominios y la región bisagra de E2-VPH con proteínas celulares involucradas en el proceso de transcripción. Se resaltan en rojo factores de transcripción como TAF1 y p53 (Muller & Demeret, 2012).

1.5. Proteína celular TAF1

La proteína TAF1 forma parte del complejo TFIID cuya función es unirse al promotor central y servir de andamio para el ensamblaje del resto de factores del complejo de transcripción, también actúa como un canal para señales reguladoras (GeneCards, s. f.). TFIID está compuesto por la proteína de unión a TATA (TBP) y un grupo de proteínas conservadas evolutivamente conocidas como factores asociados a TBP o TAFs. TAF1 cumple funciones importantes en el ensamblaje del complejo de preinicio de la

transcripción (PIC): el reconocimiento de secuencias en el núcleo del promotor propicia un ambiente de cromatina favorable y modifica postraduccionalmente a otros factores de transcripción (Wassarman & Suer, 2001).

Estructuralmente TAF1 consta de varios dominios funcionales que interactúan con distintas proteínas que fungen como sustratos de su actividad enzimática (Wassarman & Suer, 2001). La actividad de TAF1 se encuentra regulada por su interacción con otras proteínas, como otros factores generales de la transcripción y activadores (Wassarman & Sauer, 2001). También se ha reportado regulación del gen TAF1 a nivel de *splicing* alternativo, originando varias isoformas, las cuales se unen a distintos promotores blanco (Katzenberger, Marengo & Wassarman, 2006). Sin embargo, la regulación propiamente del promotor de TAF1 no se conoce; solo se ha reportado su metilación asociada a la infección con el virus de hepatitis C, el consumo de alcohol y el desarrollo de hepatocarcinoma (Cai, et al., 2020).

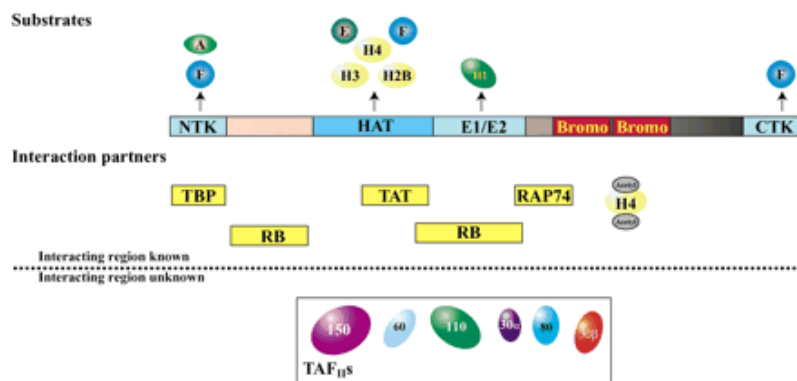


Figura 9. Estructura de TAF1. Se muestran los 5 dominios funcionales de la proteína TAF1, algunos sustratos de su actividad enzimática y proteínas con las que interactúa (Wassarman & Sauer, 2001).

Estudios previos muestran que TAF1 posee importancia en el control del ciclo celular, a través de regular transcripcionalmente la expresión de proteínas como p21 y ciclina D (Rushton, Steinman & Robbins, 1997). Es decir, TAF1 funge como regulador de la expresión de genes involucrados en procesos como ciclo celular y apoptosis (O'Brien & Tjian, 2000; Kimura, et al., 2008). TAF1 es un gen cuya expresión a nivel transcripcional se ve modificada por la presencia de E2 de VPH16 (Ramírez, et al., 2011), lo que sugiere que esta proteína viral incide de manera importante en procesos celulares esenciales a través de TAF1.

1.6. Proteína p53

La proteína p53 es una proteína supresora tumoral con importantes funciones en el control del ciclo celular (arresto), reparación del DNA y apoptosis. Esta proteína censa señales de estrés, como estrés oxidativo, hipoxia, deficiencia de nutrientes, señales oncogénicas, daño al DNA, entre otras, y actúa en respuesta a ellas con consecuencias anti proliferativas (Zilfou & Lowe, 2009). Debido a que sus actividades están enfocadas en mantener la estabilidad genómica en las células, se denomina Guardián del Genoma.

p53 es un factor de transcripción que actúa regulando múltiples genes blanco, involucrados en procesos como arresto del ciclo celular, reparación del DNA y apoptosis, si el daño es irreparable; además de senescencia, angiogénesis y autofagia (Joerger & Fersht, 2016). Esta proteína es regulada en sus niveles y actividad por diversas modificaciones postraduccionales como fosforilación, acetilación, glicosilación, etc. Una de las modificaciones descritas es la fosforilación en la Thr55 por TAF1, con consecuencias como promover la disociación de p53 de algunos promotores y promover su degradación, afectando positivamente la progresión de G1 en el ciclo celular e inactivando la transcripción tardía en respuesta al daño (Wu, et al., 2014).

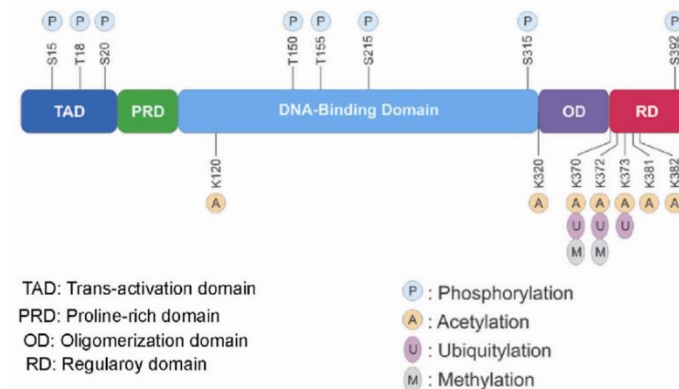


Figura 10. Dominios de la proteína p53 y modificaciones postraduccionales. La secuencia de la proteína p53 se divide en varios dominios funcionales: un dominio de transactivación y uno rico en prolina en la región N-terminal, un dominio de unión a DNA y en la región C-terminal un dominio de tetramerización y un dominio regulador. Se muestran además las principales modificaciones postraduccionales de esta proteína (Kumari, Sen & Das, 2014).

Estudios del interactoma de la proteína viral E2 revelan que es capaz de interactuar con p53 (Muller & Demeret, 2012), las consecuencias de esta interacción no se conocen con certeza, sin embargo, podría provocar un cambio funcional en la proteína p53 y/o influir en las funciones de E2 como regulador transcripcional de genes celulares.

2. Marco teórico

Reportes previos muestran que E2-VPH16 es capaz de modificar la expresión de una gran cantidad de genes celulares, tanto positiva como negativamente (Ramírez, et al., 2011).

En el año 2011, en nuestro grupo de investigación, Ramírez-Salazar demostró mediante microarreglos de expresión que E2 de VPH16 es capaz de modificar significativamente el perfil de expresión celular en la línea celular C33A. En este estudio se reportó que E2-VPH16 regula la expresión de 1048 genes negativamente y 581 genes positivamente, entre los que se encuentra TAF1. La expresión de E2-VPH16 incrementó los niveles de RNAm TAF1 en C33A, estas células se caracterizan por el genotipo p53mutado.

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo, Sánchez-Ramos midió la expresión de TAF1 a nivel de proteína en las líneas celulares C33A y RKO con expresión estable de E2-VPH16. Encontró que E2-VPH16 regula positivamente la expresión de TAF1 en C33A corroborando los resultados de Ramírez-Salazar. Sin embargo, en células RKO, a las que les fue transducido el gen E2-VPH16, se encontró una notable disminución de la proteína TAF1 (Sánchez-Ramos, et al., 2020, tesis de doctorado). La línea celular RKO, a diferencia de C33A, es *wild type* para el gen p53, es decir, existe una diferencia genotípica importante entre estas líneas celulares: el estatus del gen p53. Esto sugiere que la regulación que ejerce E2 sobre TAF1 es variable y estos cambios podrían estar relacionados con el estado de proteínas celulares que interactúan con E2, como p53 (Sánchez-Ramos, et al., 2020).

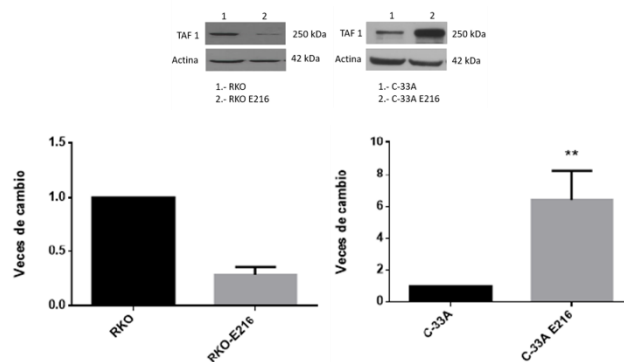


Figura 11. El estatus del gen p53 parece influir en la expresión de TAF1. Se muestran la expresión de TAF1 en células C33A y RKO con y sin expresión de E2 de VPH16 (Sánchez-Ramos, et al., 2020).

En otro estudio realizado en nuestro grupo se demostró en el año 2008 una interacción directa entre E2 de VPH16 y TAF1, con consecuencias importantes en el proceso de transcripción dependiente de E2. Para este trabajo se diseñaron dos construcciones para ensayos de Luciferasa con cuatro E2BS distribuidos de forma que E2 actúe como activador de la transcripción en una construcción y como represor en la otra, se midió la actividad transcripcional en presencia de E2 y TAF1. Se encontró que TAF1 incrementaba la activación dependiente de E2 y por el contrario disminuía su actividad represora, por lo que se hipotetizó que el roll que desempeña E2 como regulador transcripcional podría estar modulado por TAF1 (Centeno, Ramírez-Salazar, García-Villa, Gariglio, Garrido, 2008).

La proteína viral E2 es capaz de interactuar con diferentes elementos de la maquinaria basal de transcripción (Muller & Demeret, 2012), por lo que es probable que su interacción con TAF1 esté relacionada con el ensamblaje del complejo de preinicio de la transcripción. Bajo este panorama, la proteína viral E2 podría regular una gran cantidad de genes celulares a través de su interacción con la proteína TAF1 y a su vez regular los niveles de expresión del gen (TAF1) repercutiendo en procesos vitales para la célula infectada con consecuencias biológicas importantes.

Recientemente, en nuestro grupo se encontró, a través de un análisis *in silico*, que la región promotora del gen TAF1 posee un sitio de unión consenso en la posición -605 bp respecto al sitio de inicio de la transcripción de este gen, lo cual sugiere que E2 podría regular la expresión de TAF1 a través de su unión directa a su promotor (San Juan Mora, D.E., 2020, tesis de maestría).

En nuestro grupo de trabajo especulamos que E2 regula los niveles de TAF1 a nivel transcripcional, aunque no descartamos una regulación a otros niveles. La observación de una variación en los niveles de proteína TAF1 en líneas celulares que expresan E2-VPH16 pero que difieren en el estatus del gen p53 (Sánchez-Ramos, et al., 2020, tesis de doctorado), nos ha llevado a hipotetizar que el estado de proteínas celulares que interactúan con E2 como p53 pueden estar implicadas en modular la regulación que ejerce esta proteína viral sobre genes celulares blanco, dentro de los que encontramos a TAF1.

3. Justificación

El cáncer cervicouterino representa un grave problema de salud pública. Es el cuarto cáncer con mayor incidencia en mujeres en el mundo y en México ocupa la tercera posición (Global Cancer Observatory [Globocan], 2018). Está ampliamente estudiado que el Virus del Papiloma Humano tipo 16 es uno de los principales agentes causales de Cáncer Cervicouterino, sin embargo, una variedad de cofactores y eventos moleculares influyen en el desarrollo de esta enfermedad (Burd, 2003).

Como se mencionó anteriormente, la condición de E2 como regulador transcripcional de genes virales y celulares parece estar influenciada por su interacción con diversas proteínas celulares, principalmente factores de transcripción (McBride, 2013).

De acuerdo con nuestros antecedentes, E2 de VPH16 es capaz de modificar positivamente la expresión de TAF1 a nivel de RNAm (Ramírez, et al., 2011). Pero, además, el genotipo p53, parece tener un papel determinante en la regulación de la expresión de TAF1 por E2-VPH16, lo que sugiere que el estado de proteínas celulares que interactúan con E2 como p53 pueden estar implicadas en la regulación que ejerce esta proteína viral sobre genes celulares blanco (Sánchez-Ramos, et al., 2020).

Es de resaltar que los niveles de TAF1 son decisivos para la expresión de genes involucrados en procesos como ciclo celular y apoptosis (Kimura, et al., 2008). De manera que evaluar la influencia de proteínas celulares como p53 en la regulación que ejerce la proteína viral E2 sobre TAF1 resulta de interés. Es necesario entender la actividad de E2-VPH16 bajo diferentes condiciones celulares, específicamente las mutaciones en genes de importancia en la progresión hacia cáncer cervicouterino, como el supresor tumoral p53, implicado en responder a una amplia variedad de señales de estrés mediante arresto del ciclo celular, reparación de DNA o apoptosis.

Con el presente proyecto se espera contribuir de forma teórica a esclarecer la problemática de la función reguladora que ejerce la proteína viral E2 sobre TAF1, y cómo ésta pueden verse afectada por el genotipo p53 de la célula infectada. La pregunta de investigación que se pretende responder es ¿La manera en que E2-VPH16 regula los niveles de expresión de TAF1 depende del estatus del gen p53?

4. Hipótesis

La regulación transcripcional que ejerce E2 de VPH16 sobre el gen TAF1 depende del estatus del gen p53.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Determinar *in silico* la posible influencia de p53 en el promotor del gene TAF1 en presencia de E2 de VPH16.

5.2. Objetivos Específicos

1.- Realizar una revisión de publicaciones que reportan a la proteína E2 de VPH como regulador transcripcional de genes celulares.

2.- Determinar con el software PROMO qué factores de transcripción poseen sitio de unión en el promotor del gen TAF1.

3.- Determinar a través de BioGRID si los factores de transcripción con sitio de unión en el promotor del gen TAF1 interactúan directamente con p53 y profundizar en las consecuencias reportadas en la literatura.

4.- Investigar en diferentes bases de datos qué factores con sitio de unión en el promotor del gen TAF1 responden a p53.

5.- Proponer un posible mecanismo de regulación transcripcional del gen TAF1 y establecer el abordaje experimental apropiado para ponerlo a prueba.

6. Metodología

Se llevó a cabo una búsqueda avanzada de publicaciones que reportan a la proteína E2 como regulador de genes celulares en PUBMED utilizando como estrategia de búsqueda los términos MeSH “E2 HPV”, “Cellular genes” y “gene expression regulation” unidos por el operador booleano AND presentes en el título y/o resumen de los artículos. La búsqueda arrojó 157 artículos, se leyeron los títulos y resúmenes de dichos artículos y se seleccionaron 20 de ellos que cumplían con el objetivo de la revisión. Finalmente se incluyeron solo 16 de ellos en este trabajo tomando como criterio de selección que en los artículos se incluyera evidencia suficiente para atribuir la regulación de los genes celulares a la presencia de la proteína E2 de VPH.

Posteriormente, se realizó una búsqueda del promotor TAF1 para la especie *homo sapiens* en la plataforma *Eukaryotic Promoter Database*, de donde se extrajo información importante acerca de este promotor. Posteriormente en esta interfaz se buscaron elementos *cis* importantes con un alto nivel de significancia. Finalmente se recuperó la secuencia de 0 a -1000 bp respecto al sitio de inicio de la transcripción del promotor TAF1 y se guardó en formato FASTA. La secuencia recuperada se analizó con el software PROMO para hallar sitios de unión para factores de transcripción únicamente de la especie *homo sapiens*. El programa se corrió con un máximo nivel de disimilitud de 0.5.

Después de encontrar los sitios de unión con alta probabilidad de unir factores de transcripción específicos, se investigó cuáles de ellos interactuaban con la proteína p53 y que consecuencias se han descrito para cada una de las interacciones. Para cumplir este objetivo se consultó la base de datos BioGRID, donde se integra el interactoma de p53.

Posteriormente, utilizando la base de datos TRANSFAC (*Curated Transcription Factor Targets dataset*) y el trabajo de Fischer (2017), se averiguó si alguno de los factores de transcripción con sitio de unión en el promotor TAF1 respondían a la proteína p53.

Finalmente, se trabajó en el desarrollo de modelos de regulación del gen TAF1 donde E2 y p53 fueran factores determinantes y representaran las observaciones previas realizadas en las líneas celulares C33A y RKO. También se trabajó en la propuesta de abordaje experimental para contestar la pregunta de investigación de este trabajo.

7. Resultados

7.1. Revisión

Se llevó a cabo una búsqueda y revisión de artículos que reportan la incidencia de la proteína E2 de VPH sobre la expresión de genes celulares, especialmente a nivel transcripcional. Se puso especial interés en algunos aspectos como el modelo celular de estudio, el genotipo viral de la proteína E2, los genes regulados positiva o negativamente, los procesos celulares modificados, las consecuencias en la fisiología de la célula hospedera, su relación con el desarrollo de cáncer y el abordaje experimental.

Se encontraron relativamente pocos estudios que evalúen el efecto de la proteína viral E2 de VPH en la expresión de genes celulares, sin embargo, los presentados en este trabajo muestran una clara incidencia de E2 en la expresión de una gran cantidad de genes celulares, tanto a nivel de RNAm como a nivel de proteína. Como se puede observar en la columna de referencia de las tablas que resumen la información recabada, los estudios realizados al respecto abarcan los últimos 20 años, especialmente porque hasta ese momento se comenzó a centrar la atención en la manera en que las proteínas virales eran capaces de modificar el ambiente celular en favor del ciclo de vida viral.

E2 regula genes celulares específicos

Los primeros trabajos en los que se evaluó la capacidad de E2 para regular la expresión de genes celulares se enfocaron en uno o unos pocos genes específicos como se describe en los siguientes apartados.

E2 de VPH regula negativamente la expresión de genes celulares

E2 regula a la baja el promotor de hTERT

Lee y colaboradores en el 2002, reportaron que la proteína E2 de diferentes VPH de bajo y alto riesgo es capaz de regular a la baja el promotor de la subunidad catalítica hTERT de la enzima Telomerasa humana (Steger, Schnabel & Schmidt, 2002).

Mediante ensayos de luciferasa evaluaron la incidencia de E2 de varios VPH en el promotor de hTERT utilizando diferentes modelos celulares y encontraron que esta proteína viral reguló negativamente al promotor de hTERT en todas las líneas celulares empleadas en el trabajo: C33A, COS-1, 293T y HeLa. Además, a través de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), demostraron que E2 se recluta activamente

en la región promotora de hTERT. Debido a que este promotor no posee sitios E2 consenso, se enfocaron en determinar el elemento *cis* responsable de su regulación a la baja.

Hallaron que mutando los sitios Sp1 en el promotor de hTERT se anulaba la actividad represiva mediada por E2 de VPH18, además, utilizando ensayos Luciferasa y ChIP, probaron que E2 se une a la región promotora de hTERT a través de Sp1 *in vivo*. Por lo que concluyeron que E2 de VPH18 inhibe la actividad transcripcional del promotor hTERT mediado por Sp1. Los autores discuten que E2 de VPH podría activar o reprimir la transcripción relacionada con Sp1 de una manera dependiente del contexto a través de interacciones proteína-proteína. Finalmente, este estudio asigna a la proteína viral E2 un papel en la inducción de senescencia y supresión del crecimiento celular (Steger, Schnabel & Schmidt, 2002).

E2 de VPH8 regula negativamente la expresión de integrina beta4

Otro estudio en 2004 reportó la regulación negativa de la expresión de integrina beta4 por E2 de VPH8 en queratinocitos primarios. La observación se realizó inicialmente a través de inmunocitoquímica y posteriormente se cuantificó con citometría de flujo (Oldak, et al., 2004).

A través de ensayos EMSA, encontraron que E2 de VPH8 es capaz de unirse a secuencias dentro del promotor de integrina beta4 con diferente afinidad de unión. Además, E2 de VPH8 reprimió el promotor de integrina beta4 en los experimentos de actividad luciferasa, al igual que únicamente el extremo C-terminal de E2 donde se ubica el dominio de unión a DNA de esta proteína indicando que la unión directa de E2 al promotor podría ser relevante para la supresión. Cabe resaltar que la represión fue dependiente de la cantidad de vector de E2 transfectado y se identificó una secuencia dentro del promotor de integrina β 4 que contribuye a la represión por el extremo C terminal de E2, se trata de un sitio potencial para la unión de E2 de acuerdo con un análisis bioinformático (Oldak, et al., 2004).

Para profundizar acerca de un posible mecanismo, se realizaron ensayos EMSA para determinar si la unión de E2 al promotor de la integrina β 4 interfiere con la unión de posibles factores de unión al ADN presentes en los extractos nucleares de queratinocitos

primarios. Encontraron que E2 desplaza un complejo de factores celulares que se unen a la secuencia potencial para la unión de E2 en el promotor de integrina $\beta 4$. Cuando se introdujeron mutaciones puntuales en dicha secuencia se impidió la unión del C-terminal de E2 de VPH8, pero no así la unión de los factores celulares desplazados por E2 (Oldak, et al., 2004).

Dado que la integrina beta4 es la principal integrina necesaria para la unión de los queratinocitos a la matriz subyacente, los autores concluyen que la participación de E2 en su regulación a la baja pudiera estar relacionada con un mayor desprendimiento de queratinocitos de la membrana basal permitiendo su movimiento hacia las capas suprabasales, lo cual podría asegurar que las células infectadas por el virus invadan el compartimento de amplificación de tránsito dentro del epitelio para continuar con el proceso de diferenciación necesario para que el virus cumpla con su ciclo de vida (Oldak, et al., 2004).

Tabla 2. E2 de VPH regula a la baja promotores celulares

Línea celular	Genotipo viral	Principales Genes Regulados	Fisiología	Abordaje Experimental	Referencia
		A la baja			
C33A	VPH18	hTERT	Inducción de senescencia y supresión del crecimiento celular	Ensayos de actividad luciferasa ChIP	Lee, et al., 2002
COS-1	VPH16				
293T	VPH11				
HeLa	VPH6b				
Queratinocitos primarios	VPH8	Integrina beta4	Desprendimiento de queratinocitos de la membrana basal	Citometría de flujo EMSA	Oldak, et al., 2004

				Ensayos de actividad luciferasa	
--	--	--	--	---------------------------------	--

E2 de VPH regula positivamente la expresión de genes celulares

La región bisagra de E2 de VPH8 activa el promotor de p21

En el mismo año 2002, Steger, Schnabel & Schmidt publicaron un artículo en el que reportaron que la región bisagra de E2 de VPH8 era suficiente para activar el promotor de p21 en células RTS3b a través de la interacción con Sp1 (Steger, Schnabel & Schmidt, 2002).

Los investigadores clonaron el promotor de p21 humano desde la posición -210 a +15, que contiene 5 sitios Sp1, en un plásmido con el reportero de luciferasa y lo cotransfectaron con cantidades crecientes de vectores de expresión de E2 de VPH8 o VPH18, de longitud completa o un mutante de delección que carece del dominio de transactivación NT, solo o en combinación con un vector de expresión para Sp1 humana. Los ensayos de actividad luciferasa mostraron mayor activación con la expresión de E2 de VPH8 sin el dominio NT y con sobreexpresión de Sp1, lo cual indicaba que el dominio de transactivación de E2 de VPH8 no era necesario para la activación del promotor de p21.

Posteriormente evaluaron la mutante con delección del dominio NT y la región bisagra de E2-VPH8 en un experimento similar al descrito previamente, encontrando que la región bisagra era suficiente para activar el promotor p21 y que sinergizaba con Sp1. Para medir el efecto de una posible expresión diferencial de las formas cortas de la proteína E2, realizaron inmunofluorescencias de las células RTS3b transfectadas transitoriamente con los plásmidos que expresan las distintas proteínas E2 de VPH8 (longitud completa, sin NT, sin bisagra y bisagra únicamente) marcadas con un epítipo que sirve como bandera o etiqueta (Flag). Los resultados mostraron que E2 sin NT y la región bisagra de E2 de VPH8 se localizaron en el núcleo y se expresaron a niveles comparables.

La interacción entre E2 de ambos genotipos (VPH8 y VPH18) y Sp1 se comprobó con ensayos de unión con fusiones a GST. Para identificar las regiones de E2 responsables de su unión a Sp1, los diferentes dominios de E2 se fusionaron con GST y se incubaron con Sp1 purificada. Encontraron que Sp1 interactuó con los dominios DBD (de unión a DNA) y TAD (de transactivación) de E2-HPV18, mientras que en el caso de E2-VPH8, Sp1 interactuó con el dominio DBD y la región bisagra, mostrando el mismo patrón cuando se utilizó Sp1 endógena presente en extractos nucleares de células HeLa.

Este trabajo discute un posible mecanismo de activación del promotor p21 por la región bisagra de E2 de VPH8 involucrando su interacción directa con Sp1, donde dicha interacción podría mediar la oligomerización de Sp1 y aumentar su afinidad por el promotor p21. Los autores proponen que la región bisagra de E2-VPH8 podría unirse al promotor p21 a través de Sp1 y promover el reclutamiento de otros factores coactivadores como p300. Finalmente, se concluyó que el papel de la región bisagra de E2 en la inducción de la expresión de p21 en queratinocitos infectados podría afectar significativamente su diferenciación, contribuyendo a la patogénesis inducida por VPH8 (Steger, Schnabel & Schmidt, 2002).

E2 de VPH8 sinergiza con C/EBP en la activación del promotor de involucrina

Un artículo de Hadaschik y colaboradores publicado en 2003 reportó que la proteína E2 de VPH8 es capaz de unirse a los factores C/EBP a través de su extremo C-terminal y sinergizar con ellos en la activación del promotor de involucrina en células RTS3b, las cuales poseen p53 no funcional (Hadaschik, et al., 2003).

Los experimentos consistieron en generar plásmidos reporteros de luciferasa bajo el control del promotor proximal de involucrina con el único sitio de unión para C/EBP silvestre y mutado. Estos plásmidos se cotransfectaron con plásmidos que expresaran C/EBP β o C/EBP α y E2-VPH8 de longitud completa o E2-VPH8 carente del extremo C terminal en células RTS3b y posteriormente se determinó la actividad luciferasa.

Los resultados mostraron que la co-expresión de C/EBP α y β con E2 de longitud completa condujo a una inducción sinérgica de la transactivación del promotor, a pesar de que este no poseía sitios de unión para E2. Sin embargo, esto no se observó cuando los plásmidos que expresaban los factores C/EBP se cotransfectaron con el plásmido de expresión que

codificaba la proteína E2 carente del extremo C terminal o cuando el plásmido reportero poseía el sitio de unión para C/EBP mutado. Además, demostraron mediante ensayos de coprecipitación que E2 y los factores C/EBP interactúan entre sí en el sitio de unión para C/EBP en el promotor de involucrina.

El trabajo propone que los factores C/EBP pueden reclutar proteínas E2 a promotores que carecen de sitios de unión E2 a través de la interacción proteína-proteína. Dado que la involucrina se expresa altamente en células diferenciadas, los autores hipotetizaron que el sinergismo entre E2 y C/EBP en la transcripción de este gen podría asegurar que la célula infectada se diferencie terminalmente y se complete el ciclo de vida del virus (Hadaschik, et al., 2003).

E2 de VPH8 activa el promotor de MMP9

En el año 2011 Akgul y colaboradores publicaron un trabajo en el que demostraron mediante experimentos EMSA que el promotor MMP9 contiene un sitio de unión para el regulador transcripcional E2 de VPH8 y que este es capaz de activar dicho promotor de una manera dosis dependiente en queratinocitos epidérmicos humanos (Akgul, et al., 2011).

MMP9 es una proteasa extracelular involucrada en la remodelación tisular, carcinogénesis y degradación de diferentes componentes de la Matriz Extracelular (Akgul, et al., 2011). En un análisis *in silico*, los autores encontraron una secuencia putativa de reconocimiento para E2 en la posición -1,115 a -1,104 bp en el promotor de MMP9 y la evaluaron en ensayos EMSA usando el oligonucleótido de dicha región y E2 VPH8 etiquetado con His.

Los resultados sugieren que E2 interactuó de forma específica de secuencia con su sitio consenso en el oligonucleótido, ya que mutando este sitio se anuló la interacción DNA-proteína. Por otro lado, para evaluar si E2 era capaz de regular al promotor MMP9 realizaron ensayos de luciferasa cotransfectando un plásmido indicador bajo el control del promotor MMP9 con cantidades crecientes de un plásmido que expresa E2 de VPH8 en queratinocitos de piel humana adulta normal de dos individuos sanos y en la línea celular de queratinocitos RTS3b. Se encontró que el gen E2 reguló al alza el promotor de

MMP9 de una manera dependiente de la dosis, donde a mayor cantidad de vector E2 transfectado, mayor activación del promotor y por lo tanto mayor actividad luciferasa.

En un experimento posterior infectaron queratinocitos humanos primarios con retrovirus que contenían el vector de expresión de E2 VPH8 o el vector vacío. Mediante RT PCR confirmaron que las células que expresaron E2 indujeron la transcripción de MMP9, mientras que en las células control (transducidas con el vector vacío) no pudo detectarse RNAm de este gen. Para determinar si la activación del promotor MMP9 dependía de la funcionalidad de los dominios DBD y TAD de E2 introdujeron mutaciones puntuales dentro de estos dominios del gen E2 VPH8 en los vectores de expresión, cotransfectaron transitoriamente y llevaron a cabo ensayos luciferasa. Los resultados mostraron que las mutaciones impidieron la regulación positiva del promotor MMP9, por tanto, concluyeron que ambos dominios de la proteína E2 de VPH8 son fundamentales para regular al promotor MMP9.

Utilizando la misma metodología decidieron evaluar si E2 pudiese estar regulando el promotor MMP9 a través del sitio de unión para E2, para ello mutaron este sitio en el vector indicador y lo cotransfectaron con el vector de expresión de E2 *wild type*. Encontraron que dicha mutación impidió la regulación positiva por E2 probando que la proteína viral E2 de VPH8 actúa como un activador del promotor MMP9 en virtud de su unión a su sitio E2BS en este promotor.

Finalmente, los autores examinaron el efecto de E2 sobre la expresión de MMP9 en cultivos organotípicos de queratinocitos usando inmunohistoquímica. Transdujeron el vector de expresión de E2 y el vector vacío en las células formadoras del cultivo encontrando que la expresión de MMP9 se restringió principalmente a células suprabasales a las que les fue transducido el gen E2, no se encontró expresión en el epitelio de control transducido con el vector vacío. De acuerdo con estos datos, E2 de VPH8 es capaz de activar el promotor de MMP9 en un sistema fisiológicamente relevante.

Dado que todo el trabajo estuvo centrado en infecciones de la epidermis por VPH8, se hipotetizó que la sobreexpresión de MMP9 por E2 podría estar involucrada en la modificación de la escama para inducir la fragilidad de la envoltura cornificada, lo cual favorecería el escape viral en las lesiones inducidas por VPH (Akgul, et al., 2011).

VPH16 regula positivamente la expresión de interleucina 10

De forma similar a los estudios previos, en el año 2011 Bermúdez Morales y colaboradores informaron que la proteína E2 de VPH16 regula la expresión de interleucina 10 (IL-10) en células de cáncer cervical C33A (Bermúdez-Morales, et al., 2011).

De acuerdo con trabajos previos el promotor de IL-10 posee un sitio de unión para E2 en la posición -2,203 a -2,191 bp, por ello se generaron plásmidos informadores clonando varios fragmentos del promotor de IL-10 río arriba del gen luciferasa considerando éste un punto de referencia. El plásmido informador se cotransfectó con plásmidos de expresión de E2-VPH16 o con el vector vacío en células C33A. Estos experimentos mostraron que la actividad del promotor completo incremento 6 veces con la expresión de E2, mientras que en células que fueron cotransfectadas con plásmidos que no contenían el sitio de reconocimiento para E2, la actividad disminuyó 2 veces con la presencia de E2.

Los niveles de actividad de los diferentes fragmentos del promotor fueron similares en ausencia de la proteína viral E2-VPH16. Por tanto, los investigadores hipotetizaron que E2 regula la expresión de IL-10 a través de su unión a su sitio de reconocimiento en el promotor de este gen. Posteriores ensayos EMSA revelaron que E2 se une de forma específica a su sitio de reconocimiento presente en el promotor de IL-10.

En otros experimentos, se midió la expresión de IL-10 mediante RT-PCR en células C33A transfectadas con cantidades crecientes de plásmidos de expresión de E2-VPH16 y en células sin transfectar. La expresión de IL-10 se observó únicamente en células transfectadas sugiriendo que la proteína E2 de VPH16 induce la transcripción del gen IL-10.

Los autores creen que la regulación de los niveles de IL-10 por E2 de VPH podría representar una vía mediante la cual el virus altera la respuesta inmune del hospedero e induce un estado de inmunosupresión que permite la persistencia de la infección viral (Bermúdez-Morales, et al., 2011).

Tabla 3. E2 de VPH regula al alza promotores celulares

Línea celular	Genotipo viral	Principales Genes Regulados	Fisiología	Abordaje Experimental	Referencia
		Al alza			
RTS3b	VPH8 VPH18	p21	Diferenciación	Ensayos de actividad luciferasa	Steger, Schnabel & Schmidt, 2002
RTS3b	VPH8	Involucrina	Diferenciación	Ensayos de actividad luciferasa	Hadaschik, et al., 2003
Queratinocitos epidérmicos humanos	VPH8	MMP9	Modificación de la escama para inducir la fragilidad de la envoltura cornificada- facilitar el escape de viriones	EMSA Luciferasa RT PCR Inmunohistoquímica- cultivos organotípicos	Akgul, et al., 2011
C33A	VPH16	IL-10	Estado inmunosupresor local	Luciferasa EMSA RT-PCR	Bermúdez-Morales, et al., 2011

E2 regula positivamente factores de *splicing*

E2 de VPH16 regula positivamente la expresión de SF2 / ASF

En el año 2004 otro artículo reportó que el factor de transcripción E2 de VPH16 regulaba la expresión de SF2 / ASF, un factor de empalme específico de secuencia involucrado en el empalme de pre-RNA y perteneciente al grupo de proteínas SR (McPhillips, et al., 2004). Este fue un primer acercamiento a la posibilidad de que E2 de VPH pudiera interferir en el procesamiento de RNA a través de regular la expresión de los factores de *splicing*.

La observación se realizó en la línea celular de osteosarcoma U2OS transfectada de forma estable con un vector de expresión de E2 versus el vector vacío. Los niveles de expresión de la proteína SF2 / ASF se analizaron mediante Western Blot encontrando un incremento de tres a cuatro veces en presencia de E2 de VPH16. Además, se observó un incremento en la expresión de SF2 / ASF en células W12E tras la diferenciación, estas células poseen el genoma de VPH de forma episomal, lo que significa que se mantiene la expresión de E2.

Estos resultados llevaron a los autores a especular que la infección por VPH podría contribuir a la inducción de la expresión del factor de corte y empalme alternativo SF2 / ASF tras la diferenciación de células epiteliales a través de la proteína viral E2. El artículo propone que una posible función de la regulación al alza de SF2/ASF es regular el empalme alternativo de transcripciones tardías de los genomas virales amplificados en las células diferenciadas del epitelio, facilitando la finalización del ciclo de vida del virus de VPH (McPhillips, et al., 2004).

E2 de VPH16 transactiva el promotor de SF2/ASF

Posteriormente, investigadores del mismo grupo de trabajo en el año 2009 publicaron un artículo en el que reportaron que la proteína E2 de VPH16 es capaz de transactivar el promotor de SF2/ASF (Mole, Milligan & Graham, 2009).

Amplificaron por PCR la región -1024 a 25 bp del promotor SF2/ASF y la clonaron en un vector río arriba del gen reportero CAT (enzima Cloranfenicol Acetil Transferasa). Realizaron transfecciones transitorias con este vector en clones de la línea celular U2OS que expresan de forma estable la proteína E2 de VPH16. Los resultados mostraron que

la actividad CAT incrementó significativamente en presencia de E2 únicamente en las clonas que expresaron bajas cantidades de esta proteína viral.

Realizaron otros experimentos para corroborar estas primeras observaciones utilizando el mismo vector informador y cotransfectando con diferentes cantidades de un vector de expresión de E2 o con el vector vacío en células HeLa. Encontraron que la actividad CAT incrementó al doble cuando se cotransfectó con poca cantidad de vector de expresión de E2, siendo este incremento menor en las co-transfecciones efectuadas con mayor cantidad de vector de expresión, sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos.

En experimentos similares cotransfectaron con vectores que expresaran E2 *wild type* y mutado en alguno de sus dos dominios, encontrando que E2 mutado en el dominio de transactivación era incapaz de activar significativamente el promotor SF2/ASF. De estos datos los autores dedujeron que el dominio de transactivación de E2 era necesario para la estimulación positiva del promotor SF2 / ASF, posiblemente mediante la unión de un coactivador.

Posteriormente, en experimentos de ChIP demostraron la presencia de E2 en el promotor SF2/ASF transfectado y endógeno en células HeLa, a las que se les introdujo un vector de expresión de la proteína E2 completa o un vector vacío como control. En este trabajo se identificó un sitio de unión para E2 en el promotor de SF2/ASF en la posición -782 bp respecto al sitio de inicio de la transcripción, sin embargo, este no interactuó con E2 en los ensayos EMSA debido quizá a algunas diferencias de secuencia con el sitio E2BS consenso. Posteriormente se identificó la región -684 a -482 bp en el promotor SF2/ASF como la encargada de interactuar de forma indirecta con E2 VPH16, a través de la formación de complejos.

SF2/ASF posee funciones importantes además del empalme alternativo, como regular la exportación, la estabilidad y la traducción del RNAm, por lo que su regulación al alza podría afectar de manera importante la vía de expresión génica. Finalmente, los autores proponen que VPH16 a través de E2 regula factores de corte y empalme alternativos clave como SF2/ASF durante la diferenciación para garantizar la expresión génica adecuada del virus y la finalización de su ciclo de vida (Mole, Milligan & Graham, 2009).

E2 de VPH de alto riesgo regula positivamente la expresión de SRSF3

En el año 2016, el mismo grupo de investigación publicó un artículo con nuevas observaciones referentes al papel de la proteína E2 en la regulación de factores de empalme alternativo. En este trabajo se informa que la proteína E2 de VPH de alto riesgo es capaz de regular positivamente la expresión de SRSF3 para promover la expresión de la proteína L1 en queratinocitos infectados diferenciados (Klymenko, et al., 2016).

De acuerdo con un reporte previo de este mismo grupo, se tenía la observación de que la infección con VPH16 regulaba positivamente la expresión de las proteínas SR: SRSF1 (SF2/ASF), SRSF2 y SRSF3 en células epiteliales diferenciadas. Para averiguar si la proteína E2 era la responsable de esta regulación como se observó para SRSF1, se transfectaron células U2OS y se seleccionaron dos clonas con expresión estable de E2 de VPH16, una de ellas con alta expresión de E2 y otra con baja expresión corroborada mediante WB. Dichas clonas se transfectaron transitoriamente con vectores reporteros que expresan el gen luciferasa bajo el control de los promotores de SRSF1 (SF2/ASF), SRSF2 y SRSF3.

Los datos de actividad luciferasa mostraron que E2-VPH16 reguló específicamente todos los promotores de forma diferencial: el promotor de SRSF1 se vio regulado positivamente solo en la clona que expresa bajos niveles de E2, pues una expresión alta disminuyó la actividad del promotor; los promotores de SRSF2 y SRSF3 se vieron regulados positivamente en ambas clonas, pero con mayor potencia el promotor de SRSF3.

En otros experimentos midieron los niveles de proteína en células epiteliales cervicales CIN612-9E infectadas con VPH31 sin diferenciar y tras la diferenciación. Encontraron que los niveles de SRSF1, SRSF2 y SRSF3 incrementaron tras la diferenciación en queratinocitos VPH31 positivos demostrando que la regulación de estas proteínas es observable en la infección por otros VPH de alto riesgo solo tras la diferenciación.

Posteriormente transfectaron queratinocitos normales de prepucio con VPH31 *wild type* o VPH31 con una mutación puntual que inactiva el TAD de E2 y midieron la expresión de las proteínas SR mediante WB. Los resultados mostraron que la proteína E2 mutante fue menos eficaz para inducir la expresión de las proteínas SR, por lo que se concluyó que

el dominio de transactivación es necesario para el control de los niveles de expresión de las proteínas SRSF1, SRSF2 y SRSF3 por E2 de VPH de alto riesgo.

Además, se encontró que en los queratinocitos VPH31 positivos con E2 mutado en TAD la expresión de L1 disminuyó considerablemente en comparación con el genotipo *wild type*. Con esta observación como antecedentes se realizaron ensayos para averiguar si las proteínas SR cuya expresión se induce tras la diferenciación por E2 (a través de su dominio de transactivación) eran necesarias para la expresión de L1. Para ello se utilizaron siRNAs contra las proteínas SR de interés (1, 2 y 3) y controles SR en células VPH16 positivas y encontraron que solamente el siRNA contra SRSF3 disminuyó 50-55% la expresión de L1 en células diferenciadas, además, la sobreexpresión de SRSF3 en células VPH16 positivas indiferenciadas indujo la expresión de L1, denotando que SRSF3 podría estar regulando significativamente la expresión de la proteína de la cápside L1 a nivel de empalme alternativo en queratinocitos.

El RNAm E4[^] L1 es el principal RNA que se conoce codifica para la síntesis de L1. Mediante RT-PCR y qRT-PCR los investigadores encontraron que los niveles de RNAm E4[^] L1 disminuyeron significativamente en células W12E VPH16+ diferenciadas tratadas con el siRNA contra SRSF3 observándose un incremento de RNAm L2L1 *versus* el siRNA control, sin embargo, esta última observación también se presentó en el siRNA contra SRSF1. Con estos resultados los autores hipotetizan que SRSF3 puede controlar la expresión de la proteína L1 promoviendo la expresión de RNAm E4[^] L1. Todos los experimentos que los autores presentan en este artículo son en modelos celulares VPH positivos, por lo que otras proteínas virales pudieran estar involucradas en las observaciones realizadas.

En este estudio se plantea que la proteína E2 de VPH de alto riesgo regula positivamente la expresión de SRSF3 posiblemente a nivel de inicio de la transcripción tras la diferenciación del epitelio infectado. Como consecuencia la expresión de L1 se vería favorecida, ya que, de acuerdo con los datos SRSF3 promueve el empalme alternativo que da origen al RNAm E4[^] L1. Finalmente, en este estudio se postula a la proteína viral E2 como un importante regulador de eventos tardíos importantes en el ciclo de vida del virus (Klymenko, et al., 2016).

Tabla 4. E2 de VPH de alto riesgo regula al alza factores de <i>splicing</i>					
Línea celular	Genotipo viral	Principales Genes Regulados	Fisiología	Abordaje Experimental	Referencia
		Al alza			
U2OS W12E	VPH16	SF2/ASF	Regular el empalme alternativo de transcripciones tardías de los genomas virales	WB	McPhillips, et al., 2004
U2OS HeLa	VPH16	SF2/ASF	Garantizar la expresión génica adecuada del virus en etapas tardías de la infección	Ensayos de actividad CAT EMSA	Mole, Milligan & Graham, 2009
U2OS NFKs	VPH16 VPH31	SRSF1, SRSF2 y SRSF3	Regulación de L1	Ensayos de luciferasa	Klymenko, et al., 2016

E2 es capaz de regular una gran cantidad de genes celulares. Varios estudios recientes se han enfocado en evaluar perfiles de expresión génica en presencia de la proteína viral E2 a través de técnicas como microarreglos, microarreglos de exón y RNA-Seq.

E2 de VPH16 modifica la expresión de genes involucrados en apoptosis, proliferación y diferenciación celular

En nuestro grupo de trabajo, Ramírez Salazar y colaboradores en el año 2011 publicaron un artículo en el que se reporta que la proteína E2 de VPH16 modifica la expresión a nivel transcripcional de una gran cantidad de genes celulares tanto positiva como negativamente (Ramírez-Salazar, et al., 2011). Para ello se realizó la construcción de un vector adenoviral recombinante para sobreexpresar E2 de VPH16 en células C33A y posteriormente se analizó mediante microarreglos el perfil de expresión génica en las células positivas para E2 cuya expresión se corroboró mediante PCR, utilizándose como control las células infectadas con el adenovirus vacío y las células sin infectar. Los resultados encontrados mostraron que E2 de VPH16 regula 1048 genes a la baja y 581 genes al alza, dentro de los que se encuentra TAF1, cuya expresión se modificó positivamente 1.89 veces de cambio, lo que indica que la proteína E2 de VPH16 regula positivamente la transcripción de TAF1 en la línea celular C33A.

Para averiguar el papel de los genes regulados por E2 en la fisiología de la célula infectada, se llevó a cabo un análisis de ontología genética donde se pudieron mapear las principales vías de señalización celular modificadas. Los resultados indicaron que la vía WNT se ve modificada mayormente, siendo ésta un punto de convergencia de genes involucrados en la regulación de varios procesos celulares, como la apoptosis, la proliferación y diferenciación celular (Ramírez-Salazar, et al., 2011). Mediante qRT-PCR se corroboró la regulación negativa de la transcripción de MYCN, JAG1 y MAPK13 por E2 de VPH16, estos genes poseen un papel clave en los procesos celulares antes mencionados. Finalmente, se concluyó que la proteína E2 de VPH16 tiene efectos reguladores sobre la expresión génica celular en C33A independientemente de otras proteínas virales (Ramírez-Salazar, et al., 2011). Estos efectos podrían estar mediados por las interacciones de E2 con proteínas celulares afectando con ello procesos fisiológicos importantes en la célula infectada y favoreciendo un entorno conveniente para el ciclo replicativo del virus.

E2 de genotipo de alto riesgo modifica la expresión de genes inmunoasociados

Siguiendo este mismo enfoque, Sunthamala y colaboradores en 2014 publicaron un trabajo en el que se evaluó el perfil de expresión génica modificado por la proteína E2 de genotipos de alto riesgo en queratinocitos humanos primarios (Sunthamala, et al., 2014). A través de microarreglos identificaron el perfil de expresión génica de células transducidas con adenovirus recombinantes que poseían un vector de expresión de E2 fusionado con GFP y células a las que se les transdujo el vector solo con GFP. El análisis de datos indicó que E2 de VPH16 reguló 178 genes positivamente y 601 genes negativamente. De acuerdo con el análisis de ontología génica, 21 de los 178 genes regulados positivamente y 71 de los 601 genes regulados negativamente están involucrados en respuesta inmune. Además, este análisis mostró que E2 modifica una gran cantidad de vías de señalización y regula muchos genes involucrados en el proceso de transcripción: factores y cofactores, remodeladores de la cromatina y factores de elongación.

Los autores centraron su atención en dos genes de importancia en eventos de respuesta inmune contra virus: STING e IFN- κ . Para ello transdujeron con virus recombinantes vectores de expresión de E2 de VPH16, E2 de VPH18 y el vector vacío, todos acoplados a GFP en tres líneas celulares de queratinocitos humanos primarios: HPK, TB3 y NUH49. Llevaron a cabo análisis de qRT-PCR para medir los niveles de RNAm de estos genes y encontraron que E2 de ambos genotipos disminuyó los niveles de RNAm de STING en HPK y NUH49, igualmente los niveles de RNAm de INF- κ disminuyeron notablemente en las tres líneas celulares: HPK, TB3 y NUH49. Posteriormente utilizando la misma metodología evaluaron que dominio de la proteína E2-VPH8 era responsable de la regulación a la baja de estos genes. Encontraron que el dominio de transactivación de E2 parece jugar un papel esencial en la regulación de STING e IFN- κ .

Para abordar una posible relación entre estos genes (STING e IFN- κ) silenciaron con siRNAs cada uno de ellos en células HPK y determinaron el efecto sobre la expresión del otro, encontraron que el silenciamiento de STING redujo 20% la transcripción de IFN- κ . Por otra parte, el silenciamiento de IFN- κ redujo la transcripción de ISGs (Interferon-Stimulated genes) como IFIT1, IFIT3, OAS1 y OAS2. En experimentos posteriores se

inmunoestimuló con ácido policitídílico células HPK transducidas para expresar el dominio TAD de E2-VP18 acoplado a GFP y GFP como control y se midió mediante RT PCR los niveles de RNAm de STING e IFN- κ . Los resultados encontrados muestran que el dominio TAD redujo significativamente la transcripción de ambos genes incluso tras la estimulación y se observó también una regulación a la baja de varios ISGs (IFIT3, IFIT1, MX1, MX2, OAS1, OAS2, OAS3), siendo este efecto aún más potente que el observado tras el silenciamiento de IFN- κ .

Finalmente, los investigadores reportaron hallazgos similares en muestras clínicas de lesiones cervicales VPH positivas con expresión de E2, en las cuales el nivel RNAm de STING e IFN- κ fue notablemente menor que en las muestras VPH negativas. Los resultados que se muestran en este trabajo muestran que la proteína E2 de VPH de alto riesgo juega un papel importante en la modulación de la respuesta inmune antiviral a través de la regulación transcripcional de genes inmunoasociados favoreciendo la persistencia de la infección necesaria para la progresión de las lesiones hacia cáncer cervicouterino (Sunthamala, et al., 2014).

E2 regula la expresión de 74 genes celulares y promueve el empalme alternativo en genes de adhesión y motilidad

En ese mismo año 2014, se publicó otro artículo en el que de igual manera se evaluó el perfil de expresión génica en células U2OS transfectadas con un vector de expresión de E2 de VP16 y seleccionadas para expresar esta proteína viral de forma estable sin afectar el crecimiento celular. Los resultados mostraron 74 genes regulados diferencialmente con un *fold change* mínimo de 2 con relación al control; de ellos, 33 genes fueron regulados positivamente y 41 negativamente (Gauson, et al., 2014).

Posteriormente realizaron un análisis de los 74 genes modificados en su expresión por E2 identificando 5 redes génicas con funciones en expresión génica, reparación de DNA, cáncer, entre otras. Al realizar el análisis de secuencia de los promotores de los genes regulados por E2, los investigadores identificaron una secuencia que coincide con los sitios de unión para los factores de transcripción OBOX1 y PITX3, por lo que hipotetizaron que E2 podría regular la expresión de estos genes a través de su interacción con dichos factores.

Además, el análisis de datos de la matriz de exones reveló 522 genes con exones empalmados diferencialmente inducidos por E2 sugiriendo que esta proteína viral posee un rol importante como regulador del empalme alternativo. El posterior análisis DAVID e IPA de estos genes mostró que se encuentran involucrados en procesos de adhesión / motilidad y reorganización citoesquelética. Con este precedente, realizaron ensayos de cicatrización de heridas con células U2OS que expresan E2 versus el control (vector). Encontraron que las células con expresión de E2 se retrasaron en cerrar el espacio entre las células en comparación con las células control, estos resultados sugieren que E2 modula la motilidad celular y capacidad para migrar a través de regular el empalme alternativo de genes implicados en estos procesos.

Los autores concluyeron que E2 de VPH16 puede regular el genoma del huésped en múltiples niveles controlando la expresión génica celular, así como el corte y empalme de los RNAm (Gauson, et al., 2014). En este estudio como en algunos trabajos previos, se hipotetiza que E2 puede regular el genoma del huésped mediante su interacción con factores y/o cofactores transcripcionales que se dirigen directamente a los promotores. En cuanto al mecanismo por el cual E2 regula el empalme alternativo se propone una interacción directa con factores de empalme regulando su estabilidad.

E2 de VPH16 modifica el perfil de expresión génica celular

En el año 2019 Evans y colaboradores publicaron un trabajo en el cual demostraron a través de RNA-seq que E2 de VPH16 modificaba el perfil de expresión de 592 genes celulares en la línea celular NOK: 167 genes positivamente y 395 negativamente, muchos de estos también se regularon de la misma manera por el genoma completo de VPH16. Tanto VPH16 como E2 regularon negativamente el conjunto de genes del complejo U-ISGF3, los cuales están involucrados en la respuesta inmune antiviral mediada por IFN (Evans, et al., 2019). A través de WB se corroboraron estos datos, evaluándose la expresión a nivel de proteína de IFIT1, MX1, STAT1 e IRF9 en clonas NOK que expresan E2.

Posteriormente se realizó la evaluación a nivel de RNAm de los genes IFIT1, MX1, OAS1, IFI27 e IFI44L y sus activadores cadena arriba STAT1, IRF9 e IFN κ en las clonas con expresión de E2 encontrando una disminución del RNAm de todos estos genes respecto

al control. Esto mostró claramente que E2 de VPH incidía de manera significativa en la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune innata contra virus. En experimentos similares, se evaluó si las oncoproteínas E6 y E7 al igual que E2 regulaban a la baja la transcripción de los genes IFIT1, MX1, OAS1, IFI27, IFI44L, STAT1 e IFN κ , hallaron que E2 fue el represor más fuerte para todos estos genes inmunes innatos.

Determinaron que la represión que ejerce la proteína viral E2 sobre la transcripción de IFIT1, MX1 e IFN- κ es parcialmente reversible utilizando un siRNA contra E2, esta observación se corroboró a nivel proteína para IFIT1. Los investigadores creen que esto puede deberse a la presencia de niveles residuales de E2 posterior al tratamiento o a que E2 pudiera estar instaurando marcas epigenéticas en los genes ocasionando una represión constante independientemente de los niveles de E2.

En otros experimentos se trataron células NOK, NOK que expresan E2 y NOK con el genoma completo de VPH16 con una desmetilasa de DNA (5-aza-2-desoxicitidina) y posteriormente se midió el RNAm de IFIT1, MX1 y los reguladores STAT1, IRF9 e IFN- κ . Los resultados mostraron que la represión transcripcional de estos genes por E2 y por todo el genoma de HPV16 se alivia con el tratamiento, lo que indica que la metilación del DNA puede ser un mecanismo importante por el que E2 de VPH regula a la baja los genes inmunoasociados. Los niveles de proteína MX1 e IFIT1 se midieron por WB en los mismos grupos experimentales confirmando los resultados observados a nivel de RNAm.

Cuando se sobreexpresó E2 en células N/Tert-1 los niveles de expresión de la proteína IFIT1 y MX1 fueron reprimidos por E2 en esta línea celular. Además, la expresión a nivel de RNAm de IFIT1, MX1, OAS1, IFI44L, STAT1 se redujo significativamente por E2 en esta línea celular, no así IFI27 e IFN κ , por lo que los autores proponen que el patrón de represión de genes inmunes innatos por E2 no es igual en todos los tipos de queratinocitos.

Finalmente, se realizó un análisis *in silico* con datos del Atlas del Genoma del Cáncer en el que la pérdida de expresión del gen E2 en cánceres de cabeza y cuello VPH16 positivos se relacionó con una disminución de la represión del conjunto de genes U-ISGF3. A partir de estos datos, los autores concluyeron que los cambios en la expresión génica de la célula hospedera inducidos por E2 de VPH16 podrían ser fisiológicamente

relevantes y favorecer de manera importante el ciclo de vida del virus a través de reprimir la respuesta inmune innata antiviral (Evans, et al., 2019).

Tabla 5. E2 de VPH de alto riesgo regula una gran cantidad de genes celulares

Línea celular	Genotipo viral	Principales Genes Regulados		Fisiología	Abordaje Experimental	Referencia
		A la baja	Al alza			
C33A	VPH16	1048	581	Apoptosis, proliferación y diferenciación celular	Microarreglos	Ramírez-Salazar, et al., 2011
HPK TB3 NUH49 Muestras clínicas VPH+	VPH16 VPH18	601 (71) STING e IFN-κ	178 (21)	Evasión de la respuesta inmune innata	Microarreglos qRT-PCR	Sunthamala, et al., 2014
U2OS		41	33	Cáncer, motilidad celular <i>Splicing</i>	Microarreglos de Exon	Gauson, at al., 2014
NOK N/Tert-1	VPH16	395 IFIT1, MX1, STAT1, IRF9	167	Respuesta inmune innata	RNA-seq WB	Evans, et al., 2019

Trabajos recientes

E2 de VPH18 regula a la baja los RNA mitocondriales no codificantes antisentido 1 y 2 (ASncmtRNAs) en queratinocitos humanos HFK

En otro estudio publicado en el año 2018, Villota y colaboradores informaron que la proteína E2 de VPH18 regula a la baja los RNA mitocondriales no codificantes antisentido 1 y 2 (ASncmtRNAs) en queratinocitos humanos HFK. Una observación previa mostró que los ASncmtRNAs se encuentran regulados negativamente en las líneas celulares HeLa y SiHa, las cuales contienen el genoma de VPH18 y VPH16, respectivamente (Villota, et al., 2012).

Para abordar si la proteína E2 se relaciona con este efecto, se transdujeron células HFK con un vector lentiviral que contiene el gen E2 de VPH18 y el vector vacío, la expresión de E2 se corroboró por inmunofluorescencia. Mediante RT-PCR se determinaron los niveles de los dos ASncmtRNAs y encontraron que disminuían por la expresión de E2 en el pasaje 3.

Posteriormente se evaluó la capacidad de las células para proliferar y se encontró que la expresión de E2 de VPH18 extendía la vida replicativa de las células HFK hasta el pasaje 26 en comparación con las células de control (Mock) que solo soportaban el pasaje 8. Las células Mock se caracterizaron por volverse senescentes en el pasaje 8 y arrestarse en G1 junto con un incremento de expresión de p21, por otro lado, las células con expresión de E2 extendieron su vida replicativa hasta el pasaje 26 en el cual sufrieron senescencia, arresto en G2-M y disminución de los niveles de p21. La expresión de la proteína E2 durante estos pasajes tendió a disminuir y los niveles de los dos ASncmtRNAs se comportaron de manera diferente: ASncmtRNAs-1 se mantuvo reprimido a partir del pasaje 3 hasta el 26, mientras que ASncmtRNAs-2 disminuyó en los pasajes 3 a 15, incrementando su expresión en los últimos pasajes (15-26).

Debido a que los ASncmtRNAs se expresan en células proliferantes normales y en las líneas celulares tumorales su expresión está regulada negativamente, se propone que pueden fungir como supresores de tumores (Burzio, et al., 2009). Por lo tanto, en este trabajo se concluyó que la regulación negativa de los ASncmtRNAs por E2 podría

establecer una nueva función para esta proteína viral durante la transformación celular inducida por VPH18.

Tanto E2 de VPH16 como el genoma completo viral regulan negativamente los niveles de RNAm y proteína de TWIST1 en la línea celular N/Tert-1

En un estudio reciente publicado en el año 2020, Fontan y colaboradores informaron que tanto E2 de VPH16 como el genoma completo viral regulan negativamente los niveles de RNAm y proteína de TWIST1 en la línea celular N/Tert-1 (Fontan, et al., 2020). Los genes diana de TWIST1, Vimentina y N-cadherina, también se vieron reprimidos a nivel transcripcional por E2 y VPH16. En otros experimentos, los autores evaluaron la posibilidad de que E2 reprimiera la transcripción del gen a través de la metilación de su promotor. Para ello, trataron a las líneas celulares con decitabina, un inhibidor de la DNA metilasa, y encontraron que los niveles de TWIST1 no se alteraron después del tratamiento. De esto concluyeron que E2 no regula a TWIST1 a través de la metilación de su promotor.

Posteriormente se llevaron a cabo ensayos de actividad luciferasa en los que se cotransfectó transitoriamente una construcción que contenía el promotor TWIST1 río arriba del gen de luciferasa con un vector de expresión de E2 en células N/Tert-1, también se utilizó una construcción que responde a E2 como control para confirmar que los cambios observados no se debían a la toxicidad de E2 en las células. E2 reprimió el promotor de TWIST1, pues la expresión de esta proteína viral ocasionó una reducción de aproximadamente 10 veces en la actividad luciferasa. Los experimentos de ChIP realizados mostraron que E2 se une a la región promotora de TWIST1 promoviendo un incremento en la marca epigenética represiva H3K9me2. De estos datos, los autores concluyeron que E2 es capaz de interactuar con el promotor de TWIST1 directamente y modificar el entorno epigenético del promotor conduciendo a la disminución observada de la transcripción del gen.

Los investigadores en estudios previos demostraron que E2 ralentizaba la capacidad de las células U2OS para cerrar heridas en cultivos en monocapa (Gauson, et al., 2014). Durante el cierre de herida ocurre un proceso de transición epitelio mesénquima (EMT) donde las células epiteliales heridas cambian sus características para promover la

migración, por lo que los autores proponen que E2 pudiera influir sutilmente en la EMT. Para abordar esta posibilidad realizaron ensayos de "raspado" en el modelo celular N/Tert-1 y encontraron que al igual que en U2OS la expresión de E2 redujo la tasa de cicatrización de heridas. Interesantemente el genoma completo de VPH16, pero no las oncoproteínas E6 y E7 mostró este mismo resultado.

Finalmente, se realizó la evaluación de la expresión del RNAm y proteína TWIST1 en 2 líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello positivas para VPH16. Una de las líneas celulares mantenía el genoma viral episomal y por tanto se conservaba la expresión de E2, mientras que la otra poseía el genoma integrado perdiéndose la expresión de E2. Los autores hallaron que en la línea celular que expresaba E2, la expresión de TWIST1 tanto a nivel de RNAm como de proteína disminuyó significativamente en comparación con la línea celular sin expresión de E2. Estos datos basados en modelos celulares fisiológicamente importantes apoyan la hipótesis de que la proteína viral E2 de VPH16 reprime la expresión del gen TWIST1 durante la infección viral. Los investigadores plantean que E2 a través de reprimir la expresión de TWIST1 podría apoyar un entorno u estado epitelial favorable para la replicación del virus (Fontan, et al., 2020).

Dado que la expresión elevada de TWIST1 se ha asociado con una menor supervivencia en varios cánceres y atenuación de la respuesta a fármacos quimioterapéuticos, E2 podría fungir como un supresor tumoral en este contexto a través de regular a la baja la expresión de TWIST1.

E2 de VPH16 regula positivamente la expresión de TAF1 en C33A

Nuestro grupo de investigación informó en este mismo año 2020 que E2 de VPH16 regula positivamente la expresión a nivel de RNAm y proteína de TAF1 y su gen diana p27 en la línea celular VPH negativa C33A (Sánchez-Ramos, Pozo-Molina & Garrido E., 2020). Se utilizó un sistema lentiviral para expresar el gen E2 de VPH16 en esta línea celular durante varias semanas. Posteriormente se midió la expresión de E2 mediante RT-qPCR y se evaluó su actividad biológica utilizando luciferasa como gen indicador. En células positivas para E2 se observó un aumento estadísticamente significativo en los niveles de RNAm y proteína del factor de transcripción basal TAF1 y p27. La regulación positiva de

TAF1 por E2 podría promover un entorno celular transcripcionalmente favorable que permita que el virus de VPH complete con éxito su ciclo de replicación.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que muestra que la proteína viral E2 de VPH16 regula al alza la expresión de TAF1, sin embargo, aún queda por dilucidar el mecanismo. Observaciones de nuestro grupo muestran que la regulación que ejerce E2 de VPH16 sobre la expresión de TAF1 difiere entre líneas celulares que se distinguen por el estatus del gen p53 y que dicha regulación podría ser a nivel transcripcional. Por tanto, creemos que la proteína p53 tiene un papel significativo en la regulación a nivel transcripcional del gen TAF1 por E2 de VPH16. Y en base a esta hipótesis nos planteamos como siguiente objetivo realizar el análisis del promotor del gen TAF1 en busca de información acerca de su estado epigenético y que factores de transcripción poseen sitios de unión en esta región, para posteriormente investigar cuales de ellos se conoce que interactúan con E2, p53 o ambos.

Tabla 6. Trabajos recientes acerca de la regulación que ejerce E2 de VPH de alto riesgo sobre genes celulares

Línea celular	Genotipo viral	Principales Genes Regulados		Fisiología	Abordaje Experimental	Referencia
		A la baja	Al alza			
HFk	VPH18	ASncmtRNA-1 ASncmtRNA-2		Inmortalización celular	RT-PCR	Villota, et al., 2018
N/Tert-1	VPH16	TWIST1 Genes diana Vimentina N-Cadherina		Reducción en la tasa de cicatrización de heridas	RNA-Seq qRT-PCR WB Luciferasa	Fontan, et al., 2020

				(supresión de EMT)	ChIP	
C33A	VPH16		TAF1	E2 podría regular una gran cantidad de genes celulares a través de TAF1	qRT-PCR WB	Sánchez-Ramos, Pozo-Molina & Garrido E., 2020

7.2. Análisis del promotor TAF1 en EPD

Eukaryotic Promoter Database (EPD) es una base de datos de promotores eucariotas reconocidos por la enzima RNA Pol II cuyo sitio de inicio de la transcripción (TSS) ha sido determinado experimentalmente. La región promotora del gen TAF1 se definió, para este estudio, como -1000 bp upstream del sitio de inicio de la transcripción. La búsqueda se realizó en EPDnew para TAF1 especie *homo sapiens* y se efectuó un análisis robusto de su promotor mediante esta plataforma.

La investigación en EPDnew mostró información relevante acerca del estado transcripcional de la región promotora del gen TAF1. Específicamente, se encontró que presenta marcas epigenéticas, tales como: la marca bimodal H3K4me1 y marcas activadoras como H3K4me3 y H3K27ac; estos y otros datos se conjuntan en la plataforma a partir de experimentos ChIP-Seq, ENCODE y otros recursos (Figura 12).

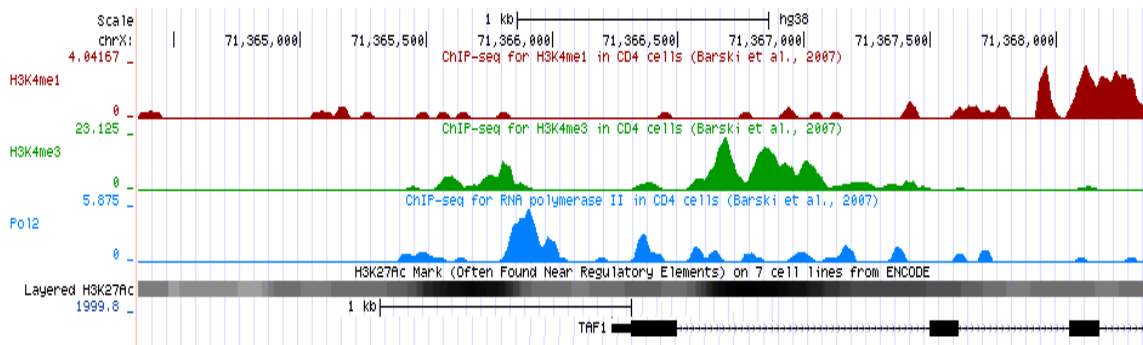


Figura 12. Entorno epigenético de la región cromosómica donde se ubica el gen TAF1. La imagen muestra gráficas que representan datos experimentales acerca de la presencia de marcas epigenéticas en la región cromosómica donde se ubica el gen TAF1, también se indica la unión de la RNAPol-II (gráfica azul). La información anterior muestra el estado transcripcional de esta región cromosómica de acuerdo con datos obtenidos de experimentos ChIP-Seq y bases de datos como ENCODE (*Eukaryotic Promoter Database* (EPD)).

La búsqueda de motivos proximales *cis* reguladores en el promotor de TAF1 reveló 4 cajas GC en las posiciones -306, -367, -702 y -837 bp con un valor de $p=0.001$ (Figura 13). El promotor central no presentó caja TATA con valor p significativo, mientras que el elemento BRE no se logró rastrear en la plataforma. Estos datos indican que se trata de un promotor *TATA less* que una factores en GC como Sp1, cuyas interacciones proteína-

proteína permiten ubicar factores distales transreguladores en proximidad con el complejo de inicio de la transcripción.

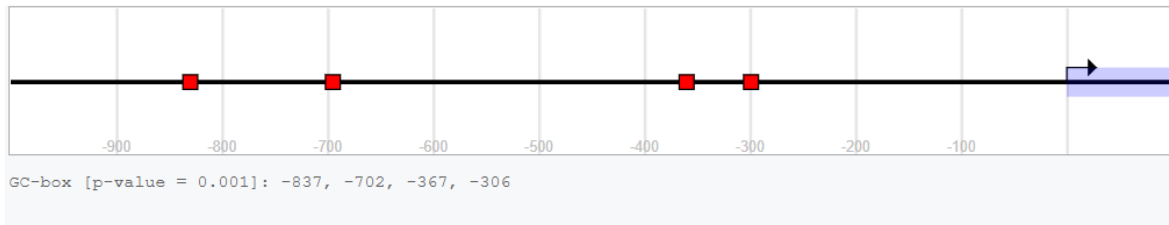


Figura 13. MOTIVOS CAJA GC EN EL PROMOTOR DE TAF1. Se muestran cuatro cajas GC potenciales (cajas rojas) ubicadas en el promotor de TAF1 en -306, -367, -702, -837 bp; p-value=0.001. El sitio de inicio de la transcripción se muestra con una flecha negra (Eukaryotic Promoter Database).

Como se mencionó anteriormente, la secuencia de la región promotora del gen TAF1 se definió como -1000 bp upstream del sitio de inicio de la transcripción y se obtuvo en EPDnew. Posteriormente se realizó un análisis más detallado de qué factores de transcripción específicos podrían estar uniéndose a este promotor para la regulación transcripcional del gen TAF1.

7.3. Factores de transcripción con sitios de unión en el Promotor del gen TAF1

PROMO es un programa que predice sitios de unión potenciales en determinada(s) secuencia(s) de DNA para una variedad de factores de transcripción. Hace uso de la base de datos TRANSFAC (Wingender et al., 2001) como fuente de motivos *cis* y factores de transcripción conocidos, a partir de los cuales construye matrices de ponderación.

Mediante este programa se evaluó la secuencia promotora del gen TAF1 en busca de motivos *cis* de unión para factores de transcripción que pudieran dar una pista del mecanismo de regulación de este gen. Se encontraron sitios para 19 factores con un margen de disimilitud menor o igual al 0.5% (Figura 14).

Factors predicted within a dissimilarity margin less or equal than 0 % :

0 YY1 [T00915]	1 TFIID [T00820]	2 GR [T05076]	3 GR-beta [T01920]
4 C/EBPbeta [T00581]	5 GR-alpha [T00337]	6 AP-2alphaA [T00035]	7 c-Myc [T00140]
8 ER-alpha [T00261]	9 TFII-I [T00824]	10 STAT4 [T01577]	11 FOXP3 [T04280]
12 PR.B [T00696]	13 PRA [T01661]	14 IRF-2 [T01491]	15 c-Ets-1 [T00112]
16 Elk-1 [T00250]	17 ATF3 [T01313]	18 Pax-5 [T00070]	

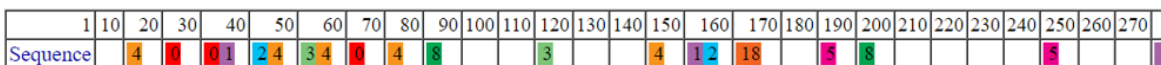


Figura 14. Factores con sitio de unión en el promotor de TAF1. Se muestran 19 factores con sitio/s de unión en el promotor del gen TAF1, predichos con un margen de disimilitud igual o menor a 0.5%. PROMO de Algen.

7.4. Factores de transcripción con sitio de unión en el Promotor TAF1 interactúan con p53

Para determinar la incidencia de la proteína p53 en la transcripción del gen TAF1, se planteó el objetivo de indagar que factores con sitio de unión en el promotor de TAF1 interactúan con p53. Para ello, se realizó una búsqueda en la base de datos BioGRID (*Biological General Repository for Interaction Datasets*) del interactoma de p53, recopilado de 1417 publicaciones (figura 15).

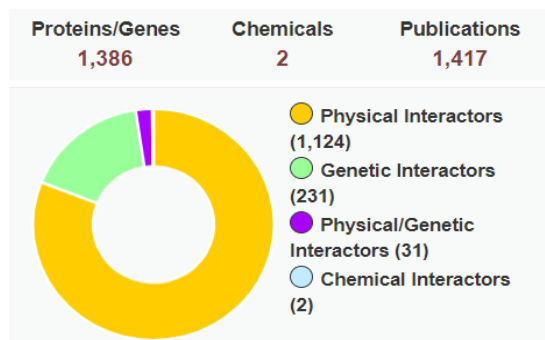


Figura 15. Interactoma de p53. Se muestra la clasificación de 1388 interactores de p53 por tipo de interacción: física, genética, física/genética o química. La información se conjunta de 1417 publicaciones en la plataforma BioGRID.

El análisis del interactoma de p53 determinó que de los 19 factores de transcripción capaces de unirse al promotor TAF1, se han descrito 6 capaces de interactuar con p53.

Estos factores son YY1, C/EBPbeta, TFIID, AP-2alphaA, c-Myc y ATF3, la ubicación precisa de sus sitios de unión en el promotor de TAF1 se muestra en la tabla 7 y se esquematizan en la figura 16.

Tabla 7. Ubicación de los sitios de unión dentro del promotor TAF1 para TFs que interactúan con p53

Factor	Ubicación en el promotor TAF1(bp)
YY1	-30, -40, -70, -300, -740, -960, -1000
TFIID	-40, -160, -280, -410
C/EBPbeta	-20, -50, -60, -80, -150, -290, -320, -450, -520, -540, -570, -590, -940, -980
AP-2alphaA	-320, -590
c-Myc	-610
ATF3	-490

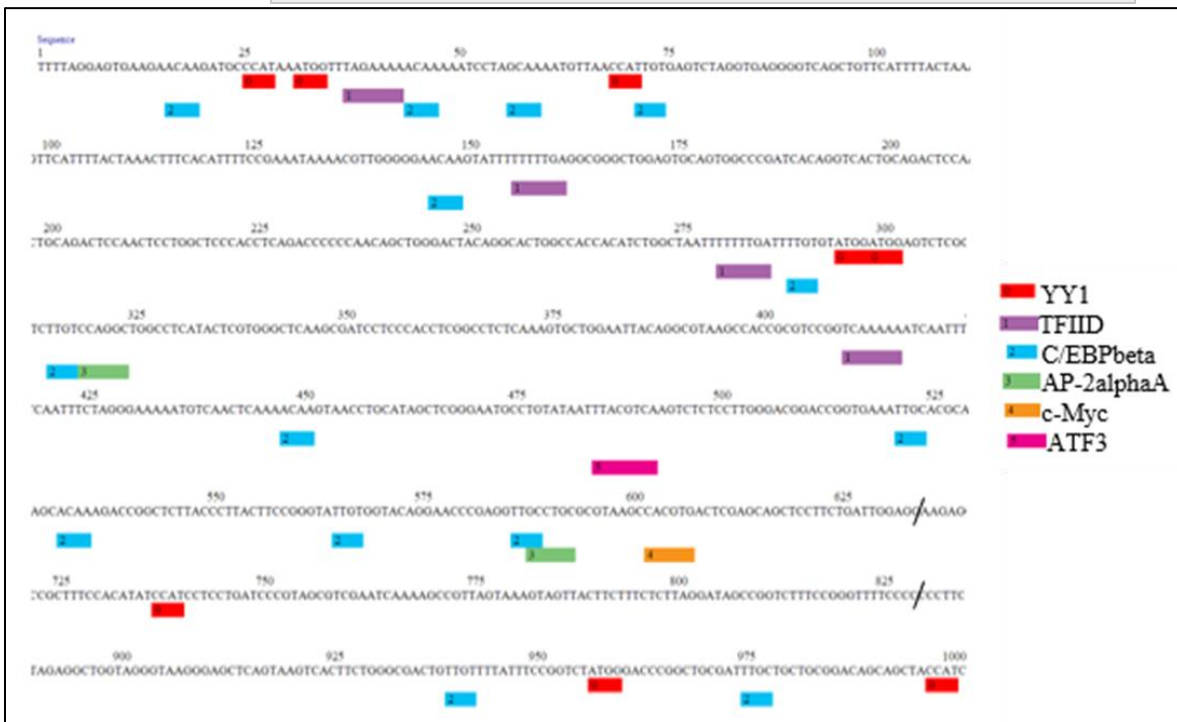


Figura 16. Factores de transcripción que interactúan con p53 y se unen al promotor de TAF1. Se muestran los sitios de unión en el promotor de TAF1 para Factores de Transcripción (TFs) que interactúan con p53, de acuerdo a la base de datos BioGRID (PROMO de Algen).

7.5. Consecuencias de las interacciones p53-TFs con sitio de unión en el promotor TAF1

Se investigaron las consecuencias descritas para cada una de las interacciones entre p53 y los factores antes mencionados usando la plataforma BioGRID. La tabla 8 resume la información recopilada. Se encontró que ATF3 y AP-2AlphaA interactúan con p53 con consecuencias tanto positivas como negativas en la transcripción dependiente de este supresor tumoral.

En el caso específico de ATF3 se encontró que es capaz de estabilizar a p53 bloqueando su ubiquitinación o compitiendo por este mecanismo dando un resultado positivo a favor de la actividad transcripcional de p53 (Yan, Lu, Hai & Boyd, 2005; Li, et al., 2020). En otro reporte se informa que ATF3 disminuye la transactivación de MMP-2 por p53, en este caso particular fungiendo de manera negativa en la actividad de p53 (Yan, Wang & Boyd, 2002). En un estudio más se reporta que ATF3 es capaz de suprimir los efectos oncogénicos de p53 mutado (Wei, et al., 2014).

También se ha reportado que la interacción entre p53 y AP-2AlphaA trae consecuencias positivas y negativas para la actividad de p53. Dos trabajos abarcan estas observaciones: el primero de ellos únicamente reporta el incremento en la activación transcripcional mediada por p53 (McPherson, Loktev & Weigel, 2002), mientras que un segundo reporte informa que AP2 α posee efectos competitivos sobre la actividad de p53 a través de la coactivación y disminución de su estabilidad (Stabach, Thiyagarajan, Woodfield & Weigel, 2005), ambos trabajos muestran dos posibles efectos importantes en la actividad de p53 por su interacción con AP-2AlphaA.

Dos artículos que describen la interacción entre p53 y YY1 muestran consecuencias negativas para la transcripción dependiente de p53, esto debido a que este factor transcripcional es principalmente un represor involucrado en modificaciones de histonas. En estos casos particulares se describieron mecanismos por los cuales YY1 afecta la actividad de p53, los cuales abarcan la disminución de su estabilidad al promover el ensamblaje del complejo p53-MDM2 o su interacción con HDM2 e interrumpir la interacción p53-p300, un coactivador transcripcional que sinergia con p53 en la activación transcripcional (Sui, et al., 2004; Grönroos, Terentiev, Punga & Ericsson, 2004).

Respecto a C/EBPbeta, un trabajo publicado el año 2006 muestra que la interacción entre p53 y este factor transcripcional interfiere negativamente en la actividad tanto de p53 como de C/EBPbeta, de manera que la unión a sus respectivos elementos de respuesta y la expresión de sus genes diana se ve afectada significativamente (Schneider-Merck, et al., 2006).

Para la interacción p53-c-Myc no se encontró evidencia experimental de un efecto en la actividad transcripcional de p53, el único artículo que reporta esta interacción fue publicado en el año 2018 y está enfocado en establecer el interactoma de c-Myc utilizando la base de datos STRING v10 (Kalkat, et al., 2018), por lo que no se conoce con certeza si esta interacción incide significativamente en la actividad del supresor tumoral p53 con consecuencias fisiológicas relevantes.

Tabla 8. Efecto de las interacciones de p53 con los factores con sitio de unión en el promotor TAF1				
Factor	Consecuencias descritas de la interacción con p53	Resultado en la transcripción dependiente de p53	Evidencia Experimental de la interacción	Referencia
ATF3	ATF3 reprime la expresión de MMP-2 al disminuir la transactivación de este gen por p53	Negativo	GST Pull-down Inmunoprecipitación	Yan, Wang & Boyd, 2002
	ATF3 activado por estrés estabiliza a p53 bloqueando su ubiquitinación mediada por MDM2 ATF3-CTp53=↓Ubiquitinación y Exportación nuclear	Positivo	GST Pull-down Co-IP	Yan, Lu, Hai & Boyd, 2005
	ATF3 suprime la función oncogénica de mutp53	-	GST Pull-down Co-IP	Wei, et al., 2014
	La ubiquitinación competitiva activa el supresor de tumores p53	Positivo	FLAG-IP	Li, et al., 2020
AP-2AlphaA	La interacción AP2alpha--p53 incrementa la activación transcripcional mediada por p53	Positivo	Y2H GST Pull-down Co-IP	McPherson, Loktev & Weigel, 2002
	AP2 α tiene efectos competitivos sobre la actividad de p53 a través de la coactivación y disminución de su estabilidad	Negativo	GST Pull-down	Stabach, Thiyagarajan, Woodfield & Weigel, 2005
YY1	YY1 inhibe la actividad transcripcional de p53 (estrés genotóxico) ☒interrumpe la interacción entre p53 y el coactivador p300 ☒promueve el ensamblaje del complejo p53-Mdm2 (↓estabilidad p53)	Negativo	GST Pull-down	Grönroos, Terentiev, Punga & Ericsson, 2004
	Estimula la ubiquitinación y degradación de p53 ☒facilita la interacción Hdm2-p53	Negativo	Co-IP GST Pull-down	Sui, et al., 2004
C/EBPbeta	Transrepresión, interferencia negativa entre p53 y C / EBPbeta en la unión a sus ER-afectando la	Negativo	GST Pull-down CoIP	Schneider-Merck, et al., 2006

		expresión de sus respectivos genes diana			
c-Myc		Interactoma de Myc	-	Base de datos STRING v10	Kalkat, et al., 2018
TFIID	TBP	p53 de tipo salvaje se une a TBP y reprime la transcripción in vitro	Negativo	Cromatografía de afinidad	Seto, et al., 1992
		Formación de un complejo p53-TFIID-promotor más estable	Positivo	EMSA	Chen, Farmer, Zhu, Prywes & Prives, 1993
		Regulación negativa de la expresión de bcl-2 por p53 en células hematopoyéticas	-	Sondas biotiniladas	Wu, Mehew, Heckman, Arcinas & Bóxer, 2001
	TAF1	TAF1 interactúa y fosforila a p53 promoviendo su degradación e incidiendo en la progresión del ciclo celular	Negativo	Co-Inmunoprecipitación	Li, Li, Sheppard & Liu, 2004
	TAF6	TAF6δ interactúa funcionalmente con p53 (mejora la activación mediada por p53 del promotor DUSP1)	Positivo	GST Pull-down Co-Inmunoprecipitación	Wilhelm, et al., 2010
	TAF9	TAF9 funge como coactivador de p53	Positivo	GST Pull-down Co-Inmunoprecipitación	Lu & Levine, 1995
		TAF9 inhibe la ubiquitinación de p53 mediada por mdm2, aumenta sus niveles y su actividad transcripcional	Positivo	Inmunoprecipitación	Buschmann et al., 2001
		Reclutamiento del complejo coactivador STAGA a promotores dependientes de p53 a través de su interacción con TAF9	Positivo	GST Pull-down Reticulación con DSP	Gamper & Roeder, 2008
		p53 secuestra TAF9 e impide su unión al oncogén GLI1 contribuyendo a la inhibición de su actividad oncogénica	-	GST Pull-down	Yoon, et al., 2015
TAF3	TAF3 es un regulador negativo conservado evolutivamente de la función de activación transcripcional de p53	Negativo	Y2H GST Pull-down Inmunoprecipitación	Berezcki, et al., 2008	

Dentro del análisis realizado se encontró que varios factores del complejo TFIID son capaces de interactuar con la proteína p53, como TBP, TAF1, TAF6, TAF9 y TAF3. Las consecuencias reportadas para estas interacciones en la actividad de p53 son tanto positivas como negativas. En el caso de la interacción TBP-p53 se encontraron dos estudios con consecuencias opuestas: uno de ellos sugiere la formación de un complejo p53-TFIID-promotor más estable que favorece la transcripción dependiente de p53 (Chen, Farmer, Zhu, Prywes & Prives, 1993) y otro más muestra represión producto de esta interacción (Seto, et al., 1992). Se informa de un ejemplo específico donde la interacción entre p53 y TBP podría ser la responsable de la represión del promotor del gen bcl-2 por p53 en células hematopoyéticas (Wu, Mehew, Heckman, Arcinas & Bóxer, 2001).

La interacción p53-TAF1 se reportó en el año 2004 con consecuencias en la estabilidad del supresor tumoral p53, específicamente se encontró que TAF1 interactúa y fosforila a p53 promoviendo su degradación e incidiendo así en la progresión del ciclo celular (Li, Li, Sheppard & Liu, 2004).

TAF6δ mostró una asociación funcional con p53 ya que se observó mayor activación mediada por p53 del promotor DUSP1 cuando se sobre expresó con TAF6δ (Wilhelm, et al., 2010).

De igual forma se han reportado solo consecuencias positivas en la actividad p53 por su interacción con TAF9, los mecanismos abarcan la inhibición de la ubiquitinación de p53 mediada por mdm2 (Buschmann et al., 2001), el reclutamiento del complejo coactivador STAGA a promotores dependientes de p53 (Gamper & Roeder, 2008) y la posibilidad de que TAF9 funja como un coactivador de p53 en la transcripción de sus genes blanco (Lu & Levine, 1995).

Finalmente, en el año 2008 se publicó un artículo que reporta que p53 es capaz de interactuar con TAF3 promoviendo efectos negativos en la actividad transcripcional de este supresor tumoral, este trabajo sigue fuertemente que TAF3 es un regulador negativo conservado evolutivamente de la función de activación transcripcional de p53 (Bereczki, et al., 2008).

Como se puede apreciar p53 es capaz de interactuar con factores de transcripción que poseen sitio de unión en el promotor de TAF1, estas interacciones generan cambios en la actividad de p53, sin embargo, los modelos de estudio difieren en cada trabajo por lo que es difícil concluir la existencia de una incidencia específica de p53 en el promotor de TAF1 a través de estos factores. El siguiente objetivo fue averiguar si alguno de estos factores capaces de unirse al promotor de TAF1 respondían a p53, para tratar de encontrar una relación entre p53 y el promotor TAF1 que pudiera dar pista de su incidencia en presencia de E2.

7.6. ATF3 en un gen que responde a p53

Se evaluó a través de diferentes bases de datos, si p53 es capaz de regular la expresión a nivel transcripcional de los factores de transcripción capaces de pegarse al promotor TAF1. Encontramos que ATF3 es el único gen objetivo o diana de p53. Este gen es inducido por una variedad de señales producidas por células cancerosas y está involucrado en el proceso de respuesta al estrés celular (Ku & Cheng, 2020). Mediante ENCODE *Transcription Factor Targets Dataset* determinamos que TAF1 es un gen objetivo de ATF3, lo que coincide con el análisis de sitios de unión para Factores de Transcripción en el promotor de TAF1, donde localizamos un único sitio de unión para ATF3.

RPS27L	TRAF4	TMEM68	ALOX5	TNFAIP8	PVRL4	NEFL	TP73	CAV1	IL1B	RALGDS
TNFRSF10B	TRIM22	WDR63	ARHGEP3	TSKU	RETSAT	NKAIN4	TRIM32	CCNK	ISYNA1	RBM38
TRIAF1	CES2	ZNF561	CERS3	PCNA	REV3L	PCLD	TRIM38	CFLAR	JAG1	RGL1
ZMAT3	CMBL	ZNF79	DDR1	ACY2	RNASE7	POE4C	TRIM5	COB7	KRT8	RGS20
BAX	FBXW7	ASCC3	DHR33	APAF1	SFN	PGAP1	TYMSOS	CHST14	KSR1	RHOC
PGF	HSPA4L	ACER2	DUSP14	APOBEC3H	TNFRSF10C	PLCXD2	AKAP9	COBLL1	LACC1	RPS19
POLH	KITLG	ANXA4	E2F7	BCL2L1	TRIML2	PLEKHF1	CCDC51	CPEB2	LPXN	SARS
PPM1D	SLC12A4	APOBEC3C	EP3B2	BCL6	VCAN	PLTP	CDH8	CPEB4	LRAP1	SCIN
SULF2	ATF3	ASTN2	FAM210B	BLCAP	ADCK3	PLXNB1	DUSP11	DNAJB2	MFAP3L	SCN3B
XPC	BBC3	CD82	GLS2	C17orf82	AK3	PLXNB2	GCC2	DOCK8	MKNK2	SDCA
AEN	CCDC90B	CDIP1	GPX1	COL7A1	ALDH1A3	PRKAB2	METTL8	DUSP5	MON2	SDPR
BLOC1S2	DYRK3	CPE	GRHL3	CPEB4	BBS2	PRKX	PPP1R3C	DUSP7	MRPL49	SMAD3
FAS	EDA2R	CSF1	HHAT	CSNK1G1	BTG1	PRODH	STEAP3	EBI3	MYBPHL	SNX2
GPR87	EPHA2	DCP1B	IGDCC4	DGKA	CEL	PTPRU	ABHD4	EFNB1	MYLK	SOC34
NIN1	FAM13C	ENC1	IKBIP	FAM49A	CLCA2	RGMA	ABTB2	E124	MYOF	TAB3
PLK2	FAM198B	FOSL1	LAPTMS	FAM84B	CLDN1	RGS16	ADGRG1	EML2	NFKBIA	TCAIM
PSTPIP2	FAM212B	FUCA1	MAST4	GNAI1	CLP1	RND3	A1FM2	ENPP2	NHLH2	TEP1
SESN1	FDXR	IERS	MICALL1	INPP1	CROT	RNF144B	AMOTL1	ETV7	NLRP1	TET2
TP53I3	LIF	PAD14	NOTCH1	ITGA3	CYP4F3	S100A2	AMZ2	FAM196A	NYNRIN	TEX9
TP53INP1	NADSYN1	PANK1	RABGGTA	KRT15	DAPK1	SCN2A	ARC	FAM98C	P3H2	TMEM63B

Figura 17. ATF3 es el único factor de transcripción con sitio de unión en el promotor del gen TAF1 que responde a p53. (Fischer, 2017).

La investigación que se realizó sobre ATF3 mostró que este factor transcripcional actúa como un factor cebador que enlaza factores transcripcionales específicos tal como activadores y represores con factores basales. Además, se propone que ATF3 activa o reprime la expresión dependiendo del contexto del gen, específicamente, la disponibilidad de coactivadores o correpresores (Zhao, Li, Guo, Yu & Yan, 2016).

Un punto importante sobre el factor ATF3 es que posee un nivel elevado de ocupación en el genoma e interactúa con una gran cantidad de proteínas tanto factores de transcripción como enzimas modificadoras de histonas, por lo que se propone que ATF3 pudiera marcar genes para la regulación transcripcional en situaciones basales sin estímulos de estrés (Zhao, Li, Guo, Yu & Yan, 2016).

Como último objetivo en este trabajo se buscó conjuntar la información recabada en la revisión y proponer un modelo de mecanismo de regulación del gen TAF1 donde p53 influencia la transcripción de este gen solo en presencia de la proteína E2 de VPH, la cual incide significativamente en la expresión de TAF1 posiblemente a través de la unión directa a su promotor.

7.7. Modelos regulación transcripcional TAF1

Se proponen dos modelos de regulación transcripcional del gen TAF1 por E2 de VPH16 en los cuales el estatus del gen p53 es determinante, ya que incide significativamente en la actividad de la proteína, de forma que p53 *wild type* difiere funcionalmente de p53 mutada. Ambos modelos consideran a la proteína viral E2 como un activador transcripcional que es capaz de unirse a su sitio consenso en -605bp en el promotor de TAF1 y que interactúa físicamente con p53 *wild type* con mayor intensidad que con p53 mutada.

De acuerdo con el análisis realizado con el software PROMO, el promotor de TAF1 no posee sitios de unión para la proteína p53, sin embargo, si posee sitios para factores que interactúan con este supresor tumoral, esto apoya la observación de nuestro grupo que muestra que en la línea celular C33A (p53 mutada) y RKO (p53 *wild type*) no existen diferencias en la expresión de TAF1 dadas únicamente por el estatus del gen p53, sino que la presencia de E2 induce cambios en la transcripción del gen TAF1 en función de p53.

El primer modelo de regulación sólo involucra la interacción directa de la proteína p53 con E2 de VPH y apoya la idea de una interacción más estable con p53 *wild type* que con p53 mutada. Dado que E2, de acuerdo con nuestras observaciones previas, actúa como un activador transcripcional de TAF1 en la línea celular C33A, la cual es p53 mutada, es lógico pensar que p53 *wild type* interfiere en la actividad de E2 en el promotor de este gen para el caso de RKO. Por tanto, se propone que p53 *wild type* interactúa fuertemente con E2 evitando la activación transcripcional de TAF1 en esta línea celular. No obstante, en C33A, p53 mutado podría no ser capaz de interactuar con E2 dejando que este factor

viral active significativamente la transcripción del gen TAF1 con consecuencias relevantes para la célula (figura 18).

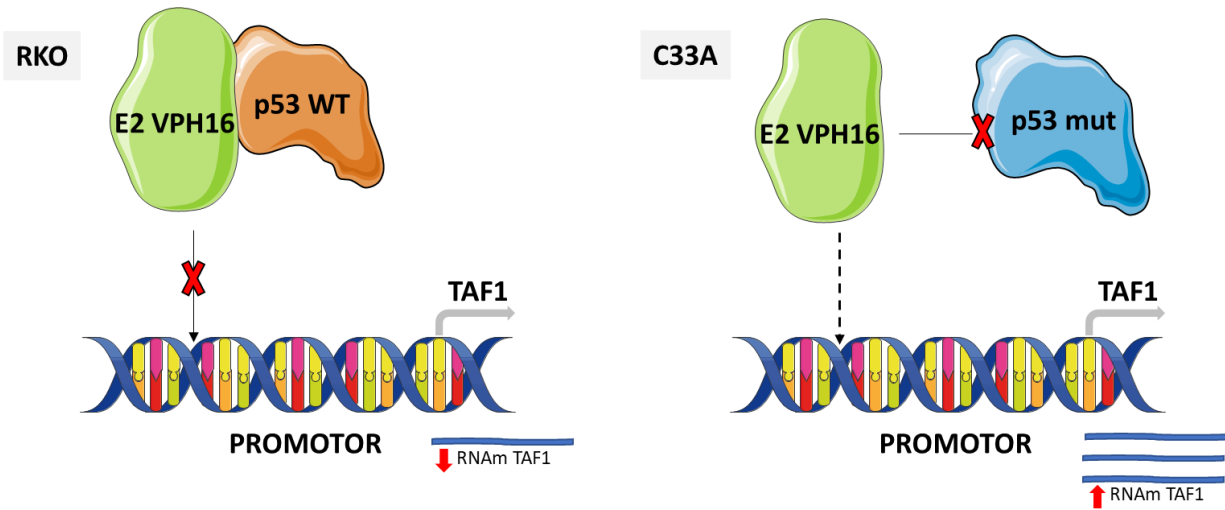


Figura 18. Modelo1: La proteína p53 wild type se une a E2 de VPH16 e impide que active la transcripción del gen TAF1 mientras que p53 mutada no interactúa con E2 y por tanto la transcripción de TAF1 incrementa los niveles de RNAm de este gen.

El principal sustento de este modelo es el reporte de la interacción E2-p53 con consecuencias en la replicación del genoma viral, apoptosis y transcripción dependiente de E2 a nivel de genoma viral: se encontró que p53 regula negativamente la transcripción activada por E2 a través de su interacción directa con esta proteína viral (Brown, et al., 2008). Como lado negativo, la simpleza de esta propuesta no explica que en la línea celular RKO no solo no se observe una activación transcripcional de TAF1, sino que por el contrario sus niveles de RNA mensajero disminuyan significativamente.

Este primer modelo sencillo que explica la incidencia del estatus del gen p53 en la manera en cómo E2 regula el promotor TAF1 se basa únicamente en una interacción directa de estas proteínas, sin embargo, es importante considerar que existen muchos otros factores que inciden de manera importante en la transcripción no solo de TAF1 sino de los genes celulares en general: los cofactores transcripcionales. Es por ello, que en el segundo modelo se planteó la participación de los coactivadores CBP/p300 como

determinantes para explicar la actividad del promotor TAF1 bajo los escenarios planteados previamente: las líneas celulares C33A y RKO en presencia de E2 de VPH16.

De los resultados previos se optó por enfocar la atención en el factor ATF3, ya que fue el único factor con sitio de unión específico en el promotor TAF1 capaz de interactuar y responder a p53. Estas características lo colocaron en un punto de atención para este trabajo. Sin embargo, era necesario analizar un posible papel de este factor en la regulación que ejerce E2 sobre TAF1 y la influencia de p53 en dicho promotor. Dos cuestiones trascendentales en la investigación fueron: 1) p53 no podría incidir directamente en los niveles de ATF3 en nuestro modelo, ya que nuestras observaciones previas no incluyen un estímulo de estrés que promueva la actividad de p53 como activador transcripcional de genes objetivo; y 2) los cofactores CBP/p300 se relacionan de alguna manera con todas las proteínas de interés en nuestra propuesta: se unen a p53 favoreciendo su actividad, de igual manera interactúan con E2-VPH y dirigen la transcripción de ATF3 en estado basal, por tanto, CBP/p300 fueron considerados como un cuarto elemento decisivo para abordar una propuesta de regulación más compleja del gen TAF1 en los escenarios ya establecidos. La interacción p53-CBP/p300 se descartó, ya que nuestro modelo involucraría solo situaciones basales sin estímulos de estrés. Además, bajo estas condiciones los niveles de ATF3 son bajos pero constantes con una alta ocupación en el genoma, por lo que se propone que los niveles de CBP/p300 también son constantes.

La pregunta que se intenta responder con este segundo modelo es cómo p53 influye en la manera en que E2 de VPH regula el promotor de TAF1 y que participación pudiera tener la proteína ATF3, ya que tiene una relación estrecha con p53.

Primero, se consideraron los mismos puntos del modelo 1, donde el fallo en la interacción física directa entre E2 de VPH y p53 determina que el primero se una a su sitio consenso y active la transcripción de TAF1, sin embargo, se adicionó el hecho de que E2 es capaz de interactuar con los coactivadores CBP/p300 y dirigirlos de esta manera al promotor de TAF1 para potenciar aún más la activación. En las células RKO esta activación potenciada no se observaría dada la interacción estable E2-p53 *wild type*, no así en

C33A, donde p53 mutada fallaría en unir a E2 dejando que este factor viral potencie junto con CPB/p300 la transcripción del gen TAF1.

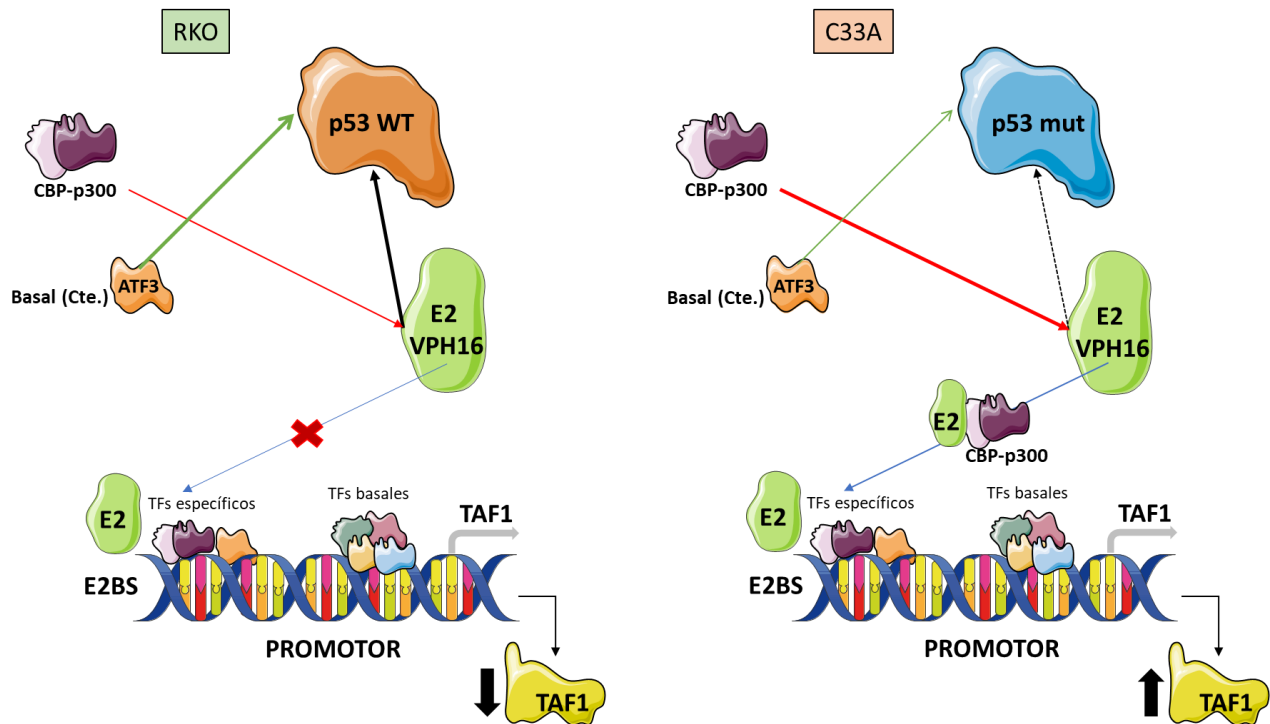


Figura 19. Modelo2. E2 de VPH16 guía a los coactivadores CBP/p300 al promotor TAF1 solo en C33A ya que no interactúa con p53 mutada.

Ambos modelos explican perfectamente la activación de la transcripción de TAF1 por E2 de VPH16 en C33A, pero no así la represión observada en la línea celular RKO, donde no solo no se observa una activación, sino que los niveles de proteína TAF1 se reducen drásticamente. Es por esto y por el papel que ejerce ATF3 como factor cebador uniendo activadores y represores con factores basales que se propone que puede desempeñar un rol importante en la regulación del promotor de TAF1.

ATF3 parece permanecer constante en situaciones basales e interactuar con p53 para favorecer su estabilidad y actividad en situaciones de estrés (Zhao, Li, Guo, Yu & Yan, 2016). En este modelo se propone que ATF3 no se une al promotor TAF1 en RKO cuando E2 se encuentra presente ocasionando la represión observada en este modelo celular.

La interacción entre p53 y ATF3 tendría que promoverse con la presencia de la proteína E2 siendo trascendental únicamente en RKO que posee p53 *wild type* y explicaría en parte la ausencia de ATF3 en el promotor TAF1. En la línea celular C33A, que posee p53 mutado, no se vería este efecto negativo sobre la transcripción de TAF1 por la falta de unión de ATF3 en el promotor. La fuerte interacción entre E2 y p53 *wild type* podría inducir a su vez la interacción de p53 con ATF3 como mecanismo para evitar los efectos de esta proteína viral sobre la estabilidad de la proteína p53, ya que se informa de un papel cooperador entre ATF3 y p53 en su estabilidad y actividad supresora de tumores (Yan, Lu, Hai & Boyd, 2005).

Los modelos que aquí se presentan se generaron como producto de la revisión documental y de la investigación en las diferentes plataformas, muestran un posible panorama de la regulación del gen TAF1 dado por las interacciones de p53 con el factor ATF3 y con la proteína E2 de VPH. Representan un primer acercamiento teórico de cómo podría estar ocurriendo la regulación transcripcional de TAF1 en nuestras líneas celulares de interés, sin embargo, es necesario evaluar experimentalmente puntos clave de estos mecanismos in vivo.

8. Discusión

El objetivo general de este trabajo fue determinar la posible influencia de p53 en el promotor del gen TAF1 en presencia de E2 de VPH16, y bajo este panorama se realizó una revisión de artículos que informaran que la proteína viral E2 es capaz de regular la expresión de genes celulares a nivel transcripcional.

Los resultados de esta revisión nos mostraron que los primeros estudios en este sentido fueron evaluando genes celulares específicos de manera individual mediante ensayos de actividad luciferasa principalmente. E2 reguló negativamente la transcripción de los genes hTERT e integrina beta4 reclutándose en los promotores de esos genes. En el caso particular del promotor de hTERT se encontró que E2 se une a este a través de Sp1, mientras que en el promotor de integrina beta4, E2 pudiera estar uniéndose directamente a un sitio potencial hallado en ensayos EMSA, aunque no es descartable la posibilidad de que dicha unión sea a través de otros factores celulares. Se propone que E2 regula negativamente la transcripción de integrina beta4 uniéndose a su promotor y desplazando un complejo de factores celulares importante para su transcripción, sin embargo, no se menciona que E2 posea capacidad represora intrínseca ni que pueda reclutar proteínas represoras en los promotores. Lo que podría significar que la regulación negativa observada es producto de eventos propios del contexto del promotor: la ubicación de la secuencia de unión de E2, ya sea por unión directa o a través de otro factor y los factores celulares que se reclutan en el promotor de un gen para regular su actividad transcripcional.

Por otra parte, se encontró un mayor número de artículos con reportes de regulación positiva de genes celulares particulares por E2. Se halló que E2 es capaz de regular positivamente la expresión de p21, involucrina, MMP9, Interleucina 10 y los factores de *splicing* SF2 / ASF y SRSF3. La actividad de los promotores de estos genes en presencia de E2 se evaluó para la mayoría de ellos mediante ensayos de actividad luciferasa, solo el promotor de SF2/ASF se evaluó con ensayos de actividad CAT. El promotor del gen p21 posee sitios Sp1 al igual que el promotor de hTERT, y se encontró que la sobreexpresión de este factor sinergizaba con E2 en la activación transcripcional, además, se encontró interacción entre E2 y Sp1, por lo que al igual que en el promotor

de hTERT, E2 podría unirse al promotor de p21 a través de Sp1, pero en este caso para activar la transcripción de este gen. Este ejemplo claro de actividad opuesta de E2 en dos promotores diferentes podría deberse a la naturaleza misma del gen regulado, pero, además, podría ser relevante el contexto de factores que regulan a cada promotor en ausencia de la proteína viral. En el presente trabajo se hipotetiza que las interacciones de E2 con factores transcripcionales son cruciales para determinar la actividad o incidencia de E2 en los promotores celulares que es capaz de regular.

Una observación a favor de esta hipótesis se presenta en el artículo que informa como E2 regula positivamente la transcripción del gen involucrina, en este trabajo se evalúa la actividad del promotor proximal de involucrina con sobreexpresión de E2 y factores C/EBP y se encuentra un sinergismo evidente por parte de estos dos factores en la transactivación del gen involucrina. El promotor de involucrina no posee sitios de unión para E2, pero si posee un único sitio para C/EBP que es el responsable de la activación mediada por E2. En los ensayos de coprecipitación se colocan E2 y C/EBP en el promotor de involucrina. Dicho artículo evidencia nuevamente que la proteína viral E2 puede pegarse a promotores carentes de secuencia de unión consenso a través de otros factores y que estos influyen decisivamente en la actividad que desempeñe E2 en el promotor de gen regulado.

No obstante, E2 también es capaz de unirse específicamente a secuencias E2 consenso dentro de promotores celulares, tal es el caso del promotor de MMP9. De acuerdo con un análisis *in silico* del promotor de MMP9 se encontró que posee un sitio específico para unir E2 de VPH y al evaluarse el pegado de esta proteína viral mediante EMSA se encontró que interactuaba de manera específica de secuencia. E2 activó el promotor de MMP9 en los ensayos de luciferasa en virtud de su unión específica y por tanto incrementó los niveles de la transcripción de MMP9, la cual se corroboró mediante RT PCR en células con expresión de E2. En ese trabajo particular se demostró que la actividad de E2 como activador transcripcional de MMP9 tiene relevancia en un contexto de cultivos organotípicos, el cual representa un acercamiento al contexto de infección por VPH del epitelio cervical.

El promotor de interleucina 10 representa un ejemplo más en el que E2 es capaz de unirse a promotores celulares a través de una secuencia consenso. La actividad del plásmido reportero incrementó notablemente en presencia de E2 siendo que el promotor de IL10 posee un sitio de unión para esta proteína viral. Incluso los ensayos EMSA mostraron una unión específica que pudiera ser la responsable de la activación transcripcional del gen IL10. En este mismo estudio midieron la expresión de IL10 mediante RT-PCR en células transfectadas con E2 y encontraron el mismo comportamiento activador de esta proteína, sin embargo, no se describe que factores regulan la transcripción del gen de IL10 y como E2 pudiera estar incidiendo en este promotor.

Tres artículos más muestran que E2 es capaz de activar la transcripción de proteínas SR, las cuales cumplen funciones en el proceso de empalme alternativo, esto significa que E2 puede estar incidiendo de manera importante en este proceso a través de regular la expresión de estas proteínas SR en un contexto de diferenciación. Se propone que E2 se une al promotor de SF2/ASF para activar la transcripción en un sitio diferente al consenso identificado. El enfoque en el caso de la regulación de SRSF3 fue tratando de encontrar algún papel funcional, por lo que se encontró que la activación de SRSF3 por E2 se asocia con la expresión de la proteína tardía L1 en células diferenciadas a través de favorecer el *splicing* que genera el RNAm que la codifica. Estas observaciones implican el hecho de que la proteína viral E2 influye en procesos moleculares esenciales como el empalme alternativo a través de regular la expresión de las proteínas involucradas en estos procesos. Para el presente trabajo resulta de interés entender como E2 de VPH16 afecta la expresión de TAF1 en presencia de p53, esto debido entre otras cosas a que TAF1 posee funciones esenciales a nivel de transcripción, de forma que un cambio en sus niveles celulares podría estar afectando drásticamente la expresión de muchos otros genes con consecuencias determinantes para el destino celular.

La tecnología desarrollada para mapear cambios globales en la expresión génica ha permitido medir el efecto general de la proteína E2 en la expresión de un gran número de genes y es gracias a ello que fue posible evidenciar que la proteína viral E2 de VPH está incidiendo fuertemente en la transcripción de una gran cantidad de genes celulares. A

pesar de que en el genoma es posible encontrar secuencias consenso para E2, se propone que la ocupación es limitada con la función de garantizar los eventos de replicación y transcripción del genoma viral efectuados por esta proteína (Võsa, Sudakov, Remm, Ustav & Kurg, 2012), sin embargo, en este trabajo se plantea que la proteína E2 podría estar afectando la transcripción de manera global al incidir en la expresión de TAF1, tal como podría estar ocurriendo a nivel de empalme alternativo al regular a las proteínas SR.

En nuestro grupo de trabajo se demostró que E2 cambia el perfil de expresión de 1629 genes de 10 000 analizados, lo que muestra una incidencia de 16.29% en la expresión génica evaluada. Sin embargo, algunos de ellos fueron regulados positivamente y otros negativamente (Ramírez-Salazar, et al., 2011), por lo que una vez más parece ser indispensable el contexto del promotor ya sea a nivel epigenético o respecto a los factores que regula su transcripción en un contexto basal fisiológicamente normal.

De acuerdo con la revisión realizada varios otros trabajos hacen uso de herramientas como microarreglos de expresión para indagar el efecto de la proteína E2 de VPH sobre el perfil de expresión génica celular, se ha centrado la atención en grupos de genes dentro del conjunto regulado con funciones como respuesta inmune contra virus. De manera interesante se reporta que E2 es capaz de incidir significativamente en el empalme alternativo de 522 genes, siendo algunos de ellos involucrados en procesos de adhesión y motilidad, lo que significa que E2 podría ser responsable de regular no solo el inicio de la transcripción sino procesos postranscripcionales con consecuencias fisiológicamente relevantes. Además, del conjunto de datos de expresión global aún no se conoce con certeza las implicaciones en el ambiente celular y si con ello se favorece el ciclo de vida del virus de VPH.

Dos trabajos recientes se presentan en esta revisión en un apartado e incluyen observaciones más actuales de como E2 genera cambios de expresión en genes específicos con actividad fisiológica importante en el contexto de transformación celular hacia fenotipos cancerosos. El primero de ellos del año 2018, aborda la regulación negativa de RNAs mitocondriales no codificantes antisentido en queratinocitos humanos HFK por la presencia del gen E2, estos RNAs se expresan poco en células no

proliferantes, mucho en células proliferantes normales y poco en células tumorales. De acuerdo con lo anterior han sido considerados supresores tumorales, sin embargo, aún no se sabe con exactitud su actividad biológica. Ese estudio muestra como queratinocitos inmortalizados con VPH16 y 18 generan regulación negativa de estos RNAs muy probablemente a través de E2. En los experimentos realizados se encontró una extensión de la vida replicativa de las células HFK por la expresión de E2 (Villota, et al., 2018). Sin embargo, no se aborda el mecanismo de regulación de estos RNAs por E2, si actúa directamente sobre su promotor o si es a través de otros genes o factores que se da esta regulación negativa que promueve la inmortalización celular en un contexto de infección por VPH.

El trabajo de Fontan y colaboradores del 2020 resulta de interés debido al intento que se hace de encontrar una marca epigenética que explique el comportamiento transcripcional a la baja de TWIST1 en presencia de E2 de VPH16 o el genoma viral completo, además las observaciones son significativas también a nivel de proteína. El incremento encontrado en la marca represiva H3K9me2 abre la posibilidad de que E2 sea capaz de modificar el entorno epigenético para favorecer o evitar la transcripción de genes celulares. Este es un campo poco explorado y representaría una función innovadora para la proteína viral E2 y una explicación posible a la incidencia que posee sobre el perfil global de expresión génica.

En nuestro grupo de trabajo recientemente se analizó el efecto de E2 de HPV16 sobre la expresión de proteínas de la maquinaria epigenética, así como el estado de algunas modificaciones epigenéticas en genes regulados por la proteína E2 (De León Barrera et al., 2019). Se encontró que E2 reprime transcripcionalmente a los genes EZH2, KAT2A y DNMT3B en la línea celular HaCaT, además se observó alteración en la abundancia de la trimetilación en H3K4 y en H3K27 en los sitios de inicio de la transcripción de los genes JunB y p16 regulados por E2. Estos datos sugieren que E2 incide de manera importante a nivel de expresión de proteínas de la maquinaria epigenética, lo cual a su vez podría cambiar de manera significativa el estado epigenético de un gran número de genes celulares.

El análisis de promotor TAF1 en EPD que se realizó en el presente trabajo mostró de acuerdo con datos experimentales que las marcas activadoras como H3K4me3 y H3K27ac se encuentran presentes en dicho promotor, lo cual informa del estado activo de este gen y por lo mismo resulta de mayor interés poder evaluar estas y otras marcas epigenéticas en las líneas celulares C33A y RKO con expresión de E2 de VPH.

Los sitios de unión para 19 factores en el promotor TAF1 dan una pista de los eventos de regulación transcripcional propios de este gen particular considerando que 6 de ellos son capaces de interactuar con p53 con consecuencias variadas en la actividad transcripcional dependiente de este supresor tumoral. Uno de estos factores ATF3 se consideró en la propuesta de modelos de regulación del promotor TAF1 debido a que no solo interactúa con p53, sino que responde a este y sinergiza en su actividad supresora de tumores (Zhao, Li, Guo, Yu & Yan, 2016). ATF3 solo posee un sitio de unión en el promotor TAF1 y de acuerdo con la literatura funge como un puente entre factores activadores o represores y factores basales, esto último podría ser relevante para la actividad de promotor TAF1.

Propuesta Experimental

Se propone evaluar mediante RT-PCR los niveles de RNAm TAF1 y mediante WB el nivel de proteína TAF1 en líneas celulares con diferente estatus del gen p53: p53 *wild type* (RKO), p53mutado (C33A) y p53 negativo (H1299) con y sin expresión de E2-VPH16.

Dichos experimentos validarían las observaciones respecto a la expresión de TAF1 en las líneas celulares RKO, C33A y adicionarían datos acerca de la expresión de este gen en la línea celular H1299, la cual en p53 negativa (*null*), es decir no expresa a p53. La ausencia de la proteína p53 en un modelo celular ayudaría a evidenciar su importancia e influencia en la transcripción del gen TAF1 inducida por E2 de VPH16.

Resulta, además, necesario establecer los escenarios p53 en un mismo modelo celular para medir la expresión de TAF1 con y sin E2 en estas condiciones. Se propone modificar el estatus p53 de la línea celular RKO con y sin expresión de E2, ya que se trata de una línea celular en donde p53 se encuentra de manera *wild type*, por lo que se podría trabajar con ella para agotar p53 mediante un siRNA con la finalidad de establecer un escenario p53 *null*. En esta misma línea celular podría introducirse una mutación en p53 para imitar

el escenario de C33A y de esta manera medir la expresión de TAF1 en presencia de E2 de VPH16 en un mismo modelo celular. Lo anterior con la finalidad de evitar un posible sesgo generado por la línea celular en sí.

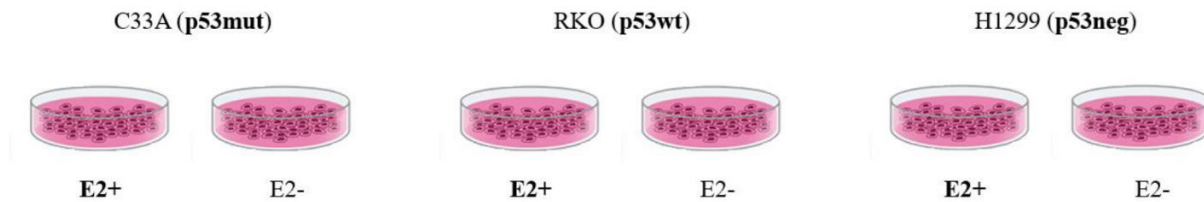


Figura 20. Propuesta experimental. Se muestran las líneas celulares C33A, RKO y H1299, las cuales difieren en el estatus del gen p53. La evaluación de TAF1 a nivel de RNAm y proteína debe realizarse con y sin expresión de E2 de VPH16. mut: mutado, wt: wild type, neg: negativo.

También podría ponerse a prueba la relevancia del elemento *cis* presente en -605 bp en el promotor TAF1 y determinar si E2 es capaz de interactuar con esta secuencia. La metodología propuesta es realizar ensayos EMSA, utilizar oligonucleótidos biotinilados o ensayos ChIP.

Finalmente se considera una opción realizar ensayos de actividad luciferasa: acoplar el promotor de TAF1 con y sin el sitio de unión para E2 a un plásmido reportero de luciferasa y cotransfectarlo junto con vectores de expresión de p53 *wild type* y mutada en células p53 *null* con y sin expresión estable de E2. De esta manera se podrá evaluar tanto la relevancia del elemento *cis* en -605 bp en el promotor TAF1 como el estatus del gen p53.

10. Conclusiones

La proteína viral E2 regula la transcripción de muchos genes celulares tanto positiva como negativamente, posee muchos sitios de unión en el genoma y es capaz de unirse a promotores celulares de manera directa o a través de otros factores.

El análisis del promotor TAF1 mostró sitios de unión para 19 factores de transcripción siendo 6 de ellos capaces de interactuar con la proteína p53. No se encontró en este análisis un sitio de unión para p53, pero previamente nuestro grupo reportó la existencia de un sitio de unión para la proteína viral E2 en -605 bp respecto al sitio de inicio de la transcripción de este gen.

Las consecuencias de las interacciones entre p53 y cada uno de los 6 factores con sitio de unión en el promotor TAF1 son tanto positivas como negativas para la actividad transcripcional dependiente de p53.

ATF3 interactúa y responde a p53 en situaciones de estrés y regula a su vez la transcripción de TAF1, pues este último es uno de sus genes objetivo. ATF3 posee una alta ocupación en el genoma aun en situaciones basales, se postula que funge como un enlazador de factores específicos con factores basales en el proceso de transcripción. Por lo anterior, resulta de interés su participación en la regulación transcripcional de su gen objetivo TAF1 en presencia de E2 de VPH16 y sin estímulo de estrés.

Los modelos de regulación del gen TAF1 explican un posible mecanismo por el cual p53 influye en los cambios en la actividad transcripcional de TAF1 inducidos por E2 de VPH16 en función del pegado de esta proteína al promotor de TAF1 y dando un papel decisivo a la interacción E2-p53.

Finalmente se contemplan algunos experimentos para poner a prueba la hipótesis de este trabajo y evidenciar la influencia de p53 en la manera en que E2 regula la transcripción del gen TAF1.

11. Referencias

- Akgül, B., García-Escudero, R., Ekechi, C., Steger, G., Navsaria, H., Pfister, H., & Storey, A. (2011). The E2 protein of human papillomavirus type 8 increases the expression of matrix metalloproteinase-9 in human keratinocytes and organotypic skin cultures. *Medical microbiology and immunology*, 200(2), 127–135. <https://doi.org/10.1007/s00430-011-0183-4>
- Arbyn, M., Weiderpass, E., Bruni, L., de Sanjosé, S., Saraiya, M., Ferlay, J., & Bray, F. (2020). Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *The Lancet. Global health*, 8(2), e191–e203. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30482-6](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30482-6)
- Berezcki, O., Ujfaludi, Z., Pardi, N., Nagy, Z., Tora, L., Boros, I. M., & Balint, E. (2008). TATA binding protein associated factor 3 (TAF3) interacts with p53 and inhibits its function. *BMC molecular biology*, 9, 57. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-57>
- Bermúdez-Morales, V. H., Peralta-Zaragoza, O., Alcocer-González, J. M., Moreno, J., & Madrid-Marina, V. (2011). IL-10 expression is regulated by HPV E2 protein in cervical cancer cells. *Molecular medicine reports*, 4(2), 369–375. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.429>
- Brown, C., Kowalczyk, A. M., Taylor, E. R., Morgan, I. M., & Gaston, K. (2008). P53 represses human papillomavirus type 16 DNA replication via the viral E2 protein. *Virology journal*, 5, 5. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-5>
- Burd E. M. (2003). Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical microbiology reviews*, 16(1), 1–17. <https://doi.org/10.1128/cmr.16.1.1-17.2003>
- Buschmann, T., Lin, Y., Aithmitti, N., Fuchs, S. Y., Lu, H., Resnick-Silverman, L., Manfredi, J. J., Ronai, Z., & Wu, X. (2001). Stabilization and activation of p53 by the coactivator protein TAFII31. *The Journal of biological chemistry*, 276(17), 13852–13857. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007955200>
- Cai, C., Xie, X., Zhou, J., Fang, X., Wang, F., & Wang, M. (2020). Identification of TAF1, SAT1, and ARHGAP9 as DNA methylation biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Journal of cellular physiology*, 235(1), 611–618.
- Centeno, F., Ramírez-Salazar, E., García-Villa, E., Gariglio, P., & Garrido, E. (2008). TAF1 interacts with and modulates human papillomavirus 16 E2-dependent transcriptional regulation. *Intervirolgy*, 51(2), 137–143. <https://doi.org/10.1159/000141706>
- Chen, X., Farmer, G., Zhu, H., Prywes, R., & Prives, C. (1993). Cooperative DNA binding of p53 with TFIID (TBP): a possible mechanism for transcriptional activation. *Genes & development*, 7(10), 1837–1849. <https://doi.org/10.1101/gad.7.10.1837>
- Cuba, H. (s. f.). *Physiology of the reproductive system*. Obtenido de <https://quizlet.com/191546768/physiology-of-the-reproductive-system-flash-cards/>
- De León Barrera, K. I. (2019). Análisis de la participación de la proteína E2 de HPV16 en la regulación de la maquinaria epigenética. [Tesis de maestría no publicada]. CINVESTAV-IPN.

Domènec Farré, Romà Roset, Mario Huerta, José E. Adsuara, Llorenç Roselló, M. Mar Albà, Xavier Messeguer. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res*, 31, 13, 3651-3653, 2003.

Dreos, R., Ambrosini, G., Périer, R., Bucher, P. *Nucleic Acids Res.* (2014). The Eukaryotic Promoter Database: expansion of EPDnew and new promoter analysis tools. doi: 10.1093/nar/gku1111; PMID: 25378343

Ducrest, AL., Szutorisz, H., Lingner, J. et al (2002). Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene* 21, 541–552. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205081>

Evans, M. R., James, C. D., Bristol, M. L., Nulton, T. J., Wang, X., Kaur, N., White, E. A., Windle, B., & Morgan, I. M. (2019). Human Papillomavirus 16 E2 Regulates Keratinocyte Gene Expression Relevant to Cancer and the Viral Life Cycle. *Journal of virology*, 93(4), e01941-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01941-18>

Fischer, M. (2017). Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene* 36, 3943–3956. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.502>

Fontan, C. T., Das, D., Bristol, M. L., James, C. D., Wang, X., Lohner, H., Atfi, A., & Morgan, I. M. (2020). Human Papillomavirus 16 (HPV16) E2 Repression of TWIST1 Transcription Is a Potential Mediator of HPV16 Cancer Outcomes. *mSphere*, 5(6), e00981-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00981-20>

Freepik Company S.L. (2020). Internal structure of human papillomavirus hpv Premium Vector. Obtenido de https://www.freepik.com/premium-vector/internal-structure-human-papillomavirus-hpv_11097533.htm

Gamper, A. M., & Roeder, R. G. (2008). Multivalent binding of p53 to the STAGA complex mediates coactivator recruitment after UV damage. *Molecular and cellular biology*, 28(8), 2517–2527. <https://doi.org/10.1128/MCB.01461-07>

Gauson, E. J., Windle, B., Donaldson, M. M., Caffarel, M. M., Dornan, E. S., Coleman, N., Herzyk, P., Henderson, S. C., Wang, X., & Morgan, I. M. (2014). Regulation of human genome expression and RNA splicing by human papillomavirus 16 E2 protein. *Virology*, 468-470, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.07.022>

GeneCards. (s. f.). TAF1 Gene. Obtenido de <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TAF1>

Gheit T. (2019). Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology. *Frontiers in oncology*, 9, 355. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00355>

Graham S. V. (2016). Human Papillomavirus E2 Protein: Linking Replication, Transcription, and RNA Processing. *Journal of virology*, 90(19), 8384–8388. <https://doi.org/10.1128/JVI.00502-16>

Graham S. V. (2017). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical science (London, England: 1979)*, 131(17), 2201–2221. <https://doi.org/10.1042/CS20160786>

- Grönroos, E., Terentiev, A. A., Punga, T., & Ericsson, J. (2004). YY1 inhibits the activation of the p53 tumor suppressor in response to genotoxic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(33), 12165–12170. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402283101>
- Hadaschik, D., Hinterkeuser, K., Oldak, M., Pfister, H. J., & Smola-Hess, S. (2003). The Papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation. *Journal of virology*, 77(9), 5253–5265. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.9.5253-5265.2003>
- Hamid, N. A., Brown, C., & Gaston, K. (2009). The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 66(10), 1700–1717. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8631-7>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Joerger, A. C., & Fersht, A. R. (2016). The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annual review of biochemistry*, 85, 375–404. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014710>
- Kadaja, M., Silla, T., Ustav, E., & Ustav, M. (2009). Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability. *Virology*, 384(2), 360–368. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.032>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00152>
- Kalkat, M., Resetca, D., Lourenco, C., Chan, P. K., Wei, Y., Shiah, Y. J., Vitkin, N., Tong, Y., Sunnerhagen, M., Done, S. J., Boutros, P. C., Raught, B., & Penn, L. Z. (2018). MYC Protein Interactome Profiling Reveals Functionally Distinct Regions that Cooperate to Drive Tumorigenesis. *Molecular cell*, 72(5), 836–848.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.031>
- Katzenberger, R. J., Marengo, M. S., & Wassarman, D. A. (2006). ATM and ATR pathways signal alternative splicing of *Drosophila* TAF1 pre-mRNA in response to DNA damage. *Molecular and cellular biology*, 26(24), 9256–9267. <https://doi.org/10.1128/MCB.01125-06>
- Kimura, J., Nguyen, S. T., Liu, H., Taira, N., Miki, Y., & Yoshida, K. (2008). A functional genome-wide RNAi screen identifies TAF1 as a regulator for apoptosis in response to genotoxic stress. *Nucleic acids research*, 36(16), 5250–5259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn506>
- Klymenko, T., Hernandez-Lopez, H., MacDonald, A. I., Bodily, J. M., & Graham, S. V. (2016). Human Papillomavirus E2 Regulates SRSF3 (SRp20) To Promote Capsid Protein Expression in Infected Differentiated Keratinocytes. *Journal of virology*, 90(10), 5047–5058. <https://doi.org/10.1128/JVI.03073-15>
- Ku, H. C., & Cheng, C. F. (2020). Master Regulator Activating Transcription Factor 3 (ATF3) in Metabolic Homeostasis and Cancer. *Frontiers in endocrinology*, 11, 556. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00556>
- Kumari, R., Sen, N., & Das, S. (2014). Tumour suppressor p53: understanding the molecular mechanisms inherent to cancer. *Current Science*, 786-794.

Kyle D., & Lauren S. Histology. PathologyOutlines.com website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/cervixnormalhistology.html>. Accessed January 3rd, 2021

Lazarczyk, M., Cassonnet, P., Pons, C., Jacob, Y., & Favre, M. (2009). The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 73(2), 348–370. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00033-08>

Li, H. H., Li, A. G., Sheppard, H. M., & Liu, X. (2004). Phosphorylation on Thr-55 by TAF1 mediates degradation of p53: a role for TAF1 in cell G1 progression. *Molecular cell*, 13(6), 867–878. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(04\)00123-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(04)00123-6)

Li, X., Guo, M., Cai, L., Du, T., Liu, Y., Ding, H. F., Wang, H., Zhang, J., Chen, X., & Yan, C. (2020). Competitive ubiquitination activates the tumor suppressor p53. *Cell death and differentiation*, 27(6), 1807–1818. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0463-x>

Lu, H., & Levine, A. J. (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(11), 5154–5158. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.5154>

Massimi, P., Pim, D., Bertoli, C., Bouvard, V., & Banks, L. (1999). Interaction between the HPV-16 E2 transcriptional activator and p53. *Oncogene*, 18(54), 7748–7754. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203208>

McBride, A. A. (2013). The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, 445(1-2), 57-79.

McBride, A. A., Oliveira, J. G., & McPhillips, M. G. (2006). Partitioning viral genomes in mitosis: same idea, different targets. *Cell cycle*, 5(14), 1499-1502.

McPherson, L. A., Loktev, A. V., & Weigel, R. J. (2002). Tumor suppressor activity of AP2alpha mediated through a direct interaction with p53. *The Journal of biological chemistry*, 277(47), 45028–45033. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208924200>

McPhillips, M. G., Veerapraditsin, T., Cumming, S. A., Karali, D., Milligan, S. G., Boner, W., Morgan, I. M., & Graham, S. V. (2004). SF2/ASF binds the human papillomavirus type 16 late RNA control element and is regulated during differentiation of virus-infected epithelial cells. *Journal of virology*, 78(19), 10598–10605. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10598-10605.2004>

Mole, S., Milligan, S. G., & Graham, S. V. (2009). Human papillomavirus type 16 E2 protein transcriptionally activates the promoter of a key cellular splicing factor, SF2/ASF. *Journal of virology*, 83(1), 357–367. <https://doi.org/10.1128/JVI.01414-08>

Moody C. (2017). Mechanisms by which HPV Induces a Replication Competent Environment in Differentiating Keratinocytes. *Viruses*, 9(9), 261. <https://doi.org/10.3390/v9090261>

Muller, M., & Demeret, C. (2012). The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions: A Complex Hijacking of the Cellular Network. *The Open Virology Journal*, 6, 173 - 189.

Nakahara, T., & Kiyono, T. (2014). Regulation of human papillomavirus (HPV) genome replication in the viral life cycle and its association with the viral persistence and cancer development. *Uirusu*, 64(1), 57-66.

- O'Brien, T., & Tjian, R. (2000). Different functional domains of TAFII250 modulate expression of distinct subsets of mammalian genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), 2456-61.
- Oldak, M., Smola, H., Aumailley, M., Rivero, F., Pfister, H., & Smola-Hess, S. (2004). The human papillomavirus type 8 E2 protein suppresses beta4-integrin expression in primary human keratinocytes. *Journal of virology*, 78(19), 10738–10746. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10738-10746.2004>
- Ozbun, M. A., & Meyers, C. (1998). Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology*, 248(2), 218–230. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9285>
- Parish, J. L., Bean, A. M., Park, R. B., & Androphy, E. J. (2006). ChlR1 is required for loading papillomavirus E2 onto mitotic chromosomes and viral genome maintenance. *Molecular cell*, 24(6), 867–876. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.005>
- Ramírez-Salazar, E., Centeno, F., Nieto, K., Valencia-Hernández, A., Salcedo, M., & Garrido, E. (2011). HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. *Virology journal*, 8, 247. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-247>
- Rushton, J. J., Steinman, R. A., & Robbins, P. D. (1997). Differential regulation of transcription of p21 and cyclin D1 conferred by TAF(II)250. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 8(10), 1099–1104.
- Saavedra, A. L., & Soberón, M. L. (2006). Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano. *Cancerología*. 1 31-55.
- Sánchez HJA, Huerta PMI, Rivera TJA & Rosales. (2005) Infección por VPH y cáncer cervicouterino. *Rev Mex Patol Clin Med Lab*. 52(4):222-233.
- Sánchez, N. C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553-562.
- Sánchez-Ramos, J., Pozo-Molina, G., & Garrido, E. (2020). The expression of the transcription factor TAF1 is modified by the HPV16 E2 protein. *Acta virologica*, 64(3), 375–379. https://doi.org/10.4149/av_2020_307
- Santos-López G, Márquez-Domínguez L, Reyes-Leyva J, et al. Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2015;53(Suppl: 2):166-171.
- Saxena, S. K., Kumar, S., Goel, M. M., Kaur, A., & Bhatt, M. L. (2018). Recent advances in human papillomavirus infection and management. *Current Perspectives in Human Papillomavirus*.
- Schneider-Merck, T., Pohnke, Y., Kempf, R., Christian, M., Brosens, J. J., & Gellersen, B. (2006). Physical interaction and mutual transrepression between CCAAT/enhancer-binding protein beta and the p53 tumor suppressor. *The Journal of biological chemistry*, 281(1), 269–278. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503459200>

Sellors, J. W., & Sankaranarayanan, R. (2003). La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical: Manual para principiantes. Lyon, Francia: International Agency for Research on Cancer (IARC), 140.

Seto, E., Usheva, A., Zambetti, G. P., Momand, J., Horikoshi, N., Weinmann, R., Levine, A. J., & Shenk, T. (1992). Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(24), 12028–12032. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.12028>

Stabach, P. R., Thiyagarajan, M. M., Woodfield, G. W., & Weigel, R. J. (2006). AP2alpha alters the transcriptional activity and stability of p53. *Oncogene*, 25(15), 2148–2159. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209250>

Steger, G., Schnabel, C., & Schmidt, H. M. (2002). The hinge region of the human papillomavirus type 8 E2 protein activates the human p21(WAF1/CIP1) promoter via interaction with Sp1. *The Journal of general virology*, 83(Pt 3), 503–510. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-3-503>

Sui, G., Affar, e., Shi, Y., Brignone, C., Wall, N. R., Yin, P., Donohoe, M., Luke, M. P., Calvo, D., Grossman, S. R., & Shi, Y. (2004). Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell*, 117(7), 859–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.004>

Sunthamala, N., Thierry, F., Teissier, S., Pientong, C., Kongyingyoes, B., Tangsiriwatthana, T., Sangkomkamhang, U., & Ekalaksananan, T. (2014). E2 proteins of high risk human papillomaviruses down-modulate STING and IFN- κ transcription in keratinocytes. *PloS one*, 9(3), e91473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091473>

Van Doorslaer, K., Chen, Z., Bernard, H. U., Chan, P., DeSalle, R., Dillner, J., Forslund, O., Haga, T., McBride, A. A., Villa, L. L., Burk, R. D., & Ictv Report Consortium (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *The Journal of general virology*, 99(8), 989–990. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001105>

Villota, C., Varas-Godoy, M., Jeldes, E., Campos, A., Villegas, J., Borgna, V., Burzio, L. O., & Burzio, V. A. (2018). HPV-18 E2 protein downregulates antisense noncoding mitochondrial RNA-2, delaying replicative senescence of human keratinocytes. *Aging*, 11(1), 33–47. <https://doi.org/10.18632/aging.101711>

Võsa, L., Sudakov, A., Remm, M., Ustav, M., & Kurg, R. (2012). Identification and analysis of papillomavirus E2 protein binding sites in the human genome. *Journal of virology*, 86(1), 348–357. <https://doi.org/10.1128/JVI.05606-11>

Wassarman, D. A., & Sauer, F. (2001). TAF(II)250: a transcription toolbox. *Journal of cell science*, 114(Pt 16), 2895–2902.

Wei, S., Wang, H., Lu, C., Malmut, S., Zhang, J., Ren, S., Yu, G., Wang, W., Tang, D. D., & Yan, C. (2014). The activating transcription factor 3 protein suppresses the oncogenic function of mutant p53 proteins. *The Journal of biological chemistry*, 289(13), 8947–8959. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.503755>

Wilhelm, E., Kornete, M., Targat, B., Vigneault-Edwards, J., Frontini, M., Tora, L., Benecke, A., & Bell, B. (2010). TAF6delta orchestrates an apoptotic transcriptome profile and interacts functionally with p53. *BMC molecular biology*, 11, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-10>

- Wu, Y., Lin, J. C., Piluso, L. G., Dhahbi, J. M., Bobadilla, S., Spindler, S. R., & Liu, X. (2014). Phosphorylation of p53 by TAF1 inactivates p53-dependent transcription in the DNA damage response. *Molecular cell*, 53(1), 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.031>
- Wu, Y., Mehew, J. W., Heckman, C. A., Arcinas, M., & Boxer, L. M. (2001). Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene*, 20(2), 240–251. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204067>
- Xavier Messeguer, Ruth Escudero, Domènec Farré, Oscar Nuñez, Javier Martínez, M. Mar Albà. (2002). PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*, 18, 2, 333–334.
- Yan, C., Lu, D., Hai, T., & Boyd, D. D. (2005). Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *The EMBO journal*, 24(13), 2425–2435. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600712>
- Yan, C., Wang, H., & Boyd, D. D. (2002). ATF3 represses 72-kDa type IV collagenase (MMP-2) expression by antagonizing p53-dependent trans-activation of the collagenase promoter. *The Journal of biological chemistry*, 277(13), 10804–10812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112069200>
- Yoon, J. W., Lamm, M., Iannaccone, S., Higashiyama, N., Leong, K. F., Iannaccone, P., & Walterhouse, D. (2015). p53 modulates the activity of the GLI1 oncogene through interactions with the shared coactivator TAF9. *DNA repair*, 34, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.06.006>
- You, J., Croyle, J. L., Nishimura, A., Ozato, K., & Howley, P. M. (2004). Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell*, 117(3), 349–360. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00402-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00402-7)
- Yu, T., Peng, Y. C., & Androphy, E. J. (2007). Mitotic kinesin-like protein 2 binds and colocalizes with papillomavirus E2 during mitosis. *Journal of virology*, 81(4), 1736–1745. <https://doi.org/10.1128/JVI.01638-06>
- Zilfou, J. T., & Lowe, S. W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(5), a001883. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001883>