



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA E1 DEL VPH-16 SOBRE LA REGULACIÓN
EPIGENÉTICA: MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES EN LAS
HISTONAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
BIOL. JOSÉ EDUARDO PÉREZ AQUINO

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. ROSAURA HERNANDEZ RIVAS
CINVESTAV
DR. ERNESTO SOTO REYES
Universidad Autónoma Metropolitana

Ciudad de México, octubre, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Pérez Aquino José Eduardo
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 28 de junio del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias**, con la réplica de la tesis **“Participación de la proteína E1 del VPH-16 sobre la regulación epigenética: modificaciones postraduccionales de las histonas”**, dirigida por el/la Dr(a). **Lizano Soberón Marcela**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Leticia Rocha Zavaleta
VOCAL	Mauricio Rodríguez Dorantes
VOCAL	Edgar Vázquez Martínez
VOCAL	Elizabeth Langley McCarron
SECRETARIO	Víctor Julián Valdés Rodríguez

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 28 de junio de 2021
COORDINADORA



Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología molecular y epidemiología de virus oncogénicos del Instituto Nacional de Cancerología, a cargo de la dra. Marcela Lizano Soberón, de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer.

Agradezco al Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, a su coordinación y a sus profesores por ser parte fundamental en mi formación como maestro en ciencias.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado a través del programa de becarios (CVU 968790).

A mi tutora, la Dra. Marcela Lizano Soberón por su apoyo, guía y sobre todo por la confianza que deposito en mí.

Al Dr. Leonardo Josué Castro Muñoz por su guía, amistad y apoyo en el laboratorio.

A los miembros del comité tutorial, la Dra. Rosaura Hernández Rivas y el Dr. Ernesto Soto reyes, por todos sus aportes que enriquecieron y guiaron este proyecto.

A los miembros del jurado de tesis, La Dra. Leticia Rocha Zavaleta, Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes, Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez, Dra. Elizabeth Langley McCarron y al Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez por sus valiosas observaciones en la tesis escrita.

A mis compañeros de laboratorio: Alicia, Katia, Iris, Arantxa, Katy, Silvia, Omar, Leslie, Joaquín, Diego, Adrianita, Joel, Caro, Alejandro, Ismerai y Liz por el increíble ambiente de trabajo que generan y por sus invaluable contribuciones al desarrollo de este proyecto.

Índice

INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE TABLAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Virus del papiloma Humano (VPH)	1
1.1.1. Origen y estructura	1
1.1.2. Generalidades de los genomas de los VPHs	2
1.1.3. Clasificación de los VPHs	3
1.1.4. Ciclo replicativo	4
1.2. Proteína E1 del VPH	7
1.2.1. Estructura y función	7
1.3. Cromatina	10
1.3.1. Mecanismos de regulación epigenética	11
1.3.2. Modificaciones post traduccionales de histonas	11
1.3.3. Enzimas reguladoras de las MPT de histonas.....	12

2. ANTECEDENTES

2.1. La proteína E1 del VPH regula a modificadores de la cromatina	16
2.2. E1 como regulador de la expresión de genes celulares	18

3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
5.1. OBJETIVOS GENERALES	22
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1. Línea celular	23
6.2. Plásmidos	23
6.3. Transformación bacteriana	23
6.4. Purificación de DNA de plásmidos de expresión	24
6.5. Transfección	24
6.6. Obtención de RNA y síntesis de cDNA	25
6.7. Western Blot	25
6.7.1. Extracción de proteínas totales	26
6.7.2. Fraccionamiento celular	26
6.7.3. Extracción de histonas	27
6.7.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE)	27
6.7.5. Transferencia	27
6.7.6. Bloqueo de membrana e incubación de anticuerpos primarios y secundarios.	28
6.7.7. Anticuerpos.	28
6.8. Análisis estadístico.	29
7. RESULTADOS	30
7.1. Expresión y niveles de la proteína E1 del VPH16 en células HaCaT (Validación de sistema: transfección transitoria)	30

7.2.	Enriquecimiento de extractos de histonas obtenidos de células HaCaT transfectadas con E1 del VPH16	31
7.3.	E1 del VPH16 induce un aumento en la acetilación de la histona H3.....	32
7.4.	E1 del VPH16 induce un enriquecimiento de las marcas H3K9ac y H3K18ac.	33
7.5.	E1 del VPH16 no afecta marcas de represión transcripcional como H3K27me3	34
7.6.	E1 del VPH disminuye los niveles enzimas escritoras como HDAC3 ...	36
7.7.	E1 DEL VPH16 induce un aumento en los niveles de GCN5	37
7.8.	Posibles genes desregulados por E1 del VPH16 a través del enriquecimiento de la marca H3K9ac.	38

8. DISCUSIÓN

8.1.	La proteína E1 del VPH regula la expresión de genes celulares.	43
8.2.	La proteína E1 del VPH16 induce un aumento en los niveles de acetilación.	44
8.3.	E1 del VPH16 induce un aumento en las marcas H3K9ac y H3K18ac.....	45
8.4.	E1del VPH16 induce cambios en modificadores de la cromatina	47
8.5.	Posible participación de la proteína E1 del VPH16 en la carcinogénesis.....	49

9. CONCLUSIÓN.....51

10.PERSPECTIVAS.....52

11.BIBLIOGRAFÍA.....53

12.ANEXOS.....60

Índice de figuras

Figura 1. Estructura del genoma del VPH	1
Figura 2. Ciclo replicativo del VPH en el epitelio plano escamoso estratificado.....	6
Figura 3. Dominios funcionales de la proteína E1 del VPH	8
Figura 4. Participación de la proteína E1 durante la replicación del genoma viral.....	9
Figura 5. Nucleosoma: unidad fundamental de la cromatina	10
Figura 6. Expresión y niveles de E1 del VPH16	30
Figura 7. Extracción de histonas de células HaCaT transfectadas con E1 del VPH16	31
Figura 8. La proteína E1 induce un aumento en los niveles de panH3ac	32
Figura 9. E1 del VPH16 induce un aumento en los niveles de las marcas H3K9ac y H3K18ac	34
Figura 10. E1 del VPH16 no tiene efecto sobre la marca de represión transcripcional, H3K27me3	34
Figura 11. Los niveles de HDAC3 disminuyen en presencia de E1 del VPH16 ...	37
Figura 12. E1 del VPH16 aumenta los niveles de GCN5	38
Figura 13. Genes con enriquecimiento de la marca H3K9ac en línea celulares de queratinocitos	39
Figura 14. Genes regulados por E1del VPH16 y con enriquecimiento H3K9ac	40

Índice de tablas

Tabla 1. Diferentes clases de modificaciones post traduccionales de Histonas que ocurren en los extremos amino terminal de las histonas	12
Tabla 2. Enzimas reguladoras de las MPT de histonas	13
Tabla 3. E1 de distintos tipos de VPH interactúan con modificadores de la cromatina.....	17
Tabla 4. Plásmido de E1 del VPH16 y pCA.	25
Tabla 5. Anticuerpos	28
Tabla 6. Genes regulados por H3K9ac sub expresados en presencia de E1 del VPH16.	41
Tabla 7. Genes regulados por H3K9ac sobre expresados en presencia de E1 del VPH16	41

Lista de abreviaturas

μ L Microlitro

ChIP Inmunoprecipitación de la cromatina

DBD Dominio de Unión al DNA

DMEM-F12 Medio Eagle de Dulbecco modificado F12

DNA Acido desoxirribonucleico

EBV Epstein-Barr

EGFR Receptor del factor de crecimiento epidérmico

H1 Histona H1

H2A Histona 2A

H2B Histona 2B

H3 Histona H3

H3K9ac Acetilación de la lisina 9 de la histona 3

H4 Histona H4

HA Hemaglutinina

HAT Acetiltransferasa de histonas

HDAC Desacetilasa de histonas

IFN β 1 Interferón Beta 1

IFN λ 1 Interferón Lamda 1

kDa Kilo Daltons

KDMT Desmetilasa de histonas

KMT Metil transferasa de lisinas

KSHV Sarcoma Kaposi asociado a herpesvirus

LB Medio Luria Berth

LCR Región Larga de Control

Min Minutos

mL Mililitros

MPH Modificaciones Post-traduccionales de las Histonas

NLS Señal de Localización Nuclear

p-Adj Valor de p Ajustada

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

qPCR Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo real

RNA-seq Secuenciación de RNA

Rpm Revoluciones por minutos

iRNAs RNAs cortos de interferencia

TLR Toll like receptor

VHB Hepatitis B

VPH Virus del Papiloma Humano

VPH-AR Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo

VPH-BR Virus del Papiloma Humano de Bajo Riesgo

WB Western Blot

Resumen

Introducción: La proteína E1 del virus del papiloma humano (VPH) es la única proteína del VPH con actividad enzimática. La función que tradicionalmente se le ha atribuido a esta proteína es la regulación de la replicación del genoma viral, sin embargo, recientemente se describió que E1 también participa en la regulación de la expresión de genes celulares. Esto se demostró, primero, cuando se silenció a E1 del VPH18 en células HeLa dando como resultados una desregulación de genes asociados a respuesta inmune y apoptosis; y segundo cuando se transfectó a E1 del VPH en células HaCaT, donde se determinó que E1 del VPH de alto y bajo riesgo inducía cambios en la expresión de genes celulares, asociados principalmente a respuesta inmune antiviral. Sin embargo, se sabe poco de los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de genes celulares por E1 del VPH. Por otra parte, se ha descrito que E1 del VPH es capaz de interactuar con proteínas de la maquinaria epigenética del hospedero, lo que nos sugiere un posible mecanismo de regulación de la expresión de genes celulares mediado por E1 del VPH16. **Objetivo:** evaluar el efecto de E1 del VPH16 sobre las marcas de histonas. **Metodología:** Se realizó una tranfección transitoria de E1 del VPH16 en la línea celular HaCat, 24 h post transfección se obtuvieron extractos de proteína enriquecidos con proteínas histonas y extractos nucleares, para evaluar por WB los niveles de modificadores de histonas y modificaciones post traduccionales de histonas. Se realizó un análisis *in silico* para predecir los genes susceptibles a la regulación por E1 del VPH16 a través de la regulación de la expresión de genes celulares. **Resultados:** Evaluamos el efecto sobre los patrones de acetilación de la histona H3 y H4 encontrando un aumento en los niveles de la pan-acetilación de la histona H3. Estos resultados nos llevaron a analizar las marcas de acetilación: H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac y H3K23ac, encontrando un aumento en H3K9ac y H3K18ac. Esto nos llevó a analizar a la enzima escritora Gcn5, donde se observó un aumento en presencia de E1 del VPH16. Por otra parte, analizamos también a la enzima desacetilasa de histonas HDAC3, encontrando una disminución en presencia de E1. La marca H3K9ac es crítica en la regulación transcripcional es por lo que realizamos un análisis *in silico* donde agrupamos los genes con presencia de

la marca H3K9ac en sus promotores y analizamos cuales de estos se compartían con los genes desregulados por E1 del VPH16 y observamos que un grupo de genes que se comparten en este análisis se asocia a la carcinogénesis. Esto es relevante porque recientemente se ha propuesto a E1 del VPH como una proteína que podría asociarse a procesos carcinogénicos. **Conclusión:** E1 del VPH16 induce cambios en los niveles de las marcas de histonas en el genoma del hospedero lo que sugiere un posible mecanismo de regulación de la actividad transcripcional mediada por E1 del VPH16.

Abstract

The human papillomavirus (HPV) E1 protein is the only HPV protein with enzymatic activity. The function that has traditionally been attributed to this protein is the regulation of viral genome replication. However, it was recently described that E1 also participates in the regulation of cellular genes. This was demonstrated, first, when HPV18 E1 was silenced in HeLa cells, resulting in dysregulation of genes associated with the immune response and apoptosis; and second, when HPV E1 was transfected in HaCaT cells, where it was determined that high and low risk HPV E1 induced changes in the expression of cellular genes, mainly associated with an antiviral immune response. However, little is known about the mechanisms involved in the regulation of cellular gene expression by HPV E1. Moreover, it has been described that HPV E1 is capable of interacting with proteins of the epigenetic machinery of the host, which suggests a possible mechanism for regulating the expression of cellular genes mediated by HPV16 E1. The objective of this work was to evaluate the effect of HPV16 E1 on histone marks. Therefore, we evaluated the effect on acetylation patterns of histones H3 and H4, finding an increase in the acetylation patterns of histone H3. These results led us to analyze the acetylation marks: H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac and H3K23ac, finding an increase in H3K9ac, H3K14ac and H3K18ac. Furthermore, we analyzed the writing enzyme GCN5, finding increased in the presence of E1 HPV16. Conversely, we also analyzed the HDAC3 eraser enzyme and observed that it was decreased in the presence of E1. The H3K9ac mark is critical in transcriptional regulation, therefore we performed an *in silico* analysis where we grouped the genes containing the H3K9ac mark in their promoters and analyzed which of these were shared with HPV E1 deregulated genes and observed that a group of genes that are shared in this analysis is associated with carcinogenesis. This is relevant because HPV E1 has recently been proposed as a protein associated with carcinogenic processes. In general, we can conclude that HPV16 E1 induces a reorganization of histone marks in the host genome, which suggests a possible mechanism for regulating the transcriptional activity mediated by HPV16 E1.

Introducción

1.1. Virus del papiloma Humano (VPH)

1.1.1. Origen y estructura

Los virus del papiloma humano (VPH) son virus pertenecientes a la familia *Papillomaviridae*, los cuales emergieron hace aproximadamente 350 millones de años. Estos virus se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza e infectan a aves, reptiles, marsupiales y mamíferos donde encontramos un grupo de tipos virales capaces de infectar a seres humanos. Algunos de estos tipos virales son ampliamente estudiados por las enfermedades que pueden provocar asociadas a la infección por estos virus (Doorbar, *et al.*, 2015).

Los VPHs son virus pequeños no envueltos, de un tamaño aproximado de entre 55 y 60 nm de diámetro, presentan una cápside con estructura icosaédrica, constituida por 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) (Crosbie, *et al.*, 2013) en la figura 1A podemos observar la estructura general de los VPHs. El genoma de los VPHs está conformado por una molécula de DNA circular de doble cadena, de un tamaño aproximado de 8000 pares de bases, el cual se divide para su estudio en tres regiones (Figura 1B) (Zur Hausen, 2009).

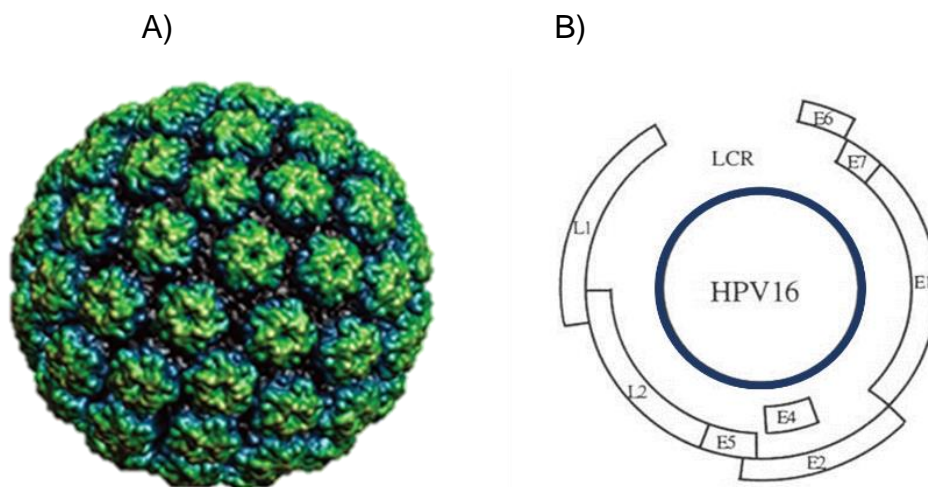


Figura 1. Estructura y genoma del VPH. A) estructura icosaédrica conformada por 72 capsómeros de L1 y L2. B) genoma del VPH 16 se divide en tres regiones: la región de genes tempranos (E) representada por E1, E2, E4, E5, E6 y E7; la región de genes de expresión tardía (L) representados por L1 y L2 y finalmente la región

larga de control (LCR) que contiene elementos de regulación de la replicación y la transcripción viral (Santos-López, *et al.*, 2015).

1.1.2. Generalidades de los genomas de los VPHs

El genoma del VPH es una molécula de DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases que dependiendo del tipo viral puede contener entre 8 y 9 marcos de lectura abierto (ORFs por sus siglas en inglés) (Brady, *et al.*, 1999). Aunque el número de genes es limitado por el tamaño del genoma el número de proteínas que codifica es mayor, ya que la expresión de genes depende del uso de distintos promotores y distintos patrones de splicing alternativo (Doorbar, *et al.*, 2015). De manera general el genoma de los distintos VPH puede dividirse en tres regiones: la región larga de control (LCR por sus siglas en inglés), la región de genes de expresión temprana (E) y la región de genes de expresión tardía (L) (Doorbar, *et al.*, 2015).

La LCR es una región no codificante y se encuentra entre los genes L1 y E6, esta región comprende aproximadamente el 10% del genoma viral y esta físicamente dividido en tres distintos segmentos: el segmento 5', el segmento central y el segmento 3'. Muchos VPHs contienen cuatro sitios de unión de la proteína E2 (E2bs) a lo largo de la LCR. El segmento 5' contiene sitios de terminación de la transcripción y sitios de poliadenilación para la transcripción tardía. El segmento central esta flanqueado por dos E2bs y presenta un enhancer específico de epitelio, además de motivos importantes para estimular o suprimir la actividad transcripcional de genes virales mediante la unión de factores como AP1, NF1, TEF1, OCT1, YY1, BRN-3a, NF-IL6, KRF-1, NF-Kb, FOXA1 y GATA3 entre otros. La regulación de la transcripción de los genes y la afinidad por los distintos factores de transcripción depende del tipo viral. Finalmente, el segmento 3' de la LCR contiene 2 E2bs además de contener el Origen de replicación donde se une la proteína viral E1 (E1bs). P97 y P105 son los principales promotores tempranos en VPH16 y VPH18 respectivamente. Adicionalmente la LCR contiene un elemento de respuesta a

glucocorticoides (GREs) y elementos de respuesta a progesterona (PREs) (Ribeiro, *et al.*, 2018).

Finalmente, la regulación transcripcional de genes virales puede estar regulada por la cromatina, debido a que se ha descrito que el genoma del VPH16 contiene nucleosomas en regiones específicas, como en el enhancer en el segmento central, además en el origen de replicación y en el promotor de genes de expresión temprana (Soto D, *et al.*, 2017) La influencia de los nucleosomas en la transcripción de genes de expresión temprana y tardía también se ha descrito en VPH31, donde se encontró que nucleosomas se posicionaban en regiones promotoras y estaban activadas mediante modificaciones post traduccionales de histonas (MPH) durante la diferenciación (Wooldridge, *et al.*, 2008).

La región de genes de expresión temprana contiene genes involucrados en la replicación (E1 y E2) y genes involucrados en regular diversos procesos celulares como ciclo celular, respuesta inmune y liberación de los viriones (E6, E7, E5 y E4) mientras que la región de genes de expresión tardía contiene a los genes conservados de empaquetamiento o cápside viral (L1 y L2) (Doorbar, *et al.*, 2015, Wallboomers *et al.*, 1999)

1.1.3. Clasificación de los VPHs

La clasificación de los VPH en tipos virales se basa principalmente en la homología de secuencia de los nucleótidos de la región correspondiente al ORF del gen L1, que codifica para la proteína de cápside L1, ya que es la más conservada entre los VPHs (Muñoz, *et al.*, 2003). Actualmente, se han clasificado cinco géneros de VPH: α -papilomavirus, β -papilomavirus, γ -papilomavirus, μ -papilomavirus y ν -papilomavirus, de los cuales el género α resulta de interés por sus implicaciones medicas en humanos (Bzhalava *et al.*, 2015).

Actualmente se conocen aproximadamente 200 tipos virales capaces de infectar a seres humanos, de los cuales 40 de ellos infectan la mucosa de la región anogenital

y la región de la cabeza y cuello (Rettig, *et al.*, 2015). Estos se han clasificado con base a su potencial oncogénico en virus de alto riesgo (VPH-AR) y de bajo riesgo (VPH-BR) (Doorbar *et al.*, 2017).

Los virus de papiloma humano pueden causar un rango de enfermedades, por ejemplo, los VPH-BR se asocian al desarrollo de verrugas genitales, además en niños se ha asociado a enfermedades como la papilomatosis respiratoria recurrente, siendo los tipos virales 6 y 11 los más frecuentes (Goon, *et al.*, 2008). Por otra parte, los VPH-AR se asocian al desarrollo de distintos tipos de cáncer como cáncer cervicouterino, de vulva, vagina, pene, ano y ciertos tipos de tumores de cabeza y cuello, siendo el tipo viral 16 el más prevalente en todos los tipos de cáncer (Manzo-Merino, 2013).

1.1.4. Ciclo replicativo

El ciclo replicativo del VPH inicia cuando las partículas virales acceden a las células basales del epitelio plano estratificado escamoso a través de micro lesiones (López-Saavedra., *et al.*, 2006). En la membrana basal los viriones interactúan con distintos receptores como son HSPG, A2t, GFR, CyPB, sin embargo, actualmente no se conoce un receptor específico para el VPH (Raff, *et al.*, 2013). Actualmente hay modelos *in vitro* que sugieren que, previo a la interacción con sus receptores en la matriz extracelular, se inducen cambios conformacionales de la cápside lo que provoca que se exponga el amino terminal de L2 aumentando la afinidad del virión con receptores secundarios en la membrana plasmática de la célula blanco. Sin embargo, con todo lo anterior actualmente aún se desconoce un receptor específico para los VPHs (Raff, *et al.*, 2013). Los cambios conformacionales de L2 también son importantes para la internalización de los viriones, se han descrito dos principales vías de internalización, una dependiente de clatrina y otra dependiente de caveolina (Schiller, *et al.*, 2010). El proceso de reconocimiento e internalización usualmente toma entre 2 y 4 horas, después de la unión de las células a su receptor, hasta formar un endosoma, posteriormente, el endosoma formado (endosoma temprano)

migra a través del citoplasma (endosoma tardío) y se fusiona con los lisosomas. En este punto se lleva a cabo el desensamble del virión y el rescate del episoma mediado por la proteína L2, llevando al genoma viral al citoplasma, para posteriormente ser transportado al núcleo (Stanley, 2012).

Dentro del núcleo se comienzan a expresar los genes E1 y E2 que regulan la replicación y transcripción de genes virales. E1 participa en el mantenimiento del genoma viral en un bajo número de copias (50-200 copias/célula) (Egawa, et al., 2012). Además, en las células basales se expresan los genes que codifican para las proteínas E6 y E7 las cuales promueven la proliferación celular, evasión de la apoptosis y retraso en la diferenciación celular, todo esto necesario para el establecimiento de la infección productiva (Bodily y Laimins, 2011). Durante esta etapa de la infección los niveles de expresión de E6 y E7 son regulados por la proteína E2 ya que esta actúa como regulador negativo de estos genes debido a que durante el proceso de replicación viral E2 se une a un sitio cercano al promotor de E6 y E7 impidiendo su transcripción (Mcbride., et al., 2013).

Durante la infección productiva, las células basales comienzan a diferenciarse, esto ocasiona un incremento en la expresión del gen temprano que codifica a la proteína E1. Se ha descrito que durante esta etapa se alcanzan niveles altos de esta proteína así como de E2, E4 y E5 las cuales promueven la amplificación del genoma en las capas intermedias del epitelio (Doorbar., 2006). Por su parte la proteína E5 promueve la proliferación celular al ocasionar el reciclaje de receptores de factores de crecimiento, además de que juega un papel importante en la evasión de la respuesta inmune (Doorbar, et al. 2013).

Finalmente, en las capas superficiales del epitelio escamoso estratificado comienzan a expresarse los genes de expresión tardía que codifican para las proteínas L1 y L2, las cuales participan en el ensamble de las partículas virales (Lentz y Shideler, 2016). Por su parte, la proteína E4 promueve el colapso de la red de queratina, evitando la fosforilación de la queratina al interferir con la cinasa celular 14-3-3 lo que favorece la liberación de los viriones y que así inicie así un nuevo ciclo viral infectando nuevos epitelios (Wang, et al.,2004).

Es importante destacar que la proteína E1 del VPH se encuentra presente en todas las etapas del ciclo replicativo. Además, recientemente esta proteína ha cobrado importancia no solamente por su participación en la replicación del genoma viral y en el establecimiento de la infección, sino que también se ha descrito como una proteína capaz de regular otros procesos como la transcripción de genes celulares implicados en la respuesta inmune antiviral y posiblemente en el desarrollo de cáncer. (Castillo *et al.*, 2014; Castro-Muñoz, *et al.*, 2019 y Beadyananda *et al.*, 2017).

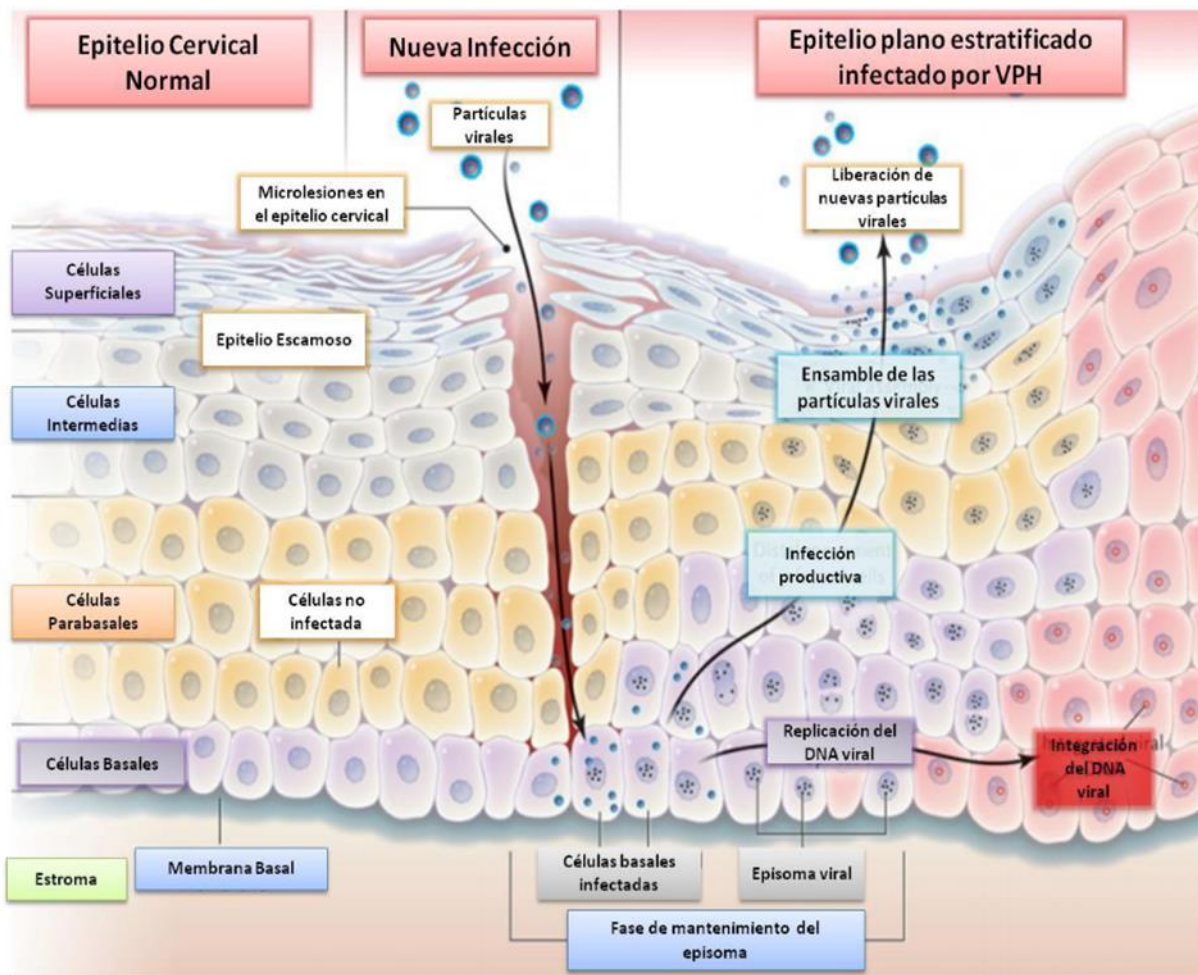


Figura 2. Ciclo replicativo del VPH en el epitelio plano escamoso estratificado. El VPH infecta las células basales a través de micro lesiones infectando las células basales, donde inicia una fase de mantenimiento del genoma. Al dividirse, una de las células hijas infectada se diferencia, iniciando la

fase de la infección productiva en donde se expresarán diversos genes para el mantenimiento y amplificación del genoma. En las capas superficiales, se lleva a cabo el ensamblaje de la cápside viral debido a la expresión de las proteínas tardías L1 y L2. Finalmente se liberan nuevos viriones que infectan nuevas células. En algunos casos, el genoma viral se integra al genoma celular, siendo este un evento importante para la carcinogénesis (Modificado de Kahn, 2009).

1.2. La proteína E1 del VPH

1.2.1. Estructura

La proteína E1 del VPH es la única con actividad enzimática, su actividad es fundamental durante todo el ciclo replicativo ya que interviene en el mantenimiento del genoma viral. E1 es una proteína que se localiza en el núcleo y en el citoplasma, está altamente conservada y es la de mayor longitud codificada por el VPH, su tamaño varía dependiendo del tipo viral, desde 600 hasta 650 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 67 a 72 kDa (Bergvall *et al.*, 2013).

La proteína E1 se divide en 3 dominios funcionales las cuales se representan en la figura 2. El dominio N-terminal de aproximadamente 200 aminoácidos, es el dominio menos conservado de E1, posee una señal de localización nuclear (NLS) bipartita, una secuencia de exportación nuclear (NES), así como un motivo de unión a ciclinas (CMB) involucrado con la interacción con la ciclina A/E y con el complejo dependiente de cinasas 2 (Cdk2). La porción central de la proteína E1 contiene el dominio de unión al DNA (DBD) que reconoce al origen de replicación localizado en la LCR, el cual es una secuencia palindrómica rica en AT. Finalmente, el dominio C-terminal posee la actividad de helicasa/ATPasa, así como contener secuencias implicadas en la oligomerización de la proteína (Côté-Martin *et al.*, 2008, Bergvall *et al.*, 2013).

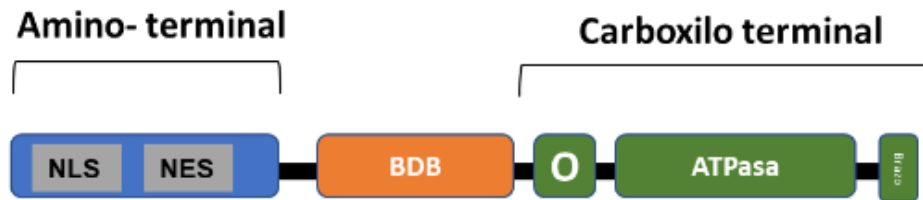


Figura 3. Dominios funcionales de la proteína E1 del VPH. El amino-terminal presenta dos segmentos importantes, la señal de exporte nuclear (NES) y la señal de localización nuclear (NLS), el dominio medio contiene la región de unión al DNA (DBD) el cual encuentra su sitio de reconocimiento en el genoma viral, particularmente en la LCR. Finalmente, el dominio Carboxilo-terminal, contiene la secuencia con actividad enzimática de helicasa/ATPasa además de contener un sitio de oligomerización (O) y una región denominada brazo que le proporciona flexibilidad cuando está en una conformación hexamérica (Modificado de Bergvall *et al.*, 2013).

Actualmente la única función atribuible a la proteína E1 del VPH es la de helicasa que funciona durante la replicación del genoma viral, la cual se representa en un esquema en la figura 3. La replicación del genoma viral es un proceso que da inicio cuando la proteína E1 reconoce y se une al origen de replicación que se localiza en la LCR. Para que esto suceda es necesaria la interacción con la proteína viral E2 la cual cuenta con sitios de reconocimiento en regiones adyacentes al origen de replicación lo que provoca que se afiance la interacción E1-origen de replicación, formándose el complejo ternario E2-E1-origen de replicación (Chiang, *et al.*, 1992). El complejo ternario permite el reclutamiento de más E1 y ATP, formándose un doble trímero, posteriormente se reclutan más E1 formándose un doble hexámero que se localiza en cada una de las cadenas, finalmente se lleva a cabo la hidrólisis del ATP para la formación de la horquilla de replicación y el reclutamiento de proteínas de la maquinaria de replicación (Bergvall *et al.*, 2013; Chiang CM., *et al.*, 1992). La maquinaria de replicación del hospedero es reclutada al genoma viral

mediante la interacción de E1 con alguno de sus componentes como: DNA polimerasa alfa-primasa (Park, *et al.* 1994), topoisomerasa I (Loo, Melendy, 2004) y la proteína de replicación A (Clower, Fisk, Melendy, 2006). Adicionalmente, se ha descrito la capacidad de E1 del VPH de interactuar con modificadores de la cromatina (Daeyoung. *et al.*, 1999, Eckhardt, *et al.*, 2018) sin embargo dichas interacciones se han descrito solo en función de la replicación del genoma viral.

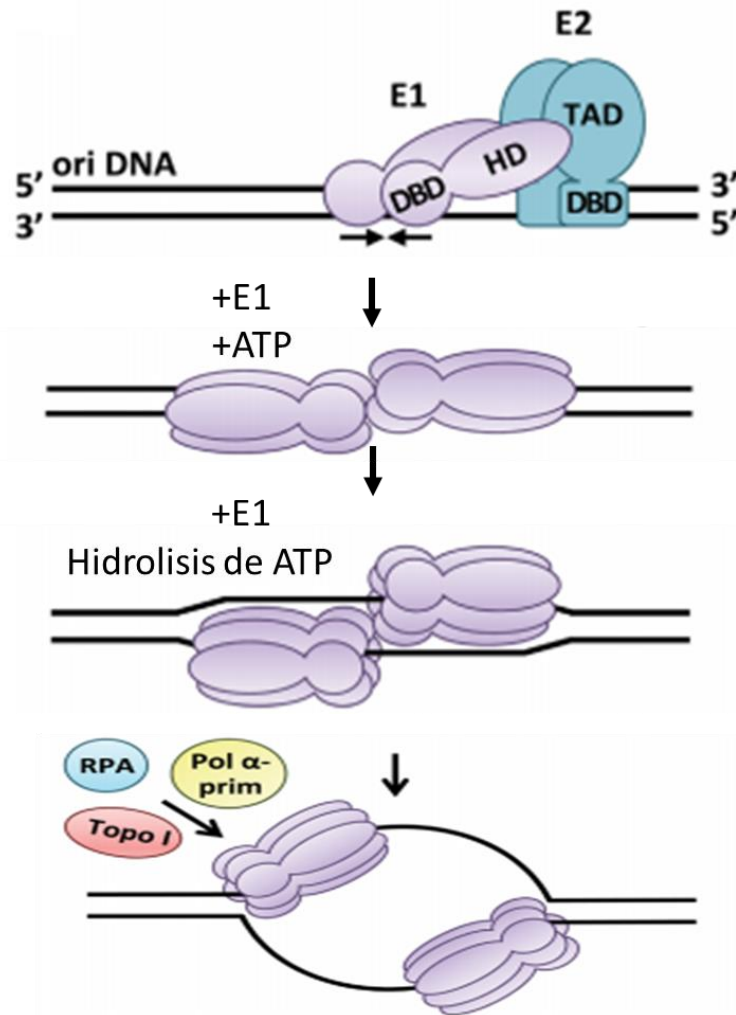


Figura 4. Participación de la proteína E1 durante la replicación del genoma viral. La replicación del genoma viral es mediada por E1 y E2, las cuales deben interactuar para afianzar la interacción E1-origen de replicación, permitiendo que se recluten más E1 y ATP formándose dobles trímeros, posteriormente se recluta más E1 formándose doble hexámeros que se posicionan en cada una de las cadenas

del DNA llevándose a cabo la hidrólisis de ATP. De esta manera se forma la horquilla de replicación y se reclutan proteínas que forman parte de la maquinaria de replicación del hospedero como RPA, Pol α -primasa, y RPA (Bergvall *et al.*, 2013)

1.3. Cromatina

La cromatina es el complejo de DNA e histonas, el cual provee el andamiaje para el empaquetamiento del material genético y está involucrado en procesos que incluyen la transcripción, la replicación y la reparación del DNA (Fyodorov, *et al.*, 2018).

Existen dos tipos de cromatina: heterocromatina, la cual es altamente compacta, se replica en la fase S tardía, principalmente contiene genes inactivos y se localiza en la periferia del núcleo; y eucromatina, la cual contiene genes transcripcionalmente activos y el grado de compactación es menor, sin embargo, estos componentes están sujetos a modificaciones covalentes, las cuales alteran la organización y función de la cromatina (Even-Faitelson, *et al.*, 2016).

La unidad básica fundamental de la cromatina es el nucleosoma, el cual está compuesto por dímeros de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, que al interactuar entre sí forman un octámero de histonas al cual se le asocian aproximadamente 147 pb de DNA, formando 1.75 vueltas alrededor, dando como resultado la interacción entre histonas y DNA (Mariño-Ramírez. *et al.*, 2005) (Figura 4). La cromatina se puede estructurar en una fibra más compacta de 30 nm de diámetro conocida como solenoide, el cual se estabiliza por la unión de la histona H1. A este nivel se forma la heterocromatina. Posteriormente, por interacciones entre las distintas asas de cromatina se compacta hasta llegar al cromosoma metafásico, el cual representa el nivel más alto de compactación de la cromatina (Luger y Hansen, 2005).

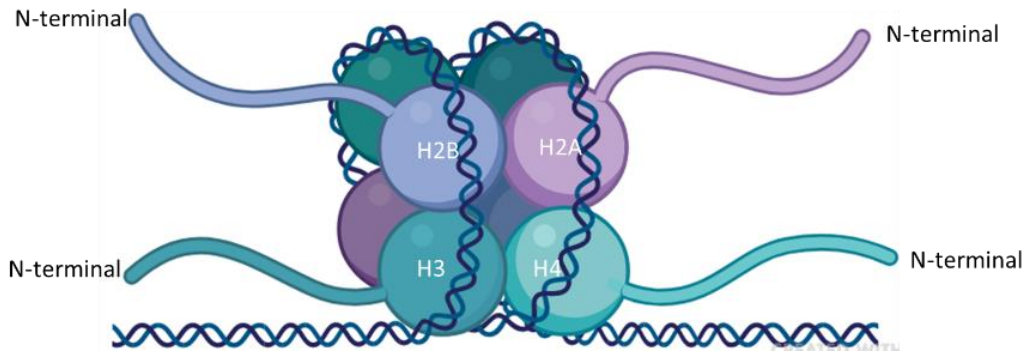


Figura 5. Nucleosoma: unidad fundamental de la cromatina. El octámero de histonas o nucleosoma se compone por dímeros de H2A, H2B, H3 y H4. El extremo amino terminal protruye del core nucleosómico, lo cual lo hace susceptible a modificaciones post traduccionales de histonas (Mariño-Ramírez. et al., 2005)

1.3.1. Mecanismos de regulación epigenética

Todos los genomas de las células eucariotes se organizan en cromatina, esto provoca que se genere una barrera para la maquinaria de distintos procesos celulares, como la transcripción y la replicación. De este modo resulta necesario que ocurran cambios en la estructura de la cromatina con el fin de que dichas maquinarias sean capaces de acceder a las secuencias blanco con el fin de expresar genes específicos o que se lleve a cabo la replicación en un tiempo y espacio definido (Cedar H, Felsenfeld G., 1973). Se han descrito seis distintos tipos de mecanismos epigenéticos capaces de alterar la estructura de la cromatina y así regular la expresión de genes: metilación del DNA, RNA's no codificantes, variantes de histonas, complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, modificaciones post traduccionales de histonas (MPT) y arquitectura o dinámica nuclear (Kajal, *et al.*, 2021).

1.3.2. Modificaciones post traduccionales (MPT) de histonas.

Las MPT de histonas es la adición de un grupo químico en residuos de histonas, principalmente en el extremo amino terminal, estas funcionan como señales

altamente específicas (Tabla 1) que provocan la apertura o el cierre de la cromatina que se refleja como un mecanismo para la regulación transcripcional de genes (Felsenfeld y Groudine, 2003). Los nucleosomas que la conforman son blancos de múltiples modificaciones post traduccionales, las cuales al ser reconocidas por diversos complejos proteicos regulan el nivel de compactación de la cromatina. Las MPT de histonas se han clasificado con base en la naturaleza bioquímica de cada modificación donde encontramos : la ADP-ribosilación, la metilación de lisinas y argininas, la fosforilación de serinas y treoninas, la ubiquitinación, la SUMOilación, la acetilación de lisinas, entre otras, las cuales repercuten de manera diferencial en la expresión de genes (Rando, *et al.*, 2012; Suganuma *et al.*, 2008).

Tabla 1. Diferentes clases de modificaciones post-traduccionales de Histonas que ocurren en los extremos amino terminal de las histonas (Rando, *et al.*, 2012; Suganuma *et al.*, 2008).

Tipo de modificación	Ejemplos	Efecto/Función
Acetilación	H3K9ac, H3K14ac, H4K16ac, H3K18ac	Activación transcripcional
Metilación	H3K4me3	Activación transcripcional
	H3K27me3, H3K9me2	Represión transcripcional
Ubiquitinación	H314ub, H3K23ub	Mantenimiento de la metilación del DNA durante la replicación del DNA
Fosforilación	H3S10ph y H3S28ph	Condensación y segregación de cromosomas

1.3.3. Enzimas reguladoras de las MPT de histonas

Las modificaciones de histonas son un elemento central en la regulación de la cromatina y su efecto en procesos celulares. La regulación de las MPT de histonas está balanceada por la acción de una serie de enzimas que son capaces de

adicionar, eliminar y reconocer dichas MPT, las cuales han sido clasificadas con base en esa característica en enzimas escritoras (“writers”), enzimas borradoras (“erasers”) y enzimas efectoras o lectoras (“readers”) (tabla 2) (Huang, *et al.*, 2015; Biswas y Rao, 2018).

Tabla 2. Enzimas reguladoras de las MPT de histonas (Huang, *et al.*, 2015; Biswas y Rao, 2018).

Familia	Actividad	Blanco catalítico	Clases de enzimas	Miembros representativos
Escritores (WRITERS)				
Acetiltransferasas de histonas (HATs)	Catalizan la acetilación de histonas	H3K9/K14/K56, H4K5/K8/K16, H2AK5	(1) Gcn5/PCAF (2) MYST (3) P300/CBP (4) Rtt109	P300/CBP, Tip60, Gcn5
Metiltransferasas de histonas (HMTs)	Catalizan la metilación de Histonas	H3K4/K9/K27/K36/K79, H4K20, H3R8	(1) SUV39 (2) SET1 (3) SET2 (4) RIZ (5) PRMTs	DOT1L, EZH2, SUV39H1
Borradores (ERASERS)				
Desacetilasas de Histonas (HDACs)	Catalizan la desacetilación de histonas	H3K9/K14, H4K5/K12/K8	(1) HDAC I (2) HDAC II (3) HDAC III (4) HDAC IV	HDAC1, HDAC3, HDAC6
Desmetilasas de histonas (HKDM)	Catalizan la desmetilación de histonas	H3K4/K9/K27/K36/K79, H4K20	(1) Desmetilasa específica de lisinas	JMJD2A, KDM5B, KDM2A
Lectores (READERS)				
Proteínas que contienen	Se unen a residuos de	H3K14, H4K5/K8/K16	(1) Bromodominios	GCN5, Brdt, Rsc4

bromodominios	lisinas acetiladas			
Proteínas con dominios PHD (plant homeodomain)	Se unen a residuos de lisinas metiladas o residuos de lisinas acetiladas	H3K4/K9/K14	(1) Dominios PHD	RAG2, BHC80, TAF3
Proteínas que contienen dominios de unión a lisinas y/o argininas metiladas	Se unen a residuos de lisinas o argininas metiladas	H3K4/K9/K23/K27/K36/K79, H4K20, H1K26, H3R17, H4R3	(1) Dominios TUDOR (2) Dominios MBT (3) Cromodominios (4) Dominios PWWP	53BP1/Crb2, HP1, PHF20L1

Una de las modificaciones post traduccionales de histonas mejor caracterizadas es la acetilación de histonas, la cual es un proceso dinámico controlado por la actividad enzimática y antagónica de dos tipos de enzimas. Las acetiltransferasas de histonas (HAT, “histone acetyltransferase”) que catalizan la transferencia de un grupo acetilo del Acetyl-CoA a las lisinas del extremo amino terminal de las histonas (Huang, *et al.*, 2015). Existen dos superfamilias de HATs, la familia GNAT y la familia MYST. La familia GNAT es la más estudiada y en mamíferos la subclase de GCN5 está representada por 2 proteínas: GCN5 y PCAF. La función de GCN5 se ha investigado in vitro e in vivo y se ha demostrado que es capaz de acetilar residuos de la histona H3 (Verdone, *et al.*, 2005). Por otra parte, el papel antagonista de las HATs las realiza las deacetilasas de histonas (HDAC, “Histone Deacetylases). Las HDACs se clasifican en cuatro clases: HDAC1, HADC2, HDAC3 y HDAC4, y en humanos se han caracterizado 18 distintas enzimas HDACs capaces de desacetilar residuos de histonas, así como proteínas no histonas (Seto, & Yoshida, 2014). La acetilación de

histonas genera una neutralización de cargas en la interacción de histonas-DNA dando como resultado que la cromatina se relaje y a nivel transcripcional se asocia con activación (Bannister y Kouzarides, 2011).

Adicionalmente se ha observado una alteración en los patrones de acetilación presente en muchos tipos celulares de cáncer, por ejemplo, el aumento global de H3K4ac en células de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) Adicionalmente se ha observado un incremento en la acetilación (H3K9ac y H3K23ac) favoreciendo la activación de la vía de señalización N-Ras. (Hałasa, *et al.*, 2019).

Otra modificación que ha sido ampliamente estudiada es la metilación de las histonas. Esta modificación epigenética puede ser reconocida por al menos cuatro dominios proteicos: cromodominios, dominios tipo tudor, dominios PHD y dominios WD40; por lo que las proteínas que contienen estos dominios son reclutadas de manera específica por histonas metiladas. La especificidad puede estar determinada por los niveles de metilación ya que se han descrito grados de metilación en las histonas: mono-, di-, y trimetilación (Bannister *et al.*, 2002).

2. Antecedentes

2.1. La proteína E1 del VPH regula modificadores de la cromatina

Se ha descrito que las proteínas E1 de distintos tipos de VPH son capaces de interactuar y/o afectar la actividad de proteínas involucradas en la regulación de la cromatina (Tabla 3) (Swindle y Engler, 1998; Lee. *et al.*, 1999; Zhang y Kraus, 2011) Estas caracterizaciones se realizaron en función de la replicación del genoma viral, sin embargo, estas interacciones pudieran estar involucradas en otros procesos como la regulación de la expresión de genes virales y del hospedero. En 1998 Scott Swindle y Jeffrey Engler, demostraron a través de far-western blot que E1 del VPH11 interactúa con la histona H1, posteriormente demostraron mediante un ensayo de protección con DNAsa que esta interacción provoca el desplazamiento de H1 de regiones en el genoma viral, de esta manera los autores concluyen que E1 es capaz de remover a la histona H1 del genoma del VPH, pudiendo regular diversos procesos en el genoma viral como la replicación o la transcripción del genoma viral. Además, estos resultados sugieren y refuerzan la idea de que el genoma del VPH se organiza en cromatina y que E1 del VPH pudiera estar regulando procesos en el genoma del hospedero al interactuar con la histona H1 (Scott Swindle y Jeffrey Engler, 1998).

Por su parte Lee Daeyoung y colaboradores, en 1999 demostraron mediante un ensayo de doble híbrido que E1 del VPH18 interactúa con hSNF5, la cual es una subunidad del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF. Adicionalmente, realizaron ensayos de replicación in vitro, donde variaban la concentración de Hsnf5 asociándose una concentración mayor de esta proteína a un aumento en la replicación del genoma viral. Este resultado lo validaron al mutar la secuencia de aminoácidos de hSNF5 que interactúa con E1, de esta manera se evitó la interacción y al repetir el ensayo de replicación in vitro se observó que bajo estas condiciones la tasa de replicación disminuía (Lee. *et al.*, 1999). Por lo tanto, determinan que E1 favorece la replicación viral al interactuar con Hsnf5.

Recientemente se describió la interacción de E1 de distintos VPHs con enzimas modificadoras de la cromatina. En 2018 Manon Eckhardt y colaboradores mapearon

las interacciones globales entre las proteínas del VPH tipo 31 con proteínas del hospedero en múltiples líneas celulares mediante un análisis de espectrometría de masas. Dentro de este análisis demostraron la interacción física de E1 con miembros de la familia modificadora de histona ANP32 (Manon Eckhardt *et al.*, 2018). La actividad de ANP32 se ha reportado como un regulador de la cromatina, principalmente como un represor transcripcional al inhibir la transferencia de grupos acetilos, mediante su unión a la histona H3 provocando una inhibición estérica de la acetilación (Eckhardt, M., 2018). Por otra parte, en 2019 Dipon Das y colaboradores demostraron que E1 interactúa con SIRT1 y de esta manera regula la fidelidad de la replicación del genoma viral además de que permite el reclutamiento de proteínas de respuesta a daño al DNA durante el ciclo viral (Dipon Das, *et al.*, 2019). Es importante destacar que SIRT1 es una desacetilasa de histonas capaz de actuar sobre residuos específicos como H3K9, H3K14, H4K16 y H1K26 (Zhang y Lee, 2011) (Tabla 3).

Todas estas caracterizaciones de la proteína E1 sobre modificadores de la cromatina se realizaron en función de su papel en la replicación del genoma viral, sin embargo, estas interacciones pudieran estar involucradas en otros procesos como la regulación de la expresión de genes virales y del hospedero.

Tabla 3. Las proteínas E1 de distintos tipos de VPH interactúan con modificadores de la cromatina (Zhang y Lee 2011; Lee. *et al.*, 1999; Eckhardt *et al.*, 2018)

Tipo viral	Proteína	Función celular de la proteína blanco	Mecanismos asociados
VP18	hSNF5	Remodelado de la cromatina	Replicación viral
VP11	H1	Histona Linker	Replicación viral
VP16	SIRT1	Desacetilasa de histonas	Replicación viral

VPH31	ANP32A	Inhibe acetilación de histonas	Replicación viral

2.2. E1 como regulador de la expresión de genes celulares

La proteína E1 del VPH se había descrito como una helicasa que participa exclusivamente en la replicación del genoma viral, sin embargo, diversos reportes indican que E1 es capaz de interactuar con modificadores de la cromatina, lo que sugiere que pudiera estar involucrado en otros procesos como la regulación de la transcripción de genes del hospedero. En ese sentido, se han hecho estudios sobre esta posible función de E1 del VPH.

Seedorf y colaboradores, en 1987, demostraron que las células derivadas de adenocarcinoma cervical, HeLa presentan en su genoma múltiples copias integradas de VPH-18, que codifican a un RNA mensajero policistrónico temprano que madura diferencialmente a tres RNAm que contienen información para la traducción de tres potenciales proteínas del VPH-18: E6, E7 y E1 (Seedorf. *et al.*, 1987). Castillo y colaboradores en el 2014 se plantearon demostrar el papel de E1 en la línea celular HeLa y si pudiera regular otros procesos celulares además de la replicación del genoma viral. Para esto, silenciaron al mRNA de E1 del VPH18 en células HeLa, mediante el uso de RNAs cortos de interferencia (siRNAs). Posteriormente tras el silenciamiento de E1 del VPH18 examinaron los cambios en la expresión de genes celulares a través de un análisis de microarreglos. El perfil de expresión de genes celulares fue comparado antes y después del uso del siRNA, encontrando 2669 genes expresados diferencialmente, de los cuales 1718 se sobre expresaron y 951 se sub regularon. El potencial biológico de los cambios inducidos por el silenciamiento de E1 se refleja en el enriquecimiento de genes asociados a distintos procesos, incluyendo tres vías canónicas: toll-like receptor (TLR), vías de

señalización de IFN, genes inducidos por interferón (ISG) y señalización de apoptosis (Castillo A. *et al.*, 2014).

Con estos antecedentes, en nuestro grupo de investigación, Castro-Muñoz y colaboradores, se preguntaron cuál era el papel de la presencia de E1 del VPH de alto y bajo riesgo en un contexto negativo a VPH en un modelo celular no canceroso, para ello emplearon células HaCaT que es una línea celular inmortalizada, derivada de queratinocitos. Mediante plásmidos que expresaban a E1 del VPH16, 18 y 11 independientemente, realizaron transfecciones transitorias, para que 24 h post-transfección se analizara si la presencia de la proteína E1 de VPHs modifica la expresión de genes celulares, para poder demostrar esto, extrajeron RNA de células HaCaT transfectadas con E1 del VPH de alto y bajo riesgo y mediante un RNAseq, encontraron que los tres tipos virales (16, 18 y 11) presentan la capacidad de regular la expresión de genes celulares. Sin embargo, E1 del VPH16 fue el que desregula un mayor número de genes (302 genes) en comparación con E1 del VPH 18 (86 genes) y 11 (72 genes). Finalmente mediante análisis *in silico* de gene ontology (clueGO) encontraron que los tres tipos virales regulaban en común genes asociados a la respuesta inmune antiviral, dicho hallazgo fue validado por q-PCR . (Castro-Muñoz. *et al.* 2019)

Con los trabajos de Castillo y Castro-Muñoz se demostró que E1, además de participar en la replicación del genoma viral es capaz de regular la expresión de genes celulares, aunque, los mecanismos por los que E1 participa en estos procesos, actualmente se desconocen. Sin embargo, la evidencia existente sugiere que E1 pudiera alterar mecanismos epigenéticos y así regular la expresión de genes celulares.

3. Justificación

Se ha descrito que la proteína E1 del VPH16 es capaz de regular la expresión de genes, afectando procesos celulares como la respuesta inmune antiviral. Sin embargo, los posibles mecanismos por los que E1 participa en dicha regulación no han sido descritos. Por otra parte, se ha demostrado que E1 es capaz de interaccionar con enzimas modificadoras de la cromatina, que de manera canónica participan en la regulación transcripcional a través de modificaciones post traduccionales de histonas.

De aquí surge el interés estudiar el papel de la proteína E1 del VPH-16 sobre la regulación de enzimas modificadoras de la cromatina y su efecto sobre modificaciones post traduccionales en las histonas, lo cual podría explicar en parte como la proteína E1 induce cambios en la expresión de genes celulares.

4. Hipótesis

La proteína E1 del VPH 16 regula la acetilación de histonas a través de la regulación con enzimas modificadoras de la cromatina, alterando de esta manera la expresión de genes celulares.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de E1 del VPH-16 sobre enzimas modificadoras de la cromatina y su impacto en la acetilación en las histonas.

5.2. Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de E1 del VPH16 sobre los niveles globales de marcas de acetilación de histonas.
2. Evaluar los niveles de enzimas modificadoras de la cromatina asociadas a marcas de acetilación de histonas desreguladas por E1 del VPH16
3. Identificar de manera *in silico* los genes regulados por las modificaciones post traduccionales de histonas alteradas por E1 del VPH-16.

6. Materiales y métodos

6.1. Línea celular

Se empleó la línea celular HaCaT, que es una línea celular adherente de queratinocitos humanos, los cuales fueron inmortalizadas espontáneamente a través de cambios en la concentración de calcio y temperatura. Se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco F12 (DMEM-F12) enriquecido con suero fetal bovino al 10% incubadas a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

6.2. Plásmidos

Se empleó un plásmido para la expresión de la proteína E1 del VPH 16, dicho plásmido contiene en su carboxilo terminal el tag -HA para su identificación. El plásmido fue donado por el Dr. Mart Ustav, Institute of Molecular and Cell Biology, Institute of Technology, University of Tartu, Estonia. Como control negativo empleamos el plásmido pCA, que no contiene secuencias codificantes para E1.

6.3. Transformación bacteriana

Para esta técnica se empleó la cepa DH5α de *Escherichia coli* la cual previamente sufrió un tratamiento para hacerlas competentes. El método de transformación utilizado fue mediante choque térmico. En tubos eppendorf de 1.5 se agregaron 100 ng del plásmido de E1 del VPH 16 y se le agregaron 200 µl de las bacterias competentes DH5α, se incubaron durante 30 min en hielo para posteriormente dar el choque térmico al pasarlo a una temperatura de 42 °C por 2 minutos para finalmente pasarlo a hielo durante 5 min. Al tubo se le añadieron 800 µl de medio LB estéril y se incubó 1 h a 37 °C en agitación a 300 rpm. Para verificar que transformación celular se haya realizado de manera correcta, las bacterias fueron sembradas en placas de agar LB suplementadas con 100 µg/mL de ampicilina como medio de selección y se incubaron a 37 °C toda la noche para la obtención de las colonias transformantes.

6.4. Purificación de DNA plasmídico

Después de la transformación bacteriana, se crecieron cultivos con las bacterias transformadas en medio LB con 100 ug/mL de ampicilina, el cual se incubó a 37 °C durante 12 h. en agitación constante. Para la extracción y purificación del plásmido se empleó el kit PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Este kit está basado en la extracción de plásmidos mediante lisis alcalina. Una vez con las bacterias crecidas en 300 ml medio LB, se centrifugo 6000xg durante 10 min a 4°C, el botón celular se resuspendió en 10 mL del buffer de resuspensión R3 con RNasa A, posteriormente se añadieron 10mL del buffer de lisis L7, mezclando cuidadosamente por inversión y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, se añadieron 10mL de buffer de precipitación (N3) mezclando por inversión. El lisado celular resultante se centrifugó a 12500x g durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se vertió en una columna equilibrada con buffer EQ1, permitiendo que la solución se drenara por gravedad. Se añadieron 60mL de buffer de lavado W8 a la columna, cuando todo el fluido se descartó, se añadieron a la columna 15 mL del buffer de elusión E4, permitiendo un flujo por gravedad en un tubo estéril. La solución eluida contiene el DNA purificado que fue precipitado con 10.5mL de isopropanol, posteriormente se centrifugó a 12500x g por 5 min a 4°C descartando el sobrenadante. El DNA se lavó una vez con 5mL de etanol al 70%, descartando el sobrenadante. El botón de DNA purificado se resuspendió en buffer TE. Se determinó la concentración e índice de pureza y se almacenó hasta su uso a -20°C.

6.5. Transfección

Después de obtener los plásmidos purificados fueron cuantificados mediante el espectrofotómetro NANODROP 2000 de Thermo Fisher. Dependiendo del experimento a realizar (extracción de RNA, extracción de proteínas totales, fraccionamiento nuclear o enriquecimiento de histonas) se estandarizaron distintas

condiciones. Para validar la transfección mediante WB, primero se sembraron 350,000 células HaCaT en una placa de 60 mm (P60), se incubaron 24 h para permitir la adherencia y una confluencia aproximadamente del 70 %, una vez en estas condiciones se preparó una mezcla con 100 µl medio sin suero, 4.5 µg del plásmido (PCA y E1VPH16) y 8 µl de Polyfectamina (QIAGEN) el cual es un dendrímero activado que permite la transfección; esta mezcla se incubó durante 25 minutos para posteriormente agregarla sobre la placa P60 con las células HaCaT al 70 % de confluencia con medio fresco. 24 horas post-incubación se realizó la extracción de proteínas totales.

6.6. Obtención de RNA y síntesis de cDNA

Se transfectaron células HaCaT con 4500 ng de los plásmidos PcA y E1 VPH16 en 1 placa de P60 con una confluencia del 70%, para cada una de las condiciones. 24 horas post transfección se obtuvo el RNA total de cada condición empleando el RNeasy mini kit (QIAGEN). El RNA obtenido de la extracción se resuspendió en 30 µl de H₂O libre de RNAsas, posteriormente fue tratado para asegurar la eliminación del DNA con el kit DNase Free DNA removal kit (Thermo Fisher Scientific). Se utilizaron 400 ng de RNA para la reversotranscripción (RT) empleando Oligo dT utilizando el kit GeneAmp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems, Foster City). La expresión de E1 del VPH 16 fue verificada por PCR punto final y observado en geles de agarosa. Los primers utilizados se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 4. Plásmidos

Gen	Forward	Reverse	Fragmento (pb)
E1 VPH16	GGTTACAACCATTAGCAGAT	ACCAATGGTCTATGCTTTAC	200

6.7. Western Blot

Para evaluar cambios en los niveles de proteína en condiciones de presencia/ausencia de E1 del VPH 16, así como los niveles de la misma, se emplearon distintos protocolos dependiendo del objetivo de cada experimento. Para todas las extracciones de proteínas se obtuvieron a partir de placas P60 con células

HaCaT con una confluencia aproximada del 70%, 24 horas post transfección. Dependiendo del objetivo se realizaron extracción de proteínas totales, fraccionamiento celular o extracción de histonas.

6.7.1. Extracción de proteína totales

Para la obtención de proteínas totales se aspiró el sobrenadante de las placas de las dos condiciones, se realizó un lavado con PBS 1X y se retiró el sobrenadante, finalmente se le agregó 500 µl de Laemmli 2X con β-mercaptoetanol, posteriormente se raspó la monocapa de células para despegarlas de la placa, finalmente se tomó todo el líquido con las células resuspendidas y se agregaron a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Para favorecer la lisis, se vortexeó 5 veces en un intervalo de 10 minutos, además el volumen total se hizo pasar por una jeringa de insulina 10 veces y se dio un choque térmico al exponerlos a 60 °C durante 10 minutos para posteriormente ponerlos en hielo. Los tubos se resguardaron a -20 °C

6.7.2. Fraccionamiento celular

Para la obtención y análisis de proteínas nucleares se empleó un protocolo de fraccionamiento celular, Para ello a partir de una placa P100 con células HaCaT aproximadamente al 70% de confluencia, posterior a las 24 horas de transfección, las células se lavaron con PBS 1X y posteriormente se resuspendieron en 300 µl de buffer de lisis (Tris 10 mM pH 6.5, Na₂S₂O₃·5H₂O mM, Triton X-100 al 1%, MgCl₂ 10 mM, sacarosa 25 mM y cóctel de inhibidores de proteasas) en un tubo eppendorf de 1.5 ml donde se incubaron durante 10 minutos en hielo, en este lapso de tiempo se le daba 5 golpes cada 3 minutos para favorecer la lisis. Pasando el tiempo las muestras se centrifugaban a 3500 rpm a 4 °C durante 10 minutos, al final obteníamos dos fases, el sobrenadante correspondía a la fracción citoplasmática, mientras que la pastilla correspondía a la fracción nuclear, al cual se le realizaron 2 lavados con PBS 1 X para eliminar las posibles trazas de citoplasma, posteriormente dicha pastilla se resuspendió en un buffer de extracción (HEPES 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM pH 8.0, EGTA 0.1 mM pH 8.0 y cóctel de inhibidores de

proteasas) se centrifugó usando un gradiente de sacarosa a 0.34M para la obtención de núcleos. A partir de este punto dependiendo de los objetivos podíamos emplear los núcleos obtenidos para su lisis y obtener un extracto nuclear o obtener un extracto enriquecido con histonas. Para obtener el extracto nuclear la pastilla se resuspendió en 50 μ l de buffer RIPA (Tris 100 mM pH 8.0, NaCl 250 mM, Nonidet P-40 al 0.5% y cóctel de inhibidores de proteasas) y se incubó durante 30 minutos, durante este lapso de tiempo se agitó la muestra cada 3 min para favorecer la lisis.

6.7.3. Extracción de histonas

En el caso de la obtención de extractos enriquecidos con histonas, tomamos los núcleos y los resuspendimos en 50 μ l de ácido clorhídrico al 0.4M adicionado con inhibidores de proteasas y fosfatasas y se incubó 24 horas en agitación, posteriormente se centrifugó la muestra a 14,000 rpm durante 30 min, el sobrenadante contenía el extracto enriquecido por lo que lo pasamos a otro tubo y agregamos 8 volúmenes de acetona es decir 400 μ l y nuevamente se incubó durante 24 horas a -20 C, al finalizar la incubación se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y dejamos que los restos de acetona se evaporaran hasta obtener una pastilla totalmente sólida la cual se resuspendió en 50 μ l de agua adicionada con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Los extractos se conservaron a -70 °C.

6.7.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)

Se realizó una electroforesis en geles desnaturalizantes con el fin de separar a las proteínas de interés a analizar de acuerdo a su peso molecular. Para el caso de las proteínas totales y extractos nucleares se corrieron en geles de SDS-PAGE al 10 % utilizando buffer de corrida 1X. Las muestras se cargaron en el gel y se corrieron inicialmente a 80 V hasta que las muestras cruzaron el gel concentrador para posteriormente correrlo a 100 V aproximadamente durante 3 horas, evitando que el frente de carga no salga del gel. En el caso de los extractos enriquecidos con

histonas, debido a su bajo peso molecular (10 y 15 KDa) se utilizó un gel de SDS-PAGE al 18%.

6.7.5. Transferencia

Después de la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de nitrocelulosa con poros de 0.2 μm (BioRad) en una cámara de transferencia húmeda con buffer de transferencia 1X frío a 100 V durante 1 hora. Para verificar que la transferencia ocurrió de manera correcta teñimos la membrana con rojo de ponceau al 1X, esta solución se une al extremo amino de las proteínas, una vez visualizado el patrón de las proteínas en la membrana se lavó con TBS-T 1x hasta eliminar el colorante.

6.7.6. Bloqueo de membrana e incubación de anticuerpos primarios y secundarios

La membrana se bloqueó con solución de bloqueo (leche al 7.5% en TBS-T1X) durante 1 hora en agitación. Posteriormente la membrana fue incubada con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4 °C, después de esto se realizaron 3 lavados con TBS-T 1X de 10 min cada uno en agitación para finalmente incubar el anticuerpo secundario el cual está acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora seguido de 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-T 1X.

6.7.7. Anticuerpos

En la siguiente tabla (Tabla 5) se muestran los anticuerpos primarios y secundarios que se utilizaron, así como la especie, catálogo y dilución que se utilizó:

Tabla 5. Anticuerpos empleados

Anticuerpo	Marca comercial	Especie	Dilución
Anticuerpos primarios			
H3K9ac	Millipore 06-942-S	Rabbit	1:4000
H3K14ac	Millipore 07-353	Rabbit	1:4000
H3K27me3	Millipore 07-449	Rabbit	1:4000
H3K23ac	Abccam ab46982	Rabbit	1:4000

GCN5	Cell Signallign C-26A10	Rabbit	1:2000
Pan-H4ac	07354	Rabbit	1:4000
Pan-H3ac	Upstate 06599	Rabbit	1:4000
Sirt1	Upstate 07131	Rabbit	1:1000
H4 total	Abcam ab10158	Rabbit	1:5000
H3 total	Abcam ab1791	Rabbit	1:10,000
HA mouse	Roche 12CA5 030220	Rabbit	1:1000
HA Rabbit	Cell signalling C29F4	Rabbit	1:1000
HDAC3	Active Motif	Rabbit	1:1000
GAPDH	Santa Cruz	Mouse	1:1000
Anticuerpos secundarios			
Anti-rabbit	Santa Cruz Biotechnologies, USA		1:10,000
Anti-mouse	Santa Cruz Biotechnologies, USA		1:10,000

Análisis estadístico

Los datos que muestran los efectos de E1 del VPH-16 en los diferentes ensayos, son presentados como promedios \pm DE . El valor de p se calculó mediante la prueba t de Student. Las diferencias fueron consideradas significativas con el valor de $p \leq 0.05$.

7. Resultados

7.1. Expresión y niveles de la proteína E1 del VPH16 en células HaCaT (Validación de sistema: transfección transitoria)

Para evaluar el efecto de E1 del VPH16 sobre procesos epigenéticos en la línea celular HaCaT, se estableció un sistema de expresión transitoria de E1 del VPH16. Las células HaCaT se transfectaron con E1 del VPH16 y pCA (control) y 24 horas post transfección se obtuvieron extractos totales y mediante WB se evaluaron los niveles de la proteína E1 del VPH16, para los niveles de expresión del RNA mensajero de E1, se realizó una PCR, para lo cual se obtuvo RNA de las células HaCaT transfectadas con los plásmidos. La figura 5A muestra un gel de agarosa al 2% en donde se visualizan los productos de amplificación de la PCR, de aproximadamente 200 pb, que corresponden al mRNA de E1 del VPH16, demostrando que las células expresan E1 a nivel del mRNA, mientras que en la figura 5B se muestra un WB, donde se observa una banda de aproximadamente 72 KDa correspondiente al peso molecular de la proteína E1, donde también podemos observar que en el carril de pCA no se observa dicha banda. Para identificar a la proteína E1, se utilizó el anticuerpo contra -HA, debido a que actualmente no existe un anticuerpo comercial contra E1.

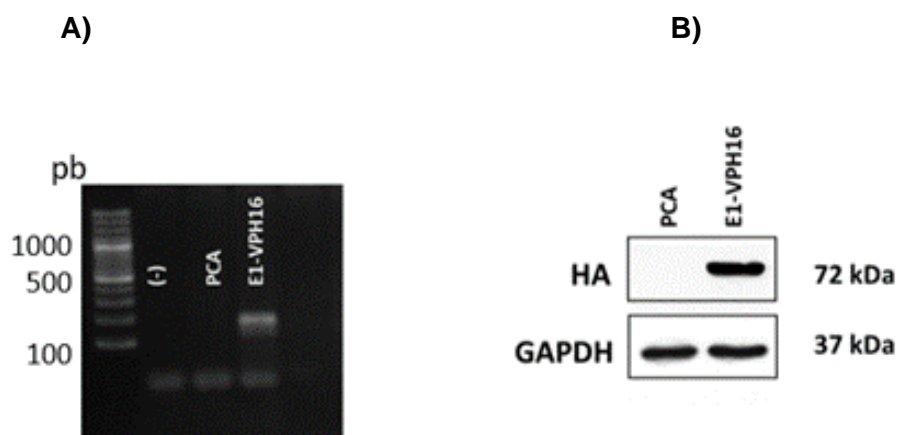


Figura 6. Expresión de E1 del VPH16. Células HaCaT transfectadas con E1 del VPH 16. A) Gel de agarosa al 2% que muestra los productos de PCR, amplicon de aproximadamente 200 pb correspondiente a E1 del VPH. B) Western Blot muestra

la expresión de E1 del VPH 16. GAPDH se utilizó como control de carga. Ambos experimentos se analizaron de extractos obtenidos de 24 h post transfección.

7.2. Enriquecimiento de extractos de histonas obtenidos de células HaCaT transfectadas con E1 del VPH16

Una vez que se estableció el sistema de transfección transitoria, estandarizamos la extracción de histonas por un método ácido. 24 h post transfección se hizo la extracción de núcleos y posteriormente la extracción de histonas. Los extractos de histonas se corrieron en un SDS-PAGE al 18% el cual fue teñido con azul de comassie (Anexo 2). En la figura 6 se pueden visualizar el gel de poliacrilamida en donde se observan 5 bandas las cuales en base a la literatura corresponden a las histonas canónicas H2A, H2B, H3, H4 y H1 (Figura 6B). Para corroborar si los extractos se enriquecían con histonas, se realizó un WB donde se analizó la presencia de las histonas canónicas H3 y H4 (Anexo 2). Adicionalmente, evaluamos la presencia de E1 del VPH-16 (figura 6A)

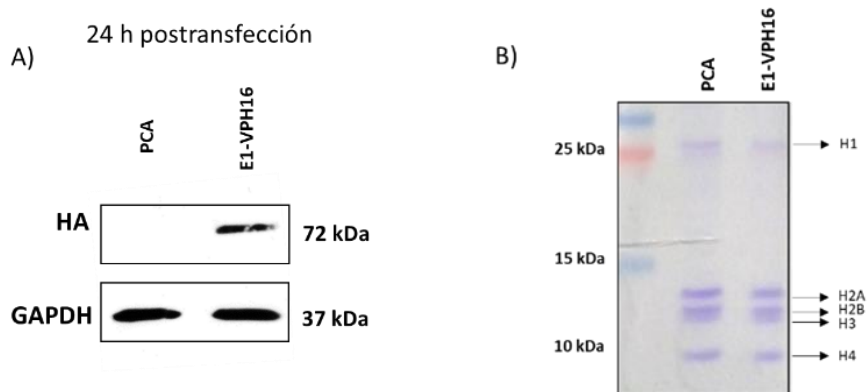


Figura 7. Extracción de histonas de células HaCaT transfectadas con E1 del VPH16. En la figura A, a partir de un input de extracto total se evaluó la presencia de E1 del VPH16, detectándola con el anticuerpo anti -HA. Como control de carga se utilizó GAPDH. En la figura B observamos los extractos de histonas que se corrieron en un gel SDS-PAGE al 18 % teñido con azul de comassie, en el cual cada banda corresponde a las histonas canónicas H2A, H2B, H3 y H4.

7.3. E1 del VPH16 induce un aumento en la acetilación de la histona H3.

Los antecedentes indican que la proteína E1 de distintos VPHs es capaz de interactuar y/o desregular diversos modificadores de la cromatina asociados a la acetilación de histonas como SIRT1 y ANP32 (Das D. *et al.*, 2019; Manon Eckherdt, *et al.*, 2018). Una vez que verificamos los extractos enriquecidos con histonas, procedimos a determinar el efecto de E1 sobre las MPT de histonas. Primero evaluamos la pan-acetilación de las histonas H3 y H4 (estos anticuerpos reconocen distintas marcas de acetilación, no especificadas en su inserto). En la figura 7A podemos observar por western blot los niveles de la pan-acetilación de las histonas H3 y H4 en presencia de E1 del VPH16. Al cuantificar la señal observamos en la gráfica (figura 7B) que en presencia de E1 del VPH16 hay un incremento estadísticamente significativo en los niveles de panH3ac en comparación con el control pCA. Por otra parte, en la figura 7C observamos que E1 del VPH16 provoca una tendencia de aumento en los niveles de panH4ac, sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos.

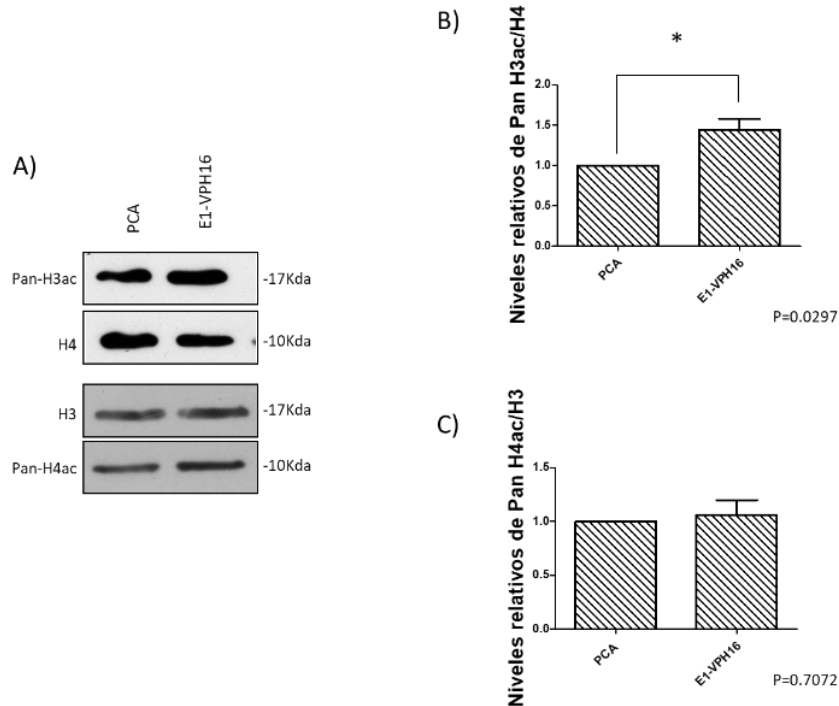


Figura 8. La proteína E1 induce un aumento en los niveles de panH3ac.

Cambios en los niveles de acetilación de la histona H3 y H4. A) Se muestra el WB donde se analizaron los niveles de pan-acH3 usando como control de carga a H4 y pan-acH4 usando como control de carga a H3 con sus respectivos controles de carga, en presencia de E1 del VPH16 y con el control pCA. B) Gráfica que representa la media de tres experimentos para la pan acetilación de H3 en donde se observa un cambio estadísticamente significativo (*), $p=0.0297$. Por otra parte la gráfica B) representa la media de los tres experimentos para la pan acetilación de H4 donde no encontramos cambios estadísticamente significativos. Para ambas graficas se normalizó con sus controles de carga H4 y H3 total respectivamente.

7.4. E1 del VPH16 induce el enriquecimiento de las marcas H3K9ac, H3K18ac.

Una vez que determinamos que E1 tiene un efecto sobre la acetilación de H3, quisimos determinar cuáles eran las MPT de histonas que cubre/evalúa el anticuerpo de panH3ac, sin embargo, el anticuerpo que empleamos no especifica

qué residuos de acetilación incluye, por lo que realizamos un análisis individual de marcas de acetilación de la histona H3 en las que incluimos: H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac y H3K23ac. En la figura 8A podemos observar un blot representativo para cada una de las marcas de acetilación analizadas. De las cuatro marcas analizadas solo la H3K9ac (Figura 8B) y la H3K18ac (Figura 8B) presentaron un aumento estadísticamente significativo. Por otra parte, H3K14ac mostró una tendencia en aumentar en presencia de E1 del VPH16, sin embargo, el cambio no fue estadísticamente significativo (figura 8C). Finalmente, no hubo cambios estadísticamente significativos de H3K23ac en presencia de E1 (Figura 8E)

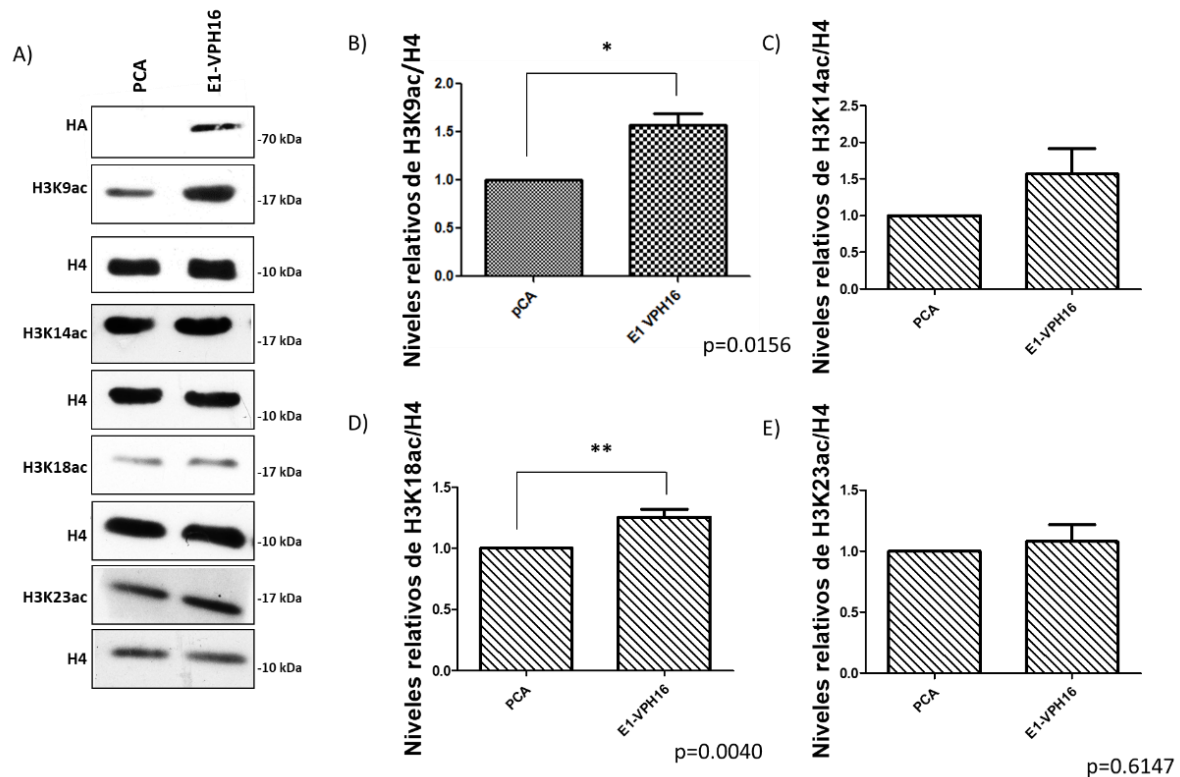


Figura 9. E1 del VPH16 induce un aumento en los niveles de las marcas H3K9ac y H3K18ac. A) De extractos de histonas, obtenidas 24 h. post transfección con E1 del VPH16 se muestra los WB de las marcas de histonas: H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac y H3K23ac. En las figuras: B) H3K9ac, C) H3K14ac, D) H3K18ac y E) H3K23ac, se muestra el análisis densito métrico para cada una de las marcas de

histonas. Encontrando un aumento estadísticamente significativo para H3K9ac, H3K14ac y H3K18ac en presencia de E1 del VPH16. Para cada caso las barras representan el triplicado biológico de cada marca, el valor de p para cada análisis se presenta en la parte inferior derecha de cada gráfica, como control de carga se empleó H4 total.

7.5. E1 del VPH16 no afecta marcas de represión transcripcional como H3K27me3.

Después de observar cambios en la acetilación de histonas decidimos evaluar una marca de metilación de histonas asociadas a la represión transcripcional, para ello evaluamos a H3K27me3 que es una marca asociada a represión transcripcional. Como podemos observar en la figura 9A se presenta un blot de los niveles de H3K27me3 en presencia de E1 del VPH16. Por otra parte, en la figura 9B se muestra el gráfico de las tres repeticiones experimentales y podemos observar que no hay cambios estadísticamente significativos en esta marca, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que E1 pudiera estar actuando sobre otras marcas de represión transcripcional. Por lo tanto, hasta el momento, estos resultados sugieren que E1 del VPH16 pudiera estar actuando sobre marcas de activación transcripcional, principalmente acetilaciones de histonas, lo cual, podría estar asociándose a la activación de ciertos genes. Es importante considerar que este análisis es una aproximación del efecto global que E1 pudiera estar realizando sobre las marcas de histonas, por lo que no descartamos que E1 del VPH16 pudiera estar afectando otras marcas de histonas relevantes para la regulación transcripcional de genes celulares.

A)

B)

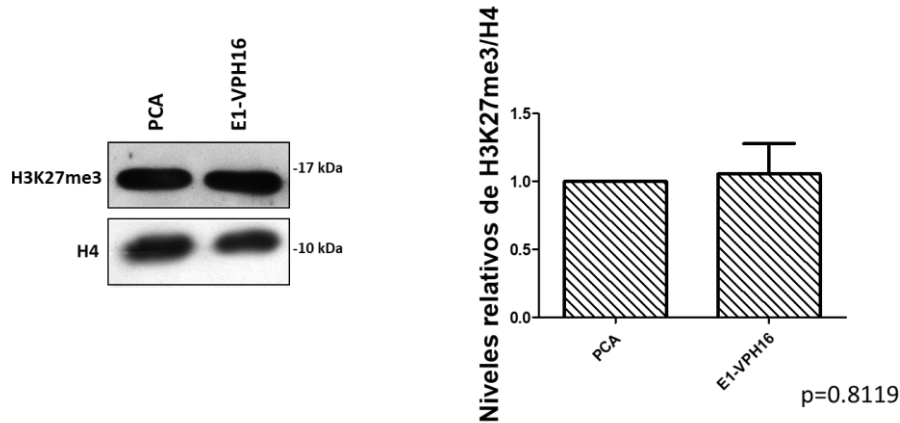


Figura 10. E1 del VPH16 no tiene efecto sobre la marca de represión transcripcional, H3K27me3. Se evaluó el efecto de E1 sobre la marca H3K27me3. A) se muestra un blot representativo de los niveles de H3K27me3 en presencia de E1 del VPH16. B) podemos observar la gráfica del triplicado biológico de los niveles de H3K27me3 en la cual no hubo cambios estadísticamente significativos, como control se empleó a H4 total.

7.6. E1 del VPH16 induce una disminución en los niveles de HDAC3.

Nuestro siguiente objetivo fue evaluar el efecto de E1 del VPH16 sobre modificadores de la cromatina asociados a las marcas de la histona H3 donde previamente encontramos cambios estadísticamente significativos en presencia de E1 del VPH16. Para ello evaluamos a HDAC3, esta es una deacetilasa de histonas, la cual es capaz de remover marcas de acetilación de proteínas histonas y no histonas, asociándose a la condensación de la cromatina haciendola inaccesible para la maquinaria transcripcional y asociándose a la represión transcripcional de ciertos genes (Tong, *et al.*, 2020). Como podemos observar en la figura 10A HDAC3 disminuye en presencia de E1 del VPH16, este resultado nos sugiere que E1 pudiera estar regulando las marcas de acetilación a través de la disminución de la enzima borradora HDAC3. Podemos asociar el aumento de ciertas marcas de acetilación como H3K9ac y H3K18ac con la disminución de la deacetilasa de histonas HDAC3, siendo un posible mecanismo por el cual E1 del VPH16 promueve cambios en la estructura de cromatina al evitar la desacetilación de ciertos genes y así favorecer la expresión de algunos genes. Finalmente, en la

figura 10B observamos el gráfico de los triplicados biológicos de HDAC3, confirmando que su disminución es estadísticamente significativa.

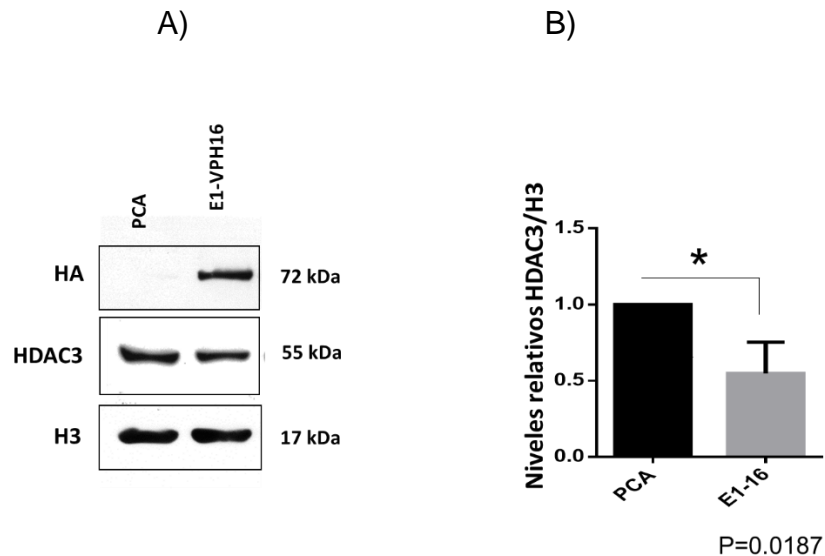


Figura 11. Los niveles de HDAC3 disminuyen en presencia de E1 del VPH16.

En la figura podemos observar un WB representativo del efecto de E1 del VPH16 sobre los niveles de HDAC3 a nivel de proteína. B) en la gráfica las barras representan los datos densitométricos de tres ensayos biológicos, donde se realizó una t de student para evaluar la diferencia entre el grupo control transfectado con pCA y el que expresa a E1 del VPH16, encontrando una disminución estadísticamente significativa, con una $p=0.0187$, como control de carga se empleó a H3.

7.7. E1 del VPH16 induce un aumento en los niveles de GCN5

Al observar la disminución en los niveles de HDAC3 y un aumento de la marca H3K9ac y H3K18ac, nos preguntamos si E1 del VPH16 podría tener algún efecto sobre enzimas escritoras que tengan como blanco estos residuos, por ello evaluamos los niveles de GCN5, que es una acetilasa de histonas específica para H3K9 (Jin, Q., et. al. 2011). Como podemos observar en la figura 11 A, GCN5 tiende a aumentar en presencia de E1 del VPH16, sin embargo, a partir del promedio de tres repeticiones biológicas y un análisis estadístico (Figura 11B) determinamos que dicho cambio no es estadísticamente significativo, lo que

sugiere que E1 del VPH16 provoca cambios en la dinámica de enzimas borradoras como HDAC3, pero no para enzimas escritoras como GCN5.

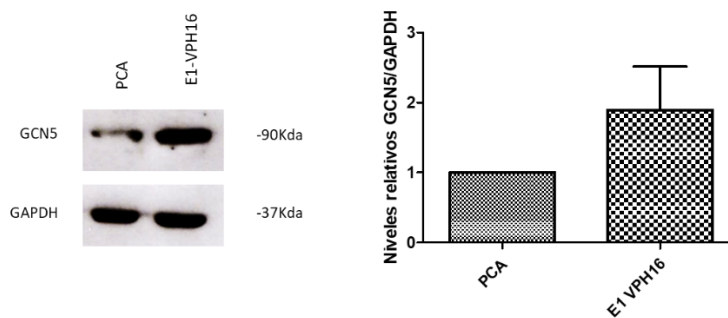


Figura 12. E1 del VPH16 incrementa los niveles de GCN5. A) observamos los blots representativos de dos experimentos de GCN5 en presencia de E1 del VPH16 y pCA. Empleamos -GAPDH como control de carga. En la figura B) se muestra una gráfica que representa los datos densitometricos de dos repeticiones biológicas, donde se observa un aumento de GCN5 en presencia de E1 del VPH16.

7.8. Posibles genes desregulados por E1 del VPH16 a través de cambios en H3K9ac.

Ya que observamos que E1 induce aumento en la marca de histona H3K9ac quisimos determinar cuáles eran los genes que se enriquecían con esta marca y ver si se asociaban con los genes desregulados por E1 del VPH16 a partir del transcriptoma (Castro-Muñoz., *et. al.*, 2019). Para ello realizamos un análisis *in silico*, con el objetivo de predecir qué posibles genes son blancos de regulación por E1 a través de la marca H3K9Ac. Por ello exploramos en bases de datos, como ENCODE-PROYECT, buscando información sobre qué genes y en qué regiones del gen se enriquecen la H3K9Ac (Figura 12). Encontrando datos de

ChIP-seq que, en queratinocitos de mujeres (NHEK) la marca H3K9ac se enriquece en los promotores de 29,797 genes, mientras que otro análisis de chIP-seq en cultivos primarios de queratinocitos de prepucio, el análisis nos arrojó que H3K9Ac se enriquece en promotores de 70,047 genes. Ambos análisis fueron comparados por lo que se muestra un diagrama de ven Euler en donde se muestra el número de genes que presentan en su promotor a H3K9Ac para cada análisis y en la intersección el número de genes que comparten (Figura 12)

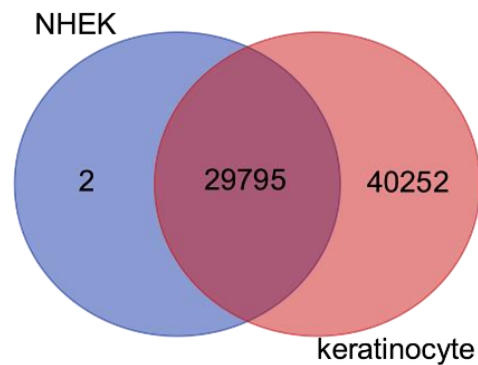


Figura 13. Número de genes con enriquecimiento de la marca H3K9ac, en líneas celulares de queratinocitos. En el diagrama de Venn observamos el número de genes con enriquecimiento de la marca de H3K9ac, tanto en la línea celular NHEK y de queratinocitos, observando comparten 29,795 genes con enriquecimiento de la marca de H3K9ac.

A partir de datos de un transcriptoma, se obtuvo que E1 del VPH16 es capaz de desregular 302 genes celulares, 103 están sub-expresados y 199 están sobre-expresados (Castro-Muñoz., *et. al.*, 2019). Partiendo de los 29,795 genes que presentan en su promotor a la marca H3K9Ac, realizamos un análisis para determinar que genes de los desregulados por E1 (transcriptoma) presentan enriquecimiento de la marca de H3K9ac (in silico) (figura 13). Interesantemente encontramos que 30 genes son sub-regulados en común por la marca H3K9Ac y E1 del VPH16 (Tabla 6), mientras que 117 genes que están sobre expresados en

presencia de E1 del VPH16 presentan un enriquecimiento de la marca H3K9ac (Tabla 7)

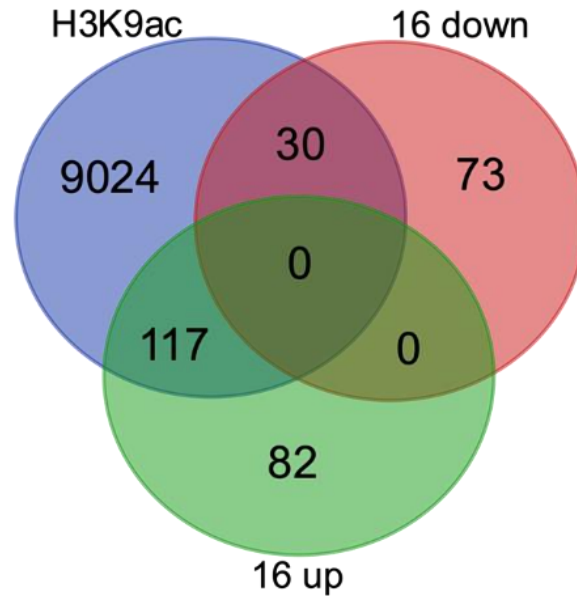


Figura 14. Genes regulados por E1 del VPH16 con enriquecimiento de H3K9Ac.

El diagrama de ven muestra la asociación de genes regulados por E1 y con presencia de H3K9ac. En el círculo rojo se presentan los 30 genes sub-expresados con enriquecimiento de E1 del VPH16 (16 down), el círculo verde representan los genes sobre-expresados en presencia de E1 del VPH16 (16 up) siendo 117 los que presentan un enriquecimiento de la marca H3K9ac.

Finalmente, de los genes regulados por E1 del VPH16 y H3K9ac, se realizó un análisis de gene ontology, para identificar procesos celulares a los que se asocian dichos genes. Los procesos celulares asociados regulados por la marca H3K9ac y que se sub-expresan en presencia de E1 del VPH16 se presentan en la tabla 6, mientras que los genes que presentan en su región promotora a la marca H3K9ac y son sobre-expresados en presencia de E1 del VPH16 se presentan en la tabla 7.

Tabla 6 Genes regulados por H3K9ac sub expresados en presencia de E1 del VPH16.

Down HPV16 H3K9ac	Adjusted P-value	Genes
Interferon Gamma Response	2.09E-10	STAT2;CASP1;TNFSF10;EPST11;TRAFD1;PARP14;USP18;IFIT3;PML
Interferon Alpha Response	9.88E-10	STAT2;CASP1;EPST11;TRAFD1;PARP14;USP18;IFIT3
TNF-alpha Signaling via NF-kB	0.017209473	DNAJB4;ACKR3;HES1
p53 Pathway	0.017209473	SESN1;CASP1;TRAFD1
PI3K/AKT/mTOR Signaling	0.045322746	VAV3;STAT2

Tabla 7. Genes regulados por H3K9ac sobre expresados en presencia de E1 del VPH16

UP HPV16 H3K9ac	Adjusted P-value	Genes
TNF-alpha Signaling via NF-kB	1.89E-20	DUSP4;SERPINB2;SDC4;DUSP1;SERPINE1;PLAUR;FOS;SERPINB8;GEM;NFKB2;VEGFA;NR4A2;FOSL1;YRDC;PTPRE;IL23A;F2RL1;FOSB;TRIB1;LDLR;CD44;HBEGF
Epithelial Mesenchymal Transition	1.56E-11	SERPINE2;SDC4;ITGA2;SERPINE1;COL12A1;TFPI2;LAMA3;PLAUR;LAMC2;DKK1;GEM;VEGFA;NTSE;ITGA5;CD44
IL-2/STAT5 Signaling	1.73E-09	PRNP;NRP1;AHNAK;ODC1;EMP1;NTSE;CDCP1;PIM1;SNX9;PLIN2;CD44;BCL2L1;PLEC
KRAS Signaling Up	1.73E-09	NRP1;ITGA2;PLAUR;EMP1;DUSP6;ETV5;EREG;YRDC;F2RL1;ADAM8;PLEK2;TRIB1;HBEGF
Hypoxia	1.79E-07	SDC4;DUSP1;ADORA2B;DDIT3;SERPINE1;PIM1;PLAUR;PLIN2;FOS;EGFR;VEGFA
Inflammatory Response	1.79E-07	PTPRE;ADORA2B;SERPINE1;PLAUR;HAS2;ITGA5;OSMR;LDLR;CD55;EREG;HBEGF
UV Response Dn	1.20E-04	NRP1;DUSP1;ADORA2B;DLC1;SERPINE1;HAS2;LDLR
Complement	1.20E-04	DOCK4;SERPINB2;SERPINE1;TFPI2;PIM1;PLAUR;DUSP6;CD55
Apoptosis	0.001691777	SLC20A1;DDIT3;EMP1;CD44;EREG;BCL2L1
Glycolysis	0.00431136	PYGB;NTSE;ADORA2B;CD44;EGFR;VEGFA
p53 Pathway	0.00431136	PLK3;PTPRE;DDIT3;STOM;FOS;HBEGF
Coagulation	0.004486234	SERPINE2;ITGA2;SERPINE1;TFPI2;DUSP6
TGF-beta Signaling	0.012284742	BCAR3;SLC20A1;SERPINE1
Estrogen Response Early	0.017653963	MAST4;DLC1;FLNB;FOS;CD44
Estrogen Response Late	0.017653963	TFPI2;LAMC2;FLNB;FOS;CD44
IL-6/JAK/STAT3 Signaling	0.03712002	PIM1;OSMR;CD44
Hedgehog Signaling	0.04277171	NRP1;VEGFA
Angiogenesis	0.04277171	NRP1;VEGFA
Mitotic Spindle	0.061550628	AKAP13;DYNC1H1;DOCK4;FLNB
Apical Junction	0.061550628	ITGA2;LAMA3;LAMC2;EGFR

Todos estos resultados nos indican que la proteína E1 del VPH16 es capaz de regular los niveles de modificadores de la cromatina, los cuales impactan en las modificaciones postraduccionales de histonas, lo que nos sugiere un posible mecanismo por el cual E1 del VPH16 pudiera estar regulando la expresión de genes celulares. De manera interesante identificamos una asociación entre los genes que se ven enriquecidos con una de las marcas de histonas aumentada en presencia de E1 del VPH16 (H3K9ac) y los genes regulados por la presencia de

E1 del VPH16 en queratinocitos, lo que nos lleva a pensar que posiblemente la regulación de las modificaciones postraduccionales de histonas pudieran impactar en la regulación de procesos asociados a carcinogénesis como transición epitelio-mesénquima, apoptosis y angiogénesis.

8. Discusión

8.1. La proteína E1 del VPH regula la expresión de genes celulares.

La proteína E1 de VPH, ha sido descrita como la única proteína viral del VPH con actividad enzimática ya que presenta un dominio de helicasa dependiente de ATP, el cual favorece la replicación del genoma viral (Bergvall *et al.*, 2013). La proteína E1 es capaz de interactuar con proteínas de la maquinaria de replicación celular, tales como DNA pol- α -primasa, la topoisomerasa I y RPA (Park, *et al.* 1994; Loo, Melendy. 2004; Lee. *et al.*, 1999; Eckhardt *et al.*, 2018).

Por otra parte, se ha descrito que la proteína E1 del VPH no solo participa en la replicación del genoma viral, dado que en los últimos años se ha descrito que E1 juega un rol importante en la regulación de la expresión de genes celulares. El primer acercamiento a este descubrimiento se realizó en 2014 por Castillo y colaboradores, ellos demostraron que silenciar la expresión a E1 del VPH18 en la línea celular HeLa provocaba un aumento en la expresión de genes asociados principalmente a respuesta inmune y apoptosis (Castillo *et al.*, 2014). Posteriormente en 2019 Castro-Muñoz y colaboradores corroboraron dicho hallazgo al evaluar el efecto de la proteína E1 de VPHs de alto y bajo riesgo sobre la expresión de genes celulares. Para ello emplearon la línea celular HaCaT, el cual es un modelo negativo a VPH que les permitió expresar a E1 del VPH confirmando mediante un RNA-seq que E1 es capaz de regular la expresión de genes, para posteriormente validar que algunos de estos genes desregulados se asocian a la respuesta inmune antiviral (*IFN β 1* e *IFN λ 1*) (Castro-Muñoz *et al.*, 2019).

Actualmente sabemos que la proteína E1 del VPH regula la replicación del genoma viral a través de la interacción con modificadoras de la cromatina como hSNF5, SIRT1, H1 y ANP32A. Esto nos sugiere que E1 pudieran no solamente participar en la replicación del genoma viral, sino que posiblemente estas interacciones pudieran estar involucradas en la regulación de la expresión de genes celulares.

Por otra parte se ha demostrado que otros virus como el virus de Hepatitis B (HBV), virus de Epstein Barr (EBV), el citomegalovirus humano (HCMV) y herpesvirus (HSV) así como el VPH son capaces de organizar su genoma en cromatina, en algunos casos esto les permite regular fases de su ciclo viral, mediante procesos epigenéticos como las modificaciones post traduccionales de histonas, alterando no solamente la expresión de sus propios genes, sino que también alteran el “landscape” epigenético normal del hospedero. Una característica en común de estos virus es que codifican proteínas que interfieren en el funcionamiento normal de las enzimas modificadoras de la cromatina regulando, así, diversos procesos virales y celulares (Lieberman., 2008; Michael Favre, *et al.*, 1977).

Por ello consideramos que la proteína E1 pudiera estar participando en la regulación de la expresión de genes celulares, aunque no descartamos la idea de que también afecte y regule la expresión de genes virales a través de enzimas modificadoras de la cromatina que regulen las modificaciones post traduccionales de histonas.

8.2. La proteína E1 del VPH16 induce un aumento en los niveles de acetilación.

Las marcas de acetilación en las histonas están asociadas invariablemente con la activación transcripcional de genes, esta observación se basa en la naturaleza bioquímica de los grupos acetilos, que permiten la descompactación del DNA ya que induce la neutralización de cargas que median la interacción entre las histonas y el DNA (Zhou, J., *et al.*, 2010). Es por ello que en este trabajo evaluamos el efecto de E1 del VPH16 sobre los niveles globales de acetilación de la histona H3 y la histona H4.

Encontramos que la proteína E1 del VPH16 induce un ligero aumento en los patrones de acetilación de la histona H4, sin embargo, no encontramos que estos cambios fueran estadísticamente significativos. A pesar de estos resultados, no podemos asegurar que E1 no afecta la acetilación específica de residuos en la histona H4, ya que el experimento se realizó empleando un anticuerpo contra la pan-acetilación de la histona H4. Para poder verificar que realmente E1 no afecta la

acetilación de H4, resultaría interesante evaluar el efecto de E1 sobre la histona H4 mediante un análisis más robusto como la espectrometría de masas o algunas marcas de acetilación en la histona H4 de manera individual. Por ejemplo, la marca H4K16ac es una marca de particular interés ya que promueve la descompactación de los nucleosomas en modelos in vitro y en modelos de stem cells (ESCs) se ha observado que dicha marca se encuentra enriquecida en enhancers activos (Taylor, *et al.*, 2013). Además, se ha observado que algunos virus, como HSV-1, son capaces de inducir un aumento significativo de la marca H4K16Ac durante la fase de latencia de su ciclo infectivo (Napoletani, *et al.*, 2021). Adicionalmente las marca H4K16ac así como H4K8ac y H4K12ac se encontraron enriquecidas en los mini cromosomas en viriones de papilomavirus bovino 1 (BPV-1), sin embargo no se conoce si alguna proteína viral pudiera estar participando en el establecimiento de estas marcas, por lo que sería de gran interés investigar un posible rol de E1 en la regulación de la replicación y transcripción del genoma viral a través de la regulación de su cromatina (Porter, *et al.*, 2021).

De manera interesante, observamos que la presencia de la proteína E1 del VPH16 indujo un aumento estadísticamente significativo en los niveles globales de acetilación de la histona H3. Esto nos indica que E1 pudiera promover la activación transcripcional de ciertos genes a través de cambios en la acetilación de histonas. Este resultado nos llevó a preguntarnos qué marcas en específico era capaz de modificar la presencia de E1 del VPH16.

8.3. E1 del VPH16 induce un aumento en las marcas H3K9ac y H3K18ac.

Después de encontrar que la proteína E1 del VPH16 altera los patrones globales de acetilación de la histona H3, decidimos analizar el efecto de E1 sobre marcas específicas de acetilación en residuos de la histona H3. Para ello evaluamos a H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac y H3K23ac.

Encontramos un aumento estadísticamente significativo en H3K9ac en presencia de E1 del VPH16, lo cual correlaciona directamente con el aumento general de la acetilación de la histona H3 inducida por la proteína E1 del VPH16.

La H3K9ac juega un papel importante en la regulación transcripcional de genes celulares (Kratz *et al.*, 2010). Esta marca se localiza río abajo del sitio de inicio de la transcripción (SST) y está restringida a regiones de eucromatina. (Zhou, J., *et al.*, 2010). Además, la H3K9ac también participa en la transición del inicio a la elongación de la transcripción a través del reclutamiento del super complejo de elongación (SEC) y la posterior activación de la RNA pol II (Gates, *et al.*, 2017).

Adicionalmente, esta marca ha sido desregulada por otros virus como es el caso de HSV-1, que 24 horas post-infección provoca una pérdida de H3K9ac y H3K18ac (Zhu, *et al.*, 2018). En contraste la onco-proteína e1a de adenovirus induce una disminución de la marca H3K18ac así como un enriquecimiento de H3K9ac (Ferrari, *et al.*, 2012).

En diversos tipos de cáncer como cáncer de hígado, ovario y mama se ha evaluado la H3K9ac y se ha asociado con datos clínicos (Zhen *et al.*, 2010; Ji, H., *et al.*, 2019). Por ejemplo, en cáncer de ovario se encontró que la disminución de H3K9ac está asociada con la progresión tumoral, así como con el estadio clínico (Zhen *et al.*, 2010). Por lo cual, esto sugiere que la desregulación de H3K9ac pudiera servir como un marcador pronóstico en la clínica, para ello sería importante estudiar lesiones precancerosas positivas a VPH para evaluar sus niveles y asociación con distintos parámetros clínicos.

El código de histonas sugiere un orden específico temporal de ciertas marcas de histonas que determinan el contexto transcripcional de ciertos genes. En este sentido sabemos que H3K9ac y H3K14ac co-localizan en ciertos contextos, por ejemplo, en células embrionarias stem (ES) H3K9ac y H3K14ac muestran una alta correlación en comparación con otras marcas, sugiriendo una regulación coordinada de marcas de histonas de activación, además también exhiben una alta correlación activa en promotores bivalentes (Abdelghani, *et al.*, 2012). Esto es

interesante debido a que, en presencia de E1 del VPH16 también observamos un ligero aumento de la marca H3K14ac, sin embargo, hasta el momento con solo una réplica, no pudimos determinar si el cambio fue estadísticamente significativo. Pero la tendencia de aumento en estos dos primeros ensayos nos sugiere que E1 del VPH16 es capaz de alterar la cromatina, promoviendo la formación de un código de histonas específico. Además, sería interesante analizar otras marcas asociadas al enriquecimiento de H3K9ac.

Otra de las marcas aumentadas en presencia de E1 del VPH16 fue la marca H3K18ac, como ya lo mencionamos, esta marca se ve alterada por agentes biológicos como HSV-1 o adenovirus (Zhu, et al., 2018; Ferrari, *et al.*, 2012), esta marca también se asocia con activación transcripcional, se ha descrito que se asocia a la región promotora de ciertos genes como XPA, XPD y XPF (Zhang, *et al.*, 2020). H3K18ac se ha descrito como una marca asociada a ciertas enfermedades como el cáncer, ya que es capaz de regular genes que codifican para proteínas clave en vías de señalización asociadas a ciclo celular y mecanismos de reparación de daño al DNA (Zhang, *et al.*, 2016). Adicionalmente, la marca H3K18ac es una marca frecuentemente aberrante en muchos tipos de cáncer como: cerebro, mama, colon, gástrico, hígado, próstata y cánceres orales. Esto convierte a H3K18ac en un importante factor pronóstico para pacientes con diferentes tipos de cáncer, sin embargo, su participación en carcinogénesis aún debe ser estudiada (Hałasa, *et al.*, 2019).

El hecho de que la presencia de la proteína E1 del VPH16 sea capaz de inducir cambios en los patrones de acetilación en la histona H3, sugiere que es capaz de reorganizar el epigenoma a través del código de histonas del hospedero, y de esta manera regular la actividad transcripcional de ciertos genes celulares, más específicamente a través de las marcas H3K9ac y H3K18ac. A pesar de los resultados obtenidos, sería de gran interés determinar que otras marcas de histonas son reguladas por E1 del VPH16 y si estas están asociadas con la regulación de la transcripción de genes celulares o virales.

8.4. E1 del VPH16 induce cambios en modificadores de la cromatina

Las modificaciones post traduccionales de histonas pueden actuar para inducir o reprimir la transición de una cromatina abierta a una cerrada, regulando la actividad transcripcional de ciertos genes, y esto depende de la regulación de las enzimas modificadoras de la cromatina (Gillette, *et al.*, 2015).

La proteína E1 de VPH16 induce una tendencia al aumento en los niveles de la proteína GCN5, la cual es una acetiltransferasa que es capaz de generar distintos patrones de acetilación de histonas dependiendo de su asociación con otros factores. Esto quiere decir que dependiendo del complejo que forme GCN5, va a determinar que residuos de lisinas son acetilados, por ejemplo cuando se forma el complejo SAGA (Spt/Ada/Gcn5) se acetilan preferentemente los residuos H3K9 y H3K14, por otra parte también se ha observado *in vivo* que es capaz de acetilar al residuo H3K18 (Grant, P. A., *et al.*, 1999). Esta tendencia al aumento de Gcn5 en presencia de E1 del VPH16 sugiere una posible asociación con el enriquecimiento de las marcas H3K9ac, H3K18ac y H3K14ac. Por lo que sería interesante determinar cómo E1 pudiera estar regulando a GCN5, para lo cual se podrían hacer ensayos de interacción E1-Gcn5 y evaluar los complejos a los que se asocian GCN5 en presencia de E1 del VPH16.

Por otra parte, una enzima borradora asociada al aumento de las marcas H3K9ac y H3K14ac es HDAC3, la cual forma parte de la clase I de la familia de las HDACs. Esta desacetilasa al ser inhibida provoca un aumento en las marcas de la histona H3 como H3K9ac, H3K14ac y también en residuos de la histona H4 como H4K5ac y H4K12ac (Kratz *et al.*, 2010). Esto es interesante ya que encontramos una disminución de HDAC3 en presencia de E1 del VPH16, lo que correlaciona en gran medida al aumento de las H3K9ac y H3K14ac.

Finalmente, encontramos una correlación entre la disminución de la desacetilasa de histonas HDAC3, la tendencia de aumento de la acetil-transferasa de histonas GCN5 y el enriquecimiento de marcas de acetilación: H3K9ac, H3K18ac y H3K14ac.

Al observar estos resultados, sería interesante determinar qué otros modificadores de la cromatina pudieran ser afectados por E1, así como determinar cómo es que

afecta la función de las enzimas modificadoras de la cromatina ya descritas, para comprender mejor el rol de la proteína E1 en la regulación de la expresión de genes celulares por mecanismos epigenéticos.

8.5. Posible participación de la proteína E1 del VPH16 en la carcinogénesis

El estado físico del genoma del VPH siempre se ha considerado como una parte integral de la progresión del cáncer. Esto es verdadero en el caso del VPH18, en donde el 98 al 100% de todos los casos de cáncer muestran una completa integración del genoma viral en el genoma del hospedero (carcinoma), sin embargo, se ha demostrado en muchos estudios que el VPH16 muestra un patrón de integración diferente en comparación con la progresión de la enfermedad, encontrando solo un 27.7% de integración del genoma en lesiones precancerosas (Zhang, *et al.*, 2014). Por otra parte se ha detectado que en carcinoma de células escamosas (SCC) la forma episomal del VPH está presente en el 73.68% de casos (Dutta S, *et al.*, 2015) sugiriendo que la forma episomal es importante para la progresión del cáncer asociada a VPH16. Esto es interesante porque nos hace especular que los niveles de E1 son un posible factor determinante en la carcinogénesis al ser la proteína que regula la replicación del genoma viral (Baedyananda, *et al.*, 2017). Adicionalmente conocemos que tras el silenciamiento de E1 del VPH18 en células HeLa se inducen cambios en la expresión de genes que regulan procesos asociados a cáncer, como apoptosis y evasión de la respuesta inmune. (Castillo., *et al.* 2014).

Finalmente, en este trabajo se demostró que E1 del VPH16 provoca el aumento en marcas de histonas asociadas con la activación transcripcional como H3K9ac, H3K18ac y H3K14ac. Esto es relevante porque la marca H3K9ac se encuentra aumentada en presencia de E1 del VPH16 además de que se ha propuesto como un marcador pronóstico para carcinoma oral de células escamosas (OSCC)

(Webber., *et al.*, 2017). Además, H3K9ac también se ha correlacionado con una sobrevida corta libre de progresión en cáncer de mamá (Berger, L., *et al.*, 2020). Estos resultados y antecedentes nos llevaron a analizar de manera *in silico* los genes que presentan en su región promotora a la H3K9ac, los cuales contrastamos con los 302 genes desregulados por E1 del VPH16 (Castro-Muñoz LJ., *et al.*, 2019). De manera interesante un gran número de los genes que presentan la H3K9ac en el análisis *in silico* están sobre expresados en presencia de E1 del VPH16 (82 genes) y gran parte de estos genes se asocian a procesos relacionados a cáncer como: transición epitelio-mesenquima (CD44, TFPI2, PLAUR, etc.), apoptosis (BCL2L1, EMP1, etc.) y angiogénesis (NRP1 y VGFA). Por lo que resulta interesante realizar estudios de ChIP-qPCR para validar la asociación en tre el aumento de la marca H3K9ac y el aumento en la expresión de genes asociados a cáncer en presencia de E1 del VPH16, para poder proponer a E1 del VPH16 como una proteína implicada en el proceso de transformación en cánceres VPH positivos.

Este trabajo suma nuevas evidencias del posible papel de E1 del VPH16 en procesos asociados a carcinogénesis y surge el interés de profundizar el estudio de la proteína E1, sus mecanismos de acción en la regulación de genes celulares y su papel en la carcinogénesis.

9. Conclusiones

1. E1 del VPH16 induce un aumento en los niveles globales de acetilación en residuos de la histona H3.
2. E1 del VPH16 induce aumento en marcas de acetilación (H3K9ac y H3K18ac) asociadas a activación transcripcional.
3. E1 del VPH16 provoca un aumento en los niveles de la enzima escritora GCN5 y una disminución de la enzima borradora HDAC3 que podrían ser responsable del aumento en los niveles de acetilación en los residuos de la histona H3.
4. Existe una correlación entre el aumento de la marca H3K9ac en los promotores de genes asociados a procesos de carcinogénesis y la sobre expresión de estos mismos en presencia de E1 del VPH16.

10. Perspectivas

1. Evaluar el efecto global en marcas de histonas des-reguladas por E1 del VPH16. Una manera sería purificar a H3 y mandar a espectrometría de masas para determinar todas las modificaciones post traduccionales reguladas por E1.
2. Determinar el efecto de E1 del VPH de bajo riesgo sobre modificaciones postraduccionales de histonas.
3. Realizar un interactoma de la proteína E1 del VPH16 con el objetivo de poder conocer las interacciones con otras proteínas modificadoras de la cromatina.
4. Determinar la capacidad de la proteína E1 de unirse al genoma celular, por ello sería importante describir si esta interacción existe mediante análisis de CHIP-seq.
5. Validar el aumento de la H3K9ac en alguno de los genes desregulados por E1 del VPH16 por CHIP-qPCR.

11. Bibliografía:

- Abdelghani, M., Kimura, H., & Tora, L. (2012). H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. *BMC genomics*, 13, 424.
- Baedyananda, F., Chaiwongkot, A., & Bhattarakosol, P. (2017). Elevated HPV16 E1 Expression Is Associated with Cervical Cancer Progression. *Intervirology*, 60(5), 171–180.
- Berger, L., Kolben, T., Meister, S., Kolben, T. M., Schmoeckel, E., Mayr, D., Mahner, S., Jeschke, U., Ditsch, N., & Beyer, S. (2020). Expression of H3K4me3 and H3K9ac in breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 146(8), 2017–2027.
- Bergvall M., Melendy T., Archambault J. (2013). The E1 Protein. *Virology*. 445: 35–56.
- Brady, C. S., Duggan-Keen, M. F., Davidson, J. A., Varley, J. M., & Stern, P. L. (1999). Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters. *The Journal of general virology*, 80 (Pt 12), 3233–3240.
- Castillo A., Wang L., Koriyama C., Eizuru Y., Jordan K., Akiba S. (2014). A systems biology analysis of the changes in gene expression via silencing of HPV-18 E1 expression in HeLa cells. *Open Biol.* 4: 1-9.
- Castillo, J., López-Rodas, G., & Franco, L. (2017). Histone Post-Translational Modifications and Nucleosome Organisation in Transcriptional Regulation: Some Open Questions. *Protein Reviews*, 65–92.
- Castro-Muñoz, L. J., Manzo-Merino, J., Muñoz-Bello, J. O., Olmedo-Nieva, L., Cedro-Tanda, A., Alfaro-Ruiz, L. A., Hidalgo-Miranda, A., Madrid-Marina, V., & Lizano, M. (2019). The Human Papillomavirus (HPV) E1 protein regulates the expression of cellular genes involved in immune response. *Scientific reports*, 9(1), 13620.

- Cedar H, Felsenfeld G. Transcription of chromatin in vitro. *J Mol Biol.* 1973 Jun 25;77(2):237-54.
- Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jul 1;89(13):5799-803.
- Clower RV, Fisk JC, Melendy T. 2006 Papillomavirus E1 protein binds to and stimulates human topoisomerase I. *J. Virol.* 80, 1584–1587.
- Côté-Martin A. et al., (2008) Human papillomavirus E1 helicase interacts with the WD repeat protein p80 to promote maintenance of the viral genome in keratinocytes *J Virol.* Feb; 82(3):1271-83.
- Crosbie, E. J., Einstein, M. H., Franceschi, S., & Kitchener, H. C. (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet (London, England)*, 382(9895), 889–899.
- Daeyoung Lee. et al., (1999) Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature*, Vol. 399, 487-491
- Dipon Das, et al., (2019) Werner Helicase Control of Human Papillomavirus 16 E1-E2 DNA Replication Is Regulated by SIRT1 Deacetylation. *MBio.* 19;10(2).
- Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology.* 2013 Oct;445(1-2):80-98.
- Eckhardt, M., Zhang, W., Gross, A. M., Von Dollen, J., Johnson, J. R., Franks-Skiba, K. E., Swaney, D. L., Johnson, T. L., Jang, G. M., Shah, P. S., Brand, T. M., Archambault, J., Kreisberg, J. F., Grandis, J. R., Ideker, T., & Krogan, N. J. (2018). Multiple Routes to Oncogenesis Are Promoted by the Human Papillomavirus-Host Protein Network. *Cancer discovery*, 8(11), 1474–1489.
- Even-Faitelson L, et al., (2016). Coming to terms with chromatin structure. *Chromosoma.* Mar;125(1):95-110
- Ferrari, R., Su, T., Li, B., Bonora, G., Oberai, A., Chan, Y., Sasidharan, R., Berk, A. J., Pellegrini, M., & Kurdiani, S. K. (2012). Reorganization of the host epigenome by a viral oncogene. *Genome research*, 22(7), 1212–1221.

- Fyodorov, D. V., Zhou, B. R., Skoultchi, A. I., & Bai, Y. (2018). Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(3), 192–206.
- Gates, L. A., Shi, J., Rohira, A. D., Feng, Q., Zhu, B., Bedford, M. T., Sagum, C. A., Jung, S. Y., Qin, J., Tsai, M. J., Tsai, S. Y., Li, W., Foulds, C. E., & O'Malley, B. W. (2017). Acetylation on histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation. *The Journal of biological chemistry*, 292(35), 14456–14472.
- Gillette, T. G., & Hill, J. A. (2015). Readers, writers, and erasers: chromatin as the whiteboard of heart disease. *Circulation research*, 116(7), 1245–1253.
- Goon P, Sonnex C, Jani P, Stanley M, Sudhoff H. Recurrent respiratory papillomatosis: an overview of current thinking and treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2008 Feb;265(2):147-51.
- Grant, P. A., Eberharter, A., John, S., Cook, R. G., Turner, B. M., & Workman, J. L. (1999). Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *The Journal of biological chemistry*, 274(9), 5895–5900.
- Hałasa, M., Wawruszak, A., Przybyszewska, A., Jaruga, A., Guz, M., Kałafut, J., Stepulak, A., & Cybulski, M. (2019). H3K18Ac as a Marker of Cancer Progression and Potential Target of Anti-Cancer Therapy. *Cells*, 8(5), 485.
- Hałasa, M., Wawruszak, A., Przybyszewska, A., Jaruga, A., Guz, M., Kałafut, J., Stepulak, A., & Cybulski, M. (2019). H3K18Ac as a Marker of Cancer Progression and Potential Target of Anti-Cancer Therapy. *Cells*, 8(5), 485.
- Huang B, Li G, Jiang XH. Fate determination in mesenchymal stem cells: a perspective from histone-modifying enzymes. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Mar 19;6(1):35.
- Ji, H., Zhou, Y., Zhuang, X., Zhu, Y., Wu, Z., Lu, Y., Li, S., Zeng, Y., Lu, Q. R., Huo, Y., Shi, Y., & Bu, H. (2019). HDAC3 Deficiency Promotes Liver Cancer through a Defect in H3K9ac/H3K9me3 Transition. *Cancer research*, 79(14), 3676–3688.
- Jin Q1, Yu LR, Wang L, Zhang Z, Kasper LH, Lee JE, Wang C, Brindle PK, Dent SY, Ge K. Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and

- CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *EMBO J.* 2011 Jan 19;30(2):249-62
- Jin, Q., Yu, L. R., Wang, L., Zhang, Z., Kasper, L. H., Lee, J. E., Wang, C., Brindle, P. K., Dent, S. Y., & Ge, K. (2011). Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *The EMBO journal*, 30(2), 249–262.
 - Kim, S., & Kaang, B. K. (2017). Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory. *Experimental & molecular medicine*, 49(1), e281.
 - Kratz A, Arner E, Saito R, Kubosaki A, Kawai J, Suzuki H, Carninci P, Arakawa T, Tomita M, Hayashizaki Y, Daub CO. Core promoter structure and genomic context reflect histone 3 lysine 9 acetylation patterns. *BMC Genomics*. 2010 Apr 21;11:257.
 - Kwangbeom Hyun, (2017) Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp Mol Med.*;49(4):e324
 - Loo Y-M, Melendy T. 2004 Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J. Virol.* 78, 1605–1615.
 - López-Saavedra y Lizano-Soberón, Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina., *Cancerología* 1 (2006): 31-55
 - Mariño-Ramírez L, Kann MG, Shoemaker BA, Landsman D. Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics*. 2005 Oct;2(5):719-29.
 - Michael Favre. et. al., 1977. Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J Virol* ;21(3):1205-9.
 - Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):518-27. doi: 10.1056/NEJMoa021641. PMID: 12571259.
 - Park P, Copeland W, Yang L, Wang T, Botchan MR, Mohr IJ. 1994 The cellular DNA polymerase Alpha primase is required for papillomavirus DNA

replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 8700–8704.

- Porter, S. S., Liddle, J. C., Browne, K., Pastrana, D. V., Garcia, B. A., Buck, C. B., Weitzman, M. D., & McBride, A. A. (2021). Histone Modifications in Papillomavirus Virion Minichromosomes. *mBio*, 12(1), e03274-20.
- Rettig EM, D'Souza G. Epidemiology of head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015 Jul;24(3):379-96.
- Ribeiro, A. L., Caodaglio, A. S., & Sichero, L. (2018). Regulation of HPV transcription. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 73(suppl 1), e486s.
- Santos-López G, Márquez-Domínguez L, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V. Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2015;53 Supl 2:S166-71.
- Schiller, J. T., Day, P. M., & Kines, R. C. (2010). Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic oncology*, 118 (1 Suppl), S12–S17.
- Scott Swindle y Jeffrey Engler, 1998 Association of the Human Papillomavirus Type 11 E1 Protein with Histone H1. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 0022-538X
- Seedorf K, Oltersdorf T, Krammer G, Rowekamp W. (1987) Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16 (HPV 16) and type 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells. *EMBO J*. 6, 139–144.
- Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(4), a018713.
- Soto D, Song C, McLaughlin-Drubin ME. Epigenetic Alterations in Human Papillomavirus-Associated Cancers. *Viruses*. 2017;9((9)):E248.
- Stanley, (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 20;30 Suppl 5:F55-70.
- Tamaki Suganuma et al., (2008)., Crosstalk among histone modifications. *Minireview Cell*, 135, 604-607.
- Taylor, G. C., Eskeland, R., Hekimoglu-Balkan, B., Pradeepa, M. M., & Bickmore, W. A. (2013). H4K16 acetylation marks active genes and

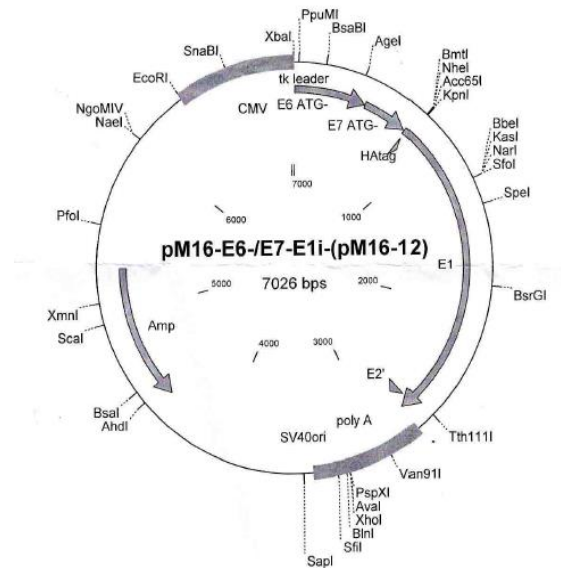
enhancers of embryonic stem cells, but does not alter chromatin compaction. *Genome research*, 23(12), 2053–2065.

- To, K. K., Polgar, O., Huff, L. M., Morisaki, K., & Bates, S. E. (2008). Histone modifications at the ABCG2 promoter following treatment with histone deacetylase inhibitor mirror those in multidrug-resistant cells. *Molecular cancer research : MCR*, 6(1), 151–164.
- Tong L, Liang H, Zhuang H, Liu C, Zhang Z. The Relationship between HDAC3 and Malignant Tumors: A Mini Review. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2020;30(3):279-284.
- Večeřa, J., Bártová, E., Krejčí, J., Legartová, S., Komůrková, D., Rudá-Kučerová, J., Kozubek, S. (2017). HDAC1 and HDAC3 underlie dynamic H3K9 acetylation during embryonic neurogenesis and in schizophrenia-like animals. *Journal of Cellular Physiology*, 233(1), 530–548.
- Verdone, L., Caserta, M., & Di Mauro, E. (2005). Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 83(3), 344–353.
- Walboomers, J.M.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., et al. (1999) Human Papillomavirus Is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. *The Journal of Pathology*, 189, 12-19.
- Wooldridge, T. R., & Laimins, L. A. (2008). Regulation of human papillomavirus type 31 gene expression during the differentiation-dependent life cycle through histone modifications and transcription factor binding. *Virology*, 374(2), 371–380.
- Zhang, A. L., Chen, L., Ma, L., Ding, X. J., Tang, S. F., Zhang, A. H., & Li, J. (2020). Role of H3K18ac-regulated nucleotide excision repair-related genes in arsenic-induced DNA damage and repair of HaCaT cells. *Human & experimental toxicology*, 39(9), 1168–1177.
- Zhang, P. Y., Li, G., Deng, Z. J., Liu, L. Y., Chen, L., Tang, J. Z., Wang, Y. Q., Cao, S. T., Fang, Y. X., Wen, F., Xu, Y., Chen, X., Shi, K. Q., Li, W. F., Xie, C., & Tang, K. F. (2016). Dicer interacts with SIRT7 and regulates H3K18

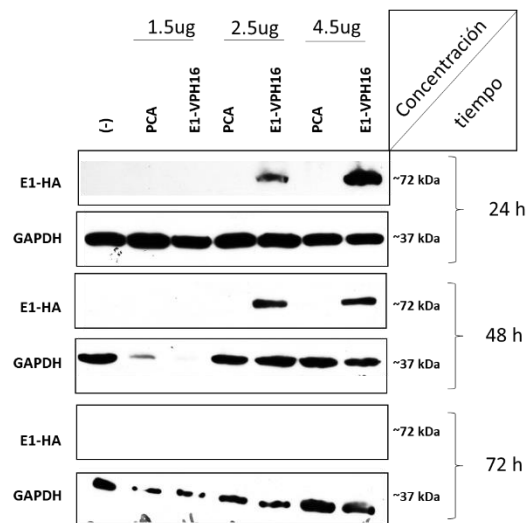
deacetylation in response to DNA damaging agents. *Nucleic acids research*, 44(8), 3629–3642.

- Zhou, J., Wang, X., He, K., Charron, J. B., Elling, A. A., & Deng, X. W. (2010). Genome-wide profiling of histone H3 lysine 9 acetylation and dimethylation in *Arabidopsis* reveals correlation between multiple histone marks and gene expression. *Plant molecular biology*, 72(6), 585–595
- Zhu, L., Jiang, X., Fu, X., Qi, Y., & Zhu, G. (2018). The Involvement of Histone H3 Acetylation in Bovine Herpesvirus 1 Replication in MDBK Cells. *Viruses*, 10(10), 525.
- Zur Hausen H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account. *Virology*384:260–265. [j.virol.2008.11.046](https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.046).

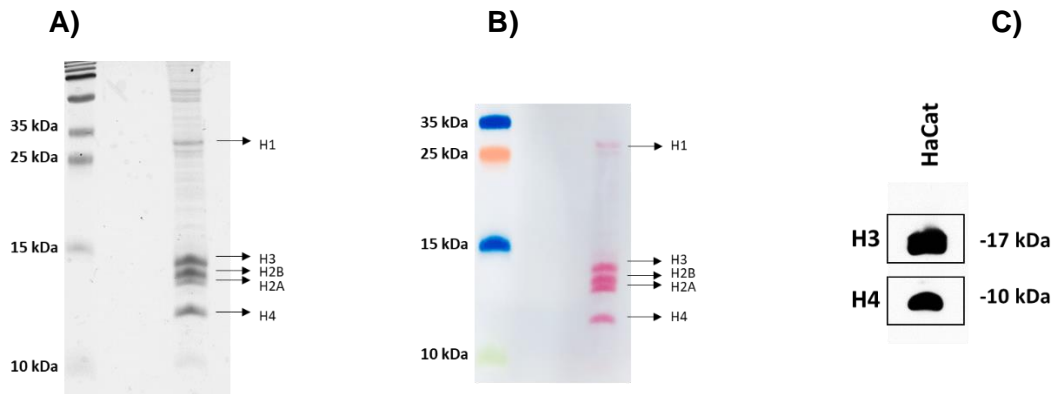
ANEXOS



Anexo 1. Mapa del vector de expresión de E1 del VPH 16



Anexo 2. Ensayo curva dosis-tiempo para evaluar en que condiciones se expresa mejor el plásmido. A las 24 horas se observa una mayor eficiencia en la expresión del plásmido por lo que emplearemos dichas condiciones para experimentos subsiguientes.



Anexo 3. Extractos de histonas de células HaCat. (A) Gel de integridad teñido con azul de comassie donde se visualizan el core de histonas H2a, H2b, H3, H4 y H1. (C) control de transferencia. Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de ponceau (B) Western Blot de los extractos de histonas de las células HaCat donde se analizó H3 y H4. El peso molecular en kilodaltons se muestran a la derecha de cada figura.