



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO MOTIVO DE ARN MENSAJERO QUE
REGULA LA TRADUCCIÓN DE LA ONCOPROTEÍNA E6 DE LOS VIRUS DE
PAPILOMA HUMANO DEL GÉNERO ALFA 7**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M. EN C. GARCÍA HERNÁNDEZ ERIKA ALEJANDRA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GRECO HERNÁNDEZ RAMÍREZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MAYEL CHIRINOS ESPIN

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2022



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO MOTIVO DE ARN MENSAJERO QUE
REGULA LA TRADUCCIÓN DE LA ONCOPROTEÍNA E6 DE LOS VIRUS DE
PAPILOMA HUMANO DEL GÉNERO ALFA 7**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M. EN C. GARCÍA HERNÁNDEZ ERIKA ALEJANDRA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GRECO HERNÁNDEZ RAMÍREZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MAYEL CHIRINOS ESPIN

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/526/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **28 de marzo de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **GARCÍA HERNÁNDEZ ERIKA ALEJANDRA** con número de cuenta **406078966** con la tesis titulada **“CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO MOTIVO DE ARN MENSAJERO QUE REGULA LA TRADUCCIÓN DE LA ONCOPROTEÍNA E6 DE LOS VIRUS DE PAPILOMA HUMANO DEL GÉNERO ALFA 7”**, realizada bajo la dirección del **DR. GRECO HERNÁNDEZ RAMÍREZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
Vocal: DR. DAVID FRANCISCO CANTÚ DE LEÓN
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Vocal: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Secretario: DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 30 de mayo de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado. CVU: 479899. No de Apoyo: 43600

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por financiar este proyecto con el donativo #168154 otorgado al Dr. Greco Hernández Ramírez

Al Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) por financiar este proyecto a nombre del Dr. Greco Hernández Ramírez

A mi tutor el Dr. Greco Hernández Ramírez, por todos sus consejos y sus valiosas enseñanzas.

A mi comité tutorial conformado por:

- Dra. Mayel Chirinos Espin
- Dr. Antonio Peña Díaz

por su valiosa asesoría y apoyo durante todo el doctorado

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Al Jurado integrado por:

- Dr. Alejandro Manuel García Carranca
- Dr. David Francisco Cantú de León
- Dra. Marcela Lizano Soberón
- Dra. Leticia Rocha Zavaleta
- Dr. Antonio Peña Díaz

por sus valiosos comentarios a este trabajo

DEDICARORIA

A toda la Familia García, en especial a “los Felipes”

Pero he aquí que llega Satanás, el eterno rebelde, el primer librepensador y el emancipador de los mundos. Avergüenza al hombre de su ignorancia y de su obediencia animales; lo emancipa e imprime sobre su frente el sello de la libertad y de la humanidad, impulsándolo a desobedecer y a comer del fruto de la ciencia.

M. Bakunin

ÍNDICE

Índice de tablas

Índice de figuras

Abreviaturas

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. Virus del papiloma humano (VPHs)	3
1.1 Características de los VPHs.....	4
1.2 Ciclo viral de los VPHs	6
1.3 VPH y cáncer.....	8
2. Traducción	10
2.1 Iniciación	12
2.2 Elongación.....	15
2.3 Terminación y reciclaje.....	15
2.4 Regulación de la traducción	15
2.5 Factores de traducción implicados en cáncer	16
JUSTIFICACIÓN	18
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	19
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
METODOLOGÍA.....	20
1. Obtención de las muestras	20
2. Extracción de DNA y RNA.....	20
3. Caracterización de la longitud de los 5´-UTR.....	21
4. Construcción de los mRNA E6-FLuc.....	27

5. Construcción de los mRNA E6-V5	34
6. Cultivo celular	35
7. Traducción <i>in vitro</i>	35
8. Extracción de proteínas y Western blot.....	39
9. Producción de proteína recombinante 4E-BP.....	40
RESULTADOS	43
1. Los mRNAs que codifican para oncoproteína E6 de los VPH de alto riesgo de la especie alfa 7 presentan regiones 5'-UTR extremadamente cortas	43
2. La síntesis de E6 de VPH-18 es llevada a cabo por mRNAs con un 5'-UTR extremadamente cortos o sin 5'-UTR.....	44
3. Los VPH de alto riesgo de la especie alfa 7 presentan una secuencia reguladora alrededor del codón de inicio.....	50
4. La expresión de E6 depende de los factores de traducción eIF4E y eIF4A1.....	56
DISCUSIÓN	60
1. El mRNA de E6 de los VPH presenta 5'-UTR extremadamente cortos y un nuevo motivo.	60
2. La traducción del mRNA de E6 de VPH-18 con un motivo TILM depende en gran medida de eIF4E y eIF4A1	61
3. La síntesis de E6 establece nuevos circuitos oncogénicos de retroalimentación con la maquinaria traduccional.....	63
CONCLUSIONES	66
PERSPECTIVAS	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXO. (ARTÍCULO CIENTÍFICO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO).....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas virales y sus principales funciones	6
Tabla 2. Factores de iniciación (eIFs) y su función	12
Tabla 3 Factores de traducción implicados en cáncer	16
Tabla 4. Programa de amplificación de los 5'-UTRs	23
Tabla 5. Programa de amplificación de las PCR de colonia	25
Tabla 6. Programa de secuenciación	26
Tabla 7. Programa de amplificación de todas las construcciones	28
Tabla 8. Lista de primers de todas las construcciones	30
Tabla 9. Caracterización del 5'-UTR de E6 en biopsias de tumores.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa filogenético de los principales géneros de los VPHs.....	4
Figura 2. Organización del genoma de los VPH.....	5
Figura 3. Ciclo viral de los VPH.....	8
Figura 4. Mecanismos de acción de las oncoproteínas E6 y E7.....	10
Figura 5. Esquema de la estructura del mRNA y del ribosoma 80S.....	11
Figura 6. Esquema del inicio de la traducción.....	14
Figura 7. Mapa del vector pTZ57/T delkit <i>InsTAclone</i> TM <i>PCR Cloning</i>	24
Figura 8. Mapa del plásmido reportero pLuc-cassette.....	28
Figura 9. Mapa del vector pTZ57R/T/-poli(A) ₇₁	35
Figura 10. Mapa del vector pGEX 6P2.....	41
Figura 11. Los mRNAs del VPH-18 sin un 5'-UTR o con 5'-UTRs extremadamente cortos promueven la traducción de E6.....	47
Figura 12. Actividad de FLuc en diferentes sistemas de traducción.....	48
Figura 13. Los mRNAs de E6-V5 de VPH-18 se traducen eficazmente en lisados de germen de trigo.....	50
Figura 14. Mutaciones alrededor del codón de inicio AUG afectan la traducción del mRNA de E6 de VPH-18.....	52
Figura 15. El ORF de E6 de los VPH de alto riesgo del género alfa, especie 7 comparten el motivo TILM que promueve la traducción	53
Figura 16. El motivo TILM promueve la traducción de ORF de FLuc.....	55
Figura 17. Los 5'-UTR de los mRNA de E6 de VPH18 promueven la traducción dependiente de <i>cap</i> y de poli(A).....	57

Figura 18. Los 5'-UTR de los mRNA de E6 de VPH18 promueven la traducción dependiente de *cap*, eIF4E y eIF4A59

Figura 19. Ciclos de retroalimentación oncogénica positiva que involucran a E6 y a eIF4E.....65

ABREVIATURAS

3'UTR	Región 3' no traducida del mRNA
5'UTR	Región 5' no traducida del mRNA
ATP	Adenosín trifosfato
AUG	Codón de inicio
Rb	Retinoblastoma
CB	<i>Buffer</i> concentrador
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
<i>Cap</i>	7-metil guanosina
CC	Cáncer cervicouterino
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
DNA	Ácido desoxoribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleótidostrifosfato
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eIFs	Factores de iniciación de la traducción eucarióticos
FLuc	Cistrón de luciferasa de luciérnaga
GTP	Guanosíntrifosfato
HB	<i>Buffer</i> hipotónico
HNG	<i>Buffer</i> isotónico
HR	Alto riesgo
KD	<i>Knocked-down</i>
LCR	Región larga de control

LR	Bajo riesgo
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
ORF	Marco de lectura abierto
PBS	<i>Buffer</i> de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTC	Centro de peptidiltransferasa
RACE	Rápida amplificación de los extremos de los cDNAs
RNA	Ácido ribonucleico
RRL	Rabbitreticulocytelysates
SFB	Suero fetal bovino
TILM	<i>Translation Initiation of Leaderless mRNAs</i>
TISU	<i>Translation initiation of short 5'-UTR</i>
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
VPL	Partícula pseudo vírica
VPH	Virus del papiloma humano
4EBP	Proteína de unión a eIF4E

RESUMEN

El cáncer del cuello uterino es la cuarta causa más común de cáncer en las mujeres en todo el mundo, tanto en incidencia como mortalidad. Las infecciones persistentes con los virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo (los tipos virales, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) constituyen un factor necesario para el desarrollo de cáncer cervicouterino. Las oncoproteínas virales E6 y E7, juegan un papel central en el proceso carcinogénico al interactuar con proteínas celulares como p53 y retinoblastoma (Rb). Para la síntesis de E6 y E7, el VPH tipo 18 utiliza un RNA mensajero (mRNA) bicistrónico con extremos 5' no traducidos (5'-UTR, por sus siglas en inglés *5' untranslated region*) extremadamente cortos; este fenómeno solo se ha observado en líneas celulares. Dado que no se conocía el mecanismo de expresión génica de E6 a nivel traduccional, en este trabajo encontramos que en los tumores de cuello uterino, los VPH-18, -39 y -45, transcriben el mRNA de E6/E7 con 5'- UTR extremadamente cortas o incluso sin un 5'-UTR (es decir, de cero a tres nucleótidos de largo) para expresar E6. Encontramos que la traducción de E6 de HPV-18 está regulada por el motivo ACCaugGCGCG(C/A)UUU, que rodea el codón de inicio AUG, al cual denominamos iniciación de traducción de ARNm sin líder (TILM, por sus siglas en inglés *Translation Initiation of Leaderless mRNAs*). Este motivo se conserva en todos los VPH del género alfa, especie 7 que infectan el epitelio de las mucosas. Además, mostramos que la traducción de E6 de HPV-18 depende de la estructura del *cap* del mRNA, del factor de traducción eIF4E, que reconode al *cap* de los mensajeros; y de la helicasa eIF4AI, dos factores clave de iniciación de la traducción que vinculan la traducción y el cáncer. Nuestros resultados respaldan la idea de que E6 es el centro de un bucle de retroalimentación oncogénica positiva que involucra a eIF4E, la cascada de mTOR, y p53. El ciclo de retroalimentación oncogénica positiva que genera la oncoproteína E6, nos puede ayudar a proponer nuevos blancos terapéuticos que ayuden a evitar la traducción descontrolada de E6. Por último, dado que nosotros encontramos que al mutar el motivo TILM se disminuye la traducción de E6, se podría buscar moléculas terapéuticas dirigidas a este motivo.

ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth most common cause of cancer in women worldwide in terms of both incidence and mortality. Persistent infection with high-risk types of human papillomavirus (HPV), namely 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68, constitute a necessary cause for the development of cervical cancer. Viral oncoproteins E6 and E7 play central roles in the carcinogenic process by virtue of their interactions with cell master proteins such as p53, retinoblastoma (Rb), mammalian target of rapamycin (mTOR), and c-MYC. For the synthesis of E6 and E7, HPVs use a bicistronic messenger RNA (mRNA) that has been studied in cultured cells. Here, we report that in cervical tumors, HPV-18, -39, and -45 transcribe E6/E7 mRNAs with extremely short 5' untranslated regions (UTRs) or even lacking a 5' UTR (i.e., zero to three nucleotides long) to express E6. We show that the translation of HPV-18 E6 cistron is regulated by the motif ACCaugGCGCG(C/A)UUU surrounding the AUG start codon, which we term Translation Initiation of Leaderless mRNAs (TILM). This motif is conserved in all HPV types of the phylogenetically coherent group forming genus alpha, species 7, which infect mucosal epithelia. We further show that the translation of HPV-18 E6 largely relies on the *cap* structure and eIF4E and eIF4AI, two key translation initiation factors linking translation and cancer but does not involve scanning. Our results support the notion that E6 forms the center of the positive oncogenic feedback loop node involving eIF4E, the mTOR cascade, and p53. The positive oncogenic feedback loop generated by the E6 oncoprotein may help us to propose new therapeutic targets to help prevent uncontrolled translation of E6. Finally, since we found that mutating the TILM motif decreases E6 translation, we could search for therapeutic molecules targeting this motif.

INTRODUCCIÓN

1. Virus del papiloma humano (VPHs)

Los VPHs son los agentes infecciosos más frecuentemente transmitidos por contacto sexual en todo el mundo (Schiffman *et al.*, 2003). De hecho, las infecciones persistentes con los VPHs, son el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cervicouterino (CC). Este tumor es la cuarta causa de cáncer en mujeres en todo el mundo, tanto en incidencia como en mortalidad. En el 2018 se diagnosticaron aproximadamente 570,000 de CC y se reportaron 311,000 muertes a causa de esta enfermedad (Chirenje *et al.*, 2020; Bray *et al.*, 2018). El CC es mucho más frecuente en países de bajos ingresos, debido a que no cuentan con suficientes programas de detección, y tampoco con recursos suficientes para el tratamiento e implementación de campañas de vacunación (Forman *et al.*, 2012). En México, en el 2020 se registraron 9,439 nuevos casos de CC, que representan el 4.8% de todos los cánceres. En mujeres el CC ocupa el segundo lugar de incidencia (Organización mundial de la salud, 2020).

Se han caracterizado alrededor de 221 tipos de VPH, y con base en la secuencia de la proteína L1, se pueden clasificar en cinco principales géneros filogenéticamente relacionados: alfa (α), beta (β), gamma (γ), Mu (μ) y Nu (ν) (Figura 1). Los géneros presentan un 60% de identidad y se representan con una letra del alfabeto griego. Dentro del género, cuando la identidad es del 60-70% se denominan especies, y cuando la identidad es del 71-89% dentro de una especie, se consideran tipo (Bernard *et al.*, 2010 y de Villeres *et al.*, 2004).

Los VPH también se pueden clasificar en cutáneos (infectan la piel y tienen la capacidad de desarrollar verrugas comunes) y mucosos (infectan mucosas). Los VPHs mucosos están agrupados dentro del género alfa, y se dividen en virus de bajo riesgo (LR, por sus siglas en inglés *Low Risk*), causantes de condilomas y/o verrugas genitales, y virus de alto riesgo (HR por sus siglas en inglés *High Risk*), que tienen la capacidad de generar CC y otros tipos de cáncer como de ano, vulva, vagina, pene y orofaríngeos (Schiffman *et al.*, 2007). Los principales tipos virales encontrados en biopsias de tumor son los tipos 16 y 18; se estima que aproximadamente estos dos tipos virales causan el

70% de todos los casos reportados (Chirenje *et al.*, 2020). En México los primeros 3 lugares de prevelancia los ocupan los tipos virales 16 con un 21.9 %, el 18 con un 9.9 % y el 31 con un 4.0% (Luna-Aguirre *et al.*, 2018)

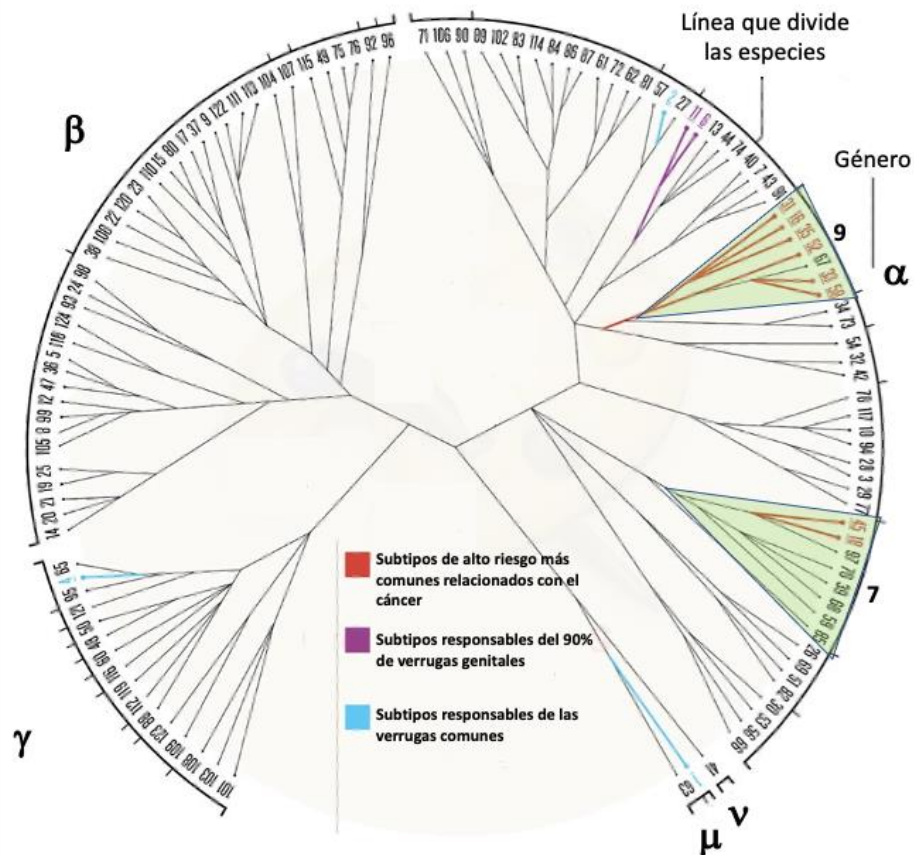


Figura 1. Mapa filogenético de los principales géneros de los VPHs. Se muestran los principales géneros de los VPH (alfa, beta, gamma, mu y nu). Los números representan los tipos de VPH, y las líneas que separan estos números son las especies. Se señalan en verdes las especies 7 y 9 de los alfa VPH, en estas especies se encuentran los VPH-HR. Modificado de Crow, 2012

1.1 Características de los VPHs

Los VPHs pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, son de DNA de doble cadena, pequeños y encapsulados de 55 nm de diámetro, tienen una forma icosaédrica y están compuestos por 72 capsómeros. Su genoma mide aproximadamente 8000 pb y se divide en tres regiones: la región temprana (E, por sus siglas en inglés *Early*), la región tardía

(L, por sus siglas en inglés *Late*) y la Región Larga de Control (LCR, por sus siglas en inglés *Long Control Region*) (Figura 2) (Zheng *et al.*, 2016).

La región temprana ocupa aproximadamente el 50% del genoma y codifica para seis proteínas: E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Estas proteínas están encargadas de la regulación transcripcional, la replicación del DNA viral, y la transformación e inmortalización celular (Tabla 1). La región tardía ocupa el 40% del genoma y codifica para las proteínas de la cápside: L1 y L2. La región larga de control ocupa el 10% restante del genoma viral, esta región no codifica para ninguna proteína; pero contiene el origen de replicación y múltiples sitios de unión a diversos factores que son importantes para la regulación ya que activan o reprimen la transcripción (Zheng *et al.*, 2016).

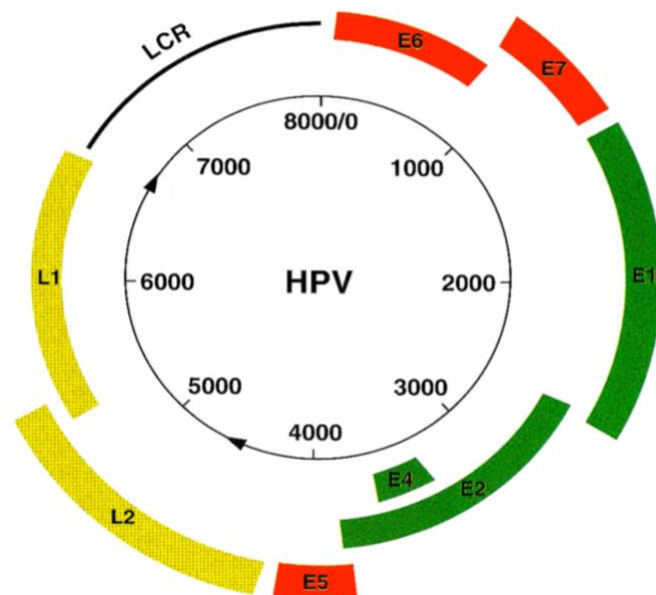


Figura 2. Organización del genoma de los VPH. Representación esquemática de la organización de los genes tempranos (E6, E7, E1, E2, E4 y E5), tardía (L1 y L2) y la Región Larga de Control (LCR).

Tabla 1. Proteínas virales y sus principales funciones

Proteína viral	Función
E1	Proteína de unión al origen, helicasa dependiente de ATP, involucrada en la replicación del genoma
E2	Regulador de la transcripción de genes virales, se asocia con E1
E4	Se expresa abundantemente como proteína de fusión con E1^E4, desestabilizadora de la red del citoesqueleto, liberación y transmisión del virus
E5	Proteína transmembranal, interactúa con el receptor EFG activando vías mitogénicas .
E6	Impulsa el ciclo celular que permite la amplificación del genoma en las capas epiteliales superiores, asociación con la proteína E6AP y degradación de p53, unión a la proteína PDZ, activación hTert
E7	Impulsa el ciclo celular permitiendo la amplificación del genoma en las capas epiteliales superiores, asociación y degradación de pRB,
L1	Principal proteína de la cápside, se ensambla en cápsides pentaméricas, formando el virión icosaédrico
L2	Proteína menor de la cápside, involucrada en la encapsidación del ADN viral, facilita la entrada y el tráfico viral

1. 2 Ciclo viral de los VPHs

El ciclo de vida de los VPHs está estrechamente ligado a la diferenciación del epitelio escamoso. Los VPHs infectan a células indiferenciadas del epitelio basal; posteriormente el ciclo de vida continúa en las células hijas, ya diferenciadas en las capas superiores del epitelio (Hong *et al.*, 2013).

Para la infección se requiere la presencia de una micro lesión, que permita que los viriones lleguen a las células basales. La entrada del virus a estas células requiere diversas interacciones moleculares que involucran a antígenos virales y a receptores celulares. Diversos modelos experimentales sugieren que la infección requiere de la interacción de la proteína L1, con proteoglicanos de heparán sulfato, como receptores primarios; posteriormente, diversos cambios conformacionales de la cápside que incluyen la escisión del extremo N-terminal de la proteína L2, por la proteasa celular furina, facilita la transferencia a un receptor secundario que permite la internalización del virus. Por endocitosis, el virus es transportado hacia el núcleo a través del retículo endoplasmático, y del aparato de Golgi. Posteriormente una serie de interacciones y de cambios estructurales en la vesícula permiten la decapsidación y la liberación del genoma viral cerca de la membrana nuclear. El genoma viral entra al núcleo a través de poros nucleares e inicia la replicación viral (Kombe *et al.*, 2021).

Una vez que el genoma viral llega al núcleo, los primeros genes en expresarse son E1 y E2; estos mantienen el genoma episomal en un bajo número de copias y retardan la diferenciación de las células basales, lo cual favorece la proliferación de células basales infectadas (Doorbar, 2005 y 2012). Cuando las células basales empiezan a diferenciarse se inicia la expresión de los genes E6 y E7, impulsando a las células a la fase S del ciclo celular, creando un ambiente propicio para la replicación del genoma viral, y la proliferación celular que es necesaria para la producción de viriones infectados e incrementar el número de células infectadas. Una vez que las células infectadas se encuentran en las capas superiores del epitelio, se inicia la expresión de los genes tardíos L1 y L2, que son las proteínas estructurales de la cápside, y con esto el ensamblaje de los viriones. También en la capas superiores del epitelio se expresa el gen E4, que ayuda a la liberación de los viriones a través de la descamación celular (Figura 3) (Doorbar, 2005 y 2012).

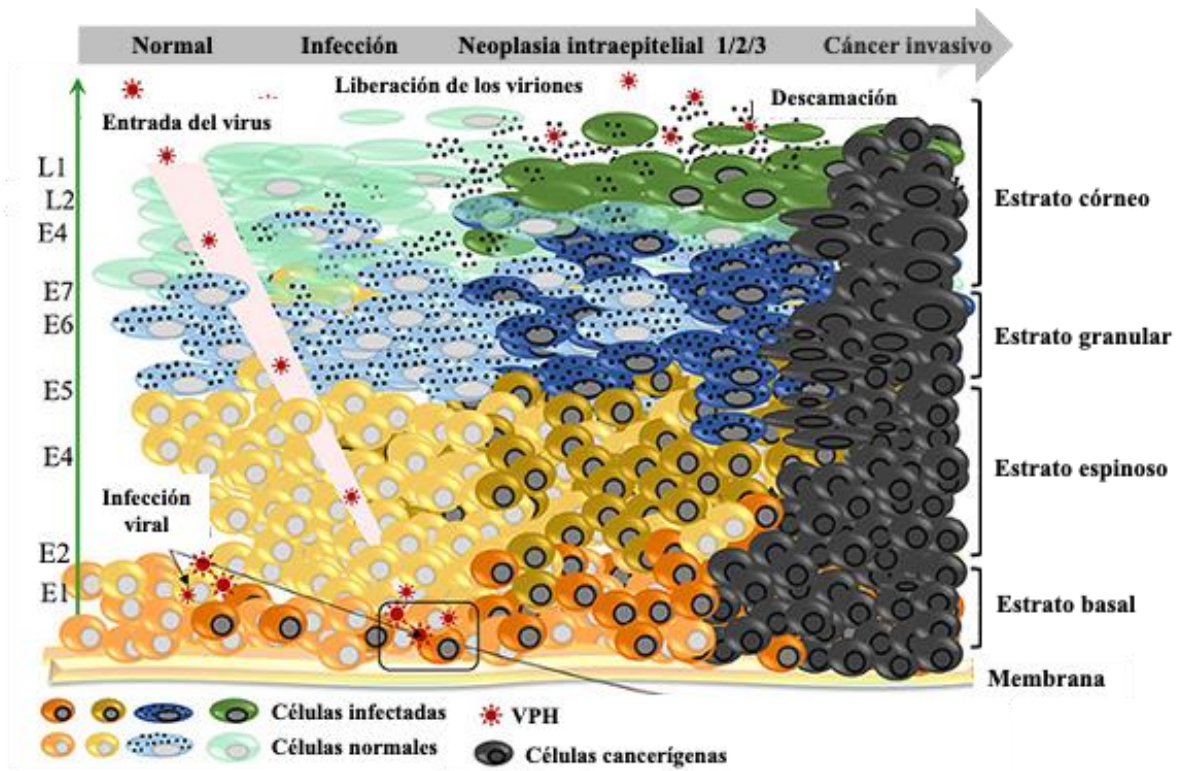


Figura 3. Ciclo viral de los VPH. Los VPH ingresan a las células del estrato basal a través de microlesiones. La *flecha verde* muestra la expresión secuencial de las proteínas virales a través del epitelio estratificado. La *flecha gris* representa la transformación celular, que va desde células normales, hasta células cancerígenas. Tomado de Kombe *et al.*, 2021.

1.3 VPH y cáncer

Las principales proteínas encargadas de la transformación celular maligna en los virus del papiloma humano de alto riesgo son E6 y E7. Estas no tienen ninguna actividad enzimática; sin embargo, son capaces de unirse a un gran número de proteínas celulares y alterar sus características (Tommasino *et al.*, 2014). Las interacciones proteicas viral/celular, mejor caracterizadas, son la de E6, con el supresor de tumores p53; y la de E7, con el supresor de tumores de la proteína del retinoblastoma (pRB).

El supresor de tumores p53 es conocido como el guardián del genoma, ante cualquier daño al DNA p53 puede detener el ciclo celular, activar enzimas de reparación del DNA, y si todo falla, inducir la apoptosis (Levine *et al.* 2009). La proteína E6 se une a p53 y a la proteína de unión a E6 (E6AP). Con la formación de este complejo p53 se ubiquitina y es llevado a degradación vía proteosoma. Por lo tanto, las células que

expresan E6 pierden a p53, y son susceptibles a la acumulación de mutaciones, y permiten que las células se transformen (Figura 4) (Duensing *et al.*, 2004).

Por su parte, pRb juega un papel importante en la regulación del ciclo celular, en la transición de la fase G1 a S, evitando que las células con algún daño repliquen su DNA. El supresor de tumores pRB se une a factores de transcripción E2F1-3, que intervienen en la expresión de muchos genes que codifican reguladores positivos del ciclo celular, como las ciclinas E y A. En células normales, la hiperfosforilación de pRB libera a los factores de transcripción E2F1-3, y promueve la progresión del ciclo celular. La proteína E7 se une a pRB, lo que conduce a una activación incontrolada de E2F1-3. También E7 puede promover la degradación de pRB vía ubiquitina-proteosoma. Cuando las células expresan E7, experimentan una proliferación descontrolada (Figura 4) (Duensing *et al.*, 2004). Se ha demostrado que las proteínas E6 y E7 desacoplan la duplicación del centrosoma en la división celular, y como resultado las células acumulan defectos mitóticos (Duensing *et al.*, 2000). También se ha observado que E6 y E7 inducen perturbaciones del huso mitótico, que tiene como consecuencia una mala segregación cromosómica y un alto grado de recombinación. La integración del genoma viral en el DNA celular es importante para la progresión de lesiones premalignas al desarrollo de cáncer (Wentzensen *et al.*, 2004).

Aunque E6 y E7 tienen una gran capacidad para la transformación celular, la mayoría de las infecciones con VPH de alto riesgo no llevan al desarrollo de cáncer. Se sabe que más del 70% de las mujeres sexualmente activas se infectan con VPH por lo menos 1 vez en su vida; sin embargo, la mayoría de las infecciones son asintomáticas, y el sistema inmune las elimina aproximadamente en 24 meses (Ostor, 1993). El desarrollo de cáncer está asociado a infecciones recurrentes. Durante estas infecciones recurrentes se facilita la acumulación de daño al DNA, que con el tiempo puede llevar al desarrollo de cáncer (Jabbar *et al.*, 2012).

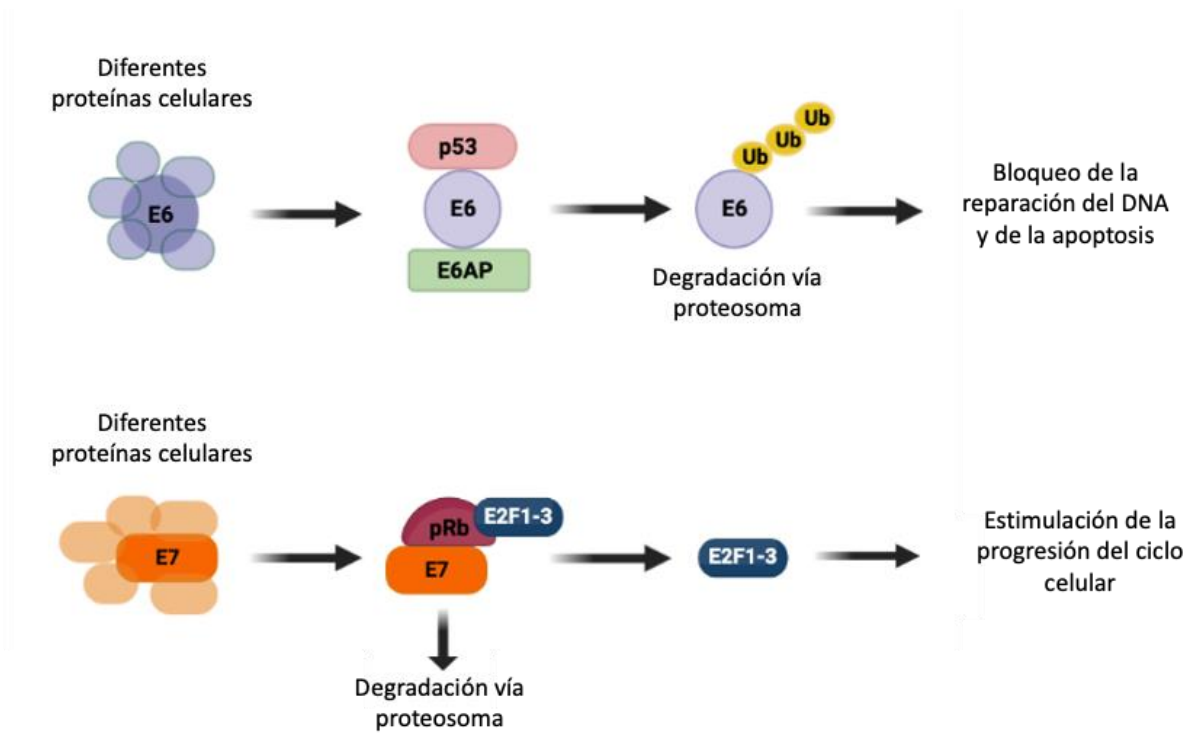


Figura 4. Mecanismos de acción de las oncoproteínas E6 y E7. Ejemplo de cómo interacciona *E6* con *diferentes proteínas celulares*, entre estas *p53*, que al formar el complejo *E6AP-E6-p53*, lleva a la degradación de *p53* vía proteosoma. Del mismo modo *E7*, al interaccionar con *pRb*, libera al factor de transcripción *E2F1-3*, estimulando la progresión del ciclo celular. *E7* también lleva a la degradación de *pRb* vía proteosoma.

2. Traducción

La traducción o síntesis de proteínas, es un proceso complejo, en el cual la información contenida en los ácidos nucleicos es traducida a aminoácidos, este proceso es fundamental para el desarrollo de la vida. El encargado de traducir el mensaje contenido en el RNA mensajero (mRNA) es el ribosoma (Figura 5).

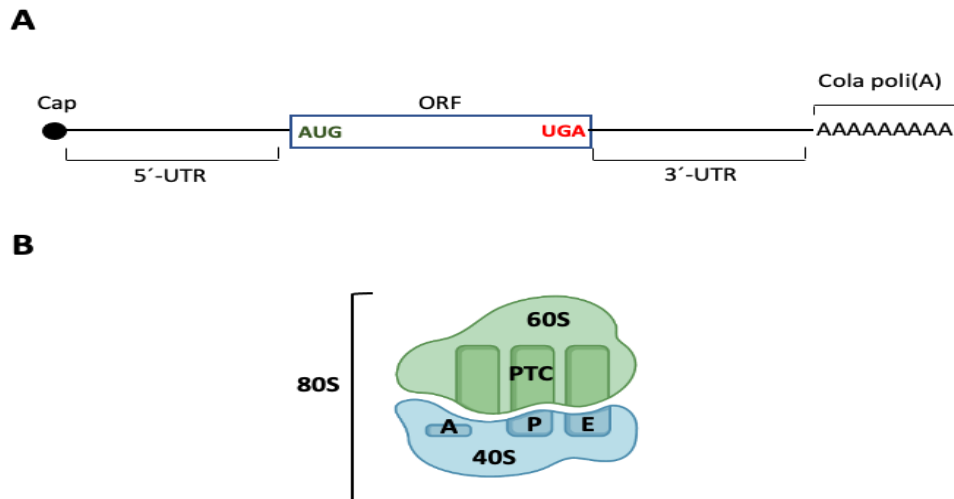


Figura 5. Esquema de la estructura del mRNA y del ribosoma 80S. **A)** Ejemplo de un mRNA mensajero típico eucariótico. Se muestra la estructura del *cap* en el extremo 5', y en el extremo 3' se muestra la *cola poli(A)*. También se muestran las regiones no traducidas (*UTR*, por sus siglas en inglés *untranslated region*) 5' y 3'. La región que será traducida se conoce como marco de lectura abierto (*ORF*, por sus siglas en inglés *Open Reading Frame*). Por último, en verde se muestra el codón de inicio *AUG*, y en rojo uno de los tres codones de término *UGA*. **B)** Esquema del complejo ribosómico *80S*, formado por las subunidades *60S* y *40S*. La subunidad *60S* contiene el centro peptidiltransferasa (*PTC*, por sus siglas en inglés *Peptidyl Transferase Center*) responsable de la formación del enlace peptídico. La subunidad *40S* contiene los 3 sitios de unión al tRNA. El sitio A contiene al tRNA aminoacilado, el sitio P une al peptidil-tRNA y el sitio E une al tRNA desacilado.

La traducción en eucariontes se puede dividir en cuatro etapas: iniciación, elongación, terminación y reciclaje. En términos generales, en la iniciación, el ribosoma se une al codón de inicio (*AUG*) en el mRNA con el tRNA iniciador (metionina-tRNA_i), unido al sitio peptidil (*P*) del ribosoma. En la elongación, los tRNA aminoacilados entran al sitio aceptor (*A*) ribosomal, para llevar a cabo la decodificación. Si es el tRNA correcto, el ribosoma cataliza la formación del enlace peptídico. Después, se lleva a cabo la translocación para dejar libre el sitio A. Este proceso se repite hasta decodificar todo el marco de lectura abierto del mRNA. La terminación tiene lugar cuando en el sitio A ribosomal entra un codón de término y el péptido se libera del ribosoma. En la última etapa, el reciclaje, las subunidades ribosomales se disocian, liberando el mRNA y se preparan para una nueva ronda de iniciación (Pelletier *et al.*, 2019).

2.1 Iniciación

La iniciación es la etapa más compleja y requiere de un gran número de factores de iniciación (eIFs, por sus siglas en inglés *eukaryotic initiation factors*). En la tabla 2 se muestra de manera resumida la función de los eIFs (Jackson *et al.*, 2010, Hinnebusch, 2014).

Tabla 2. Factores de iniciación (eIFs) y su función

Fator	Función
eIF1	Participa en el reconocimiento del codón de inicio y promueve el mecanismo de <i>scanning</i>
eIF1A	Promueve el <i>scanning</i> y se une a la subunidad ribosomal 40S en el sitio A, impidiendo la unión de un tRNA a este sitio, durante la etapa de iniciación
eIF2	Se une y recluta al tRNA iniciador a la subunidad 40S en el sitio P
eIF2B	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina, regenera al eIF2 a su forma activa
eIF3	Mantiene a las subunidades ribosomales separadas, une a la subunidad ribosomal 40S con el complejo eIF4F
eIF4A	Forma parte del complejo eIF4F. Es una helicasa dependiente de ATP, que desarrolla estructuras secundarias en el 5'-UTR del mRNA
eIF4B	Estimula la actividad helicasa de eIF4A
eIF4E	Forma parte del complejo eIF4F. Une al RNA mensajero (mRNA) por medio del <i>cap</i>
eIF4G	Factor de andamiaje que une a los factores eIF4E, eIF4A, eIF3 y a la proteína PABP
eIF5	Proteína activadora de GTPasas que estimula la actividad de eIF2
eIF5B	GTPasa que promueve la formación del complejo ribosomal 80S

eIF6	Se une a la subunidad ribosomal 60S y la unión prematura con la subunidad 40S
DHX29	Se une a la subunidad 40S y promueve el mecanismo de scanning cuando el 5'-UTR está altamente estructurado
PABP	Se une a la cola poli(A) del mRNA y al factor eIF4G, promoviendo la circularización del mRNA.

El proceso de inicio de la traducción se lleva a cabo de la siguiente manera (Jackson *et al.*, 2010, Hinnebusch, 2014):

- Reclutamiento del mRNA por el complejo eIF4F (activación del mRNA). La proteína eIF4G se une a los factores eIF4E y EIF4A, formando el complejo eIF4F. El factor eIF4E une al mRNA por medio del *cap* ubicado en el extremo 5' de los mRNA.
- Formación del complejo de preiniciación 43S. Este complejo está formado por la subunidad 40S, los factores de iniciación eIF1, eIF1A, eIF3, y el complejo ternario formado por eIF2-GTP-Met-tRNA_i^{met}. Este complejo de preiniciación se une al 5'-UTR a través de la interacción de eIF4G con eIF3.
- Circularización del mRNA. La proteína eIF4G también interacciona con la proteína PABP, que se une a la cola poli(A) en el extremo 3'. Al producirse la unión entre estas dos proteínas se lleva a cabo la circulación del mRNA.
- Formación del complejo 48S. La unión del complejo 43S con el mRNA unido al complejo eIF4F forma el complejo de preiniciación 48S.
- Mecanismo de *scanning*. El complejo de preiniciación 48S escanea el mRNA en dirección 5'– 3', hasta encontrar el código de iniciación (AUG). El reconocimiento del AUG está mediado por la secuencia que lo rodea.
- Formación del complejo 80S. Cuando el complejo 48S encuentra AUG de inicio, se hidroliza el GTP unido al eIF2, se liberan todos los factores y se une la subunidad 60S formando así el complejo 80S.

Un mecanismo alternativo de iniciación de la traducción el dependiente de IRES (IRES, por sus siglas en inglés *internal ribosome entry site*), en el que el ribosoma se une a una región interna del mRNA, cercana al sitio de inicio de la traducción (Pelletier *et al.*, 2019).

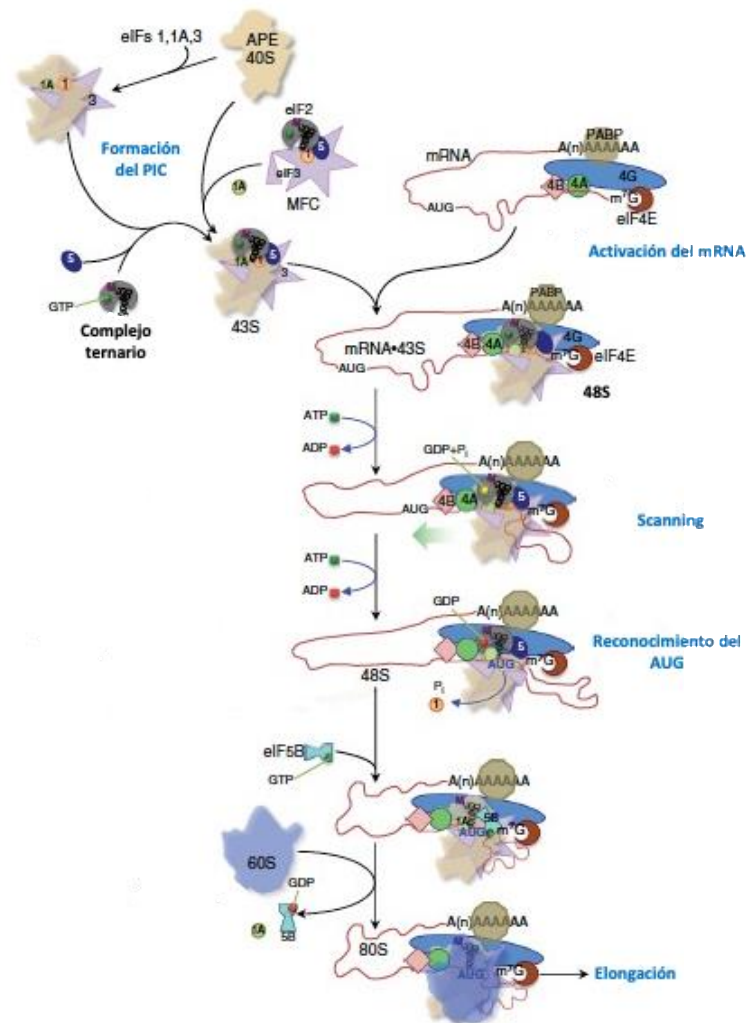


Figura 6. Esquema del inicio de la traducción. Se muestra la formación del complejo de preiniciación 43S (compuesto de la subunidad 40S, *eIF2-GTP-Met-tRNAi* y *eIF3*). Posteriormente este complejo se une al complejo *eIF4F* (compuesto por los factores *eIF4G*, *eIF4E* y *EIF4A*) unido al *cap* del mRNA, formando de esta manera el complejo 48S. El complejo 48S recorre el 5'-UTR del mRNA en dirección 5'–3' en busca del código de inicio. A este proceso se le conoce como *scanning*. Cuando el complejo 48S encuentra el codón de inicio se liberan los factores de inicio y la posterior se une la subunidad ribosomal 60S, formando el complejo 80S. Tomado de Merrick and Pavitt, 2018.

2.2 Elongación

La elongación de la cadena polipeptídica comienza una vez que el ribosoma 80S está posicionado en el codón de inicio AUG, en el mRNA con el metionina-tRNA_i unido al sitio P del ribosoma, el segundo codón del mensajero está en el sitio A del ribosoma. Un aminoacil tRNA (aa-tRNA) es llevado al sitio A del ribosoma como parte del complejo ternario (aa-tRNA-eEF1A-GTP). Una vez que se da el correcto apareamiento del codón-anticodón en el sitio A, se lleva a cabo la hidrólisis de GTP del eEF1A. Esta hidrólisis libera al tRNA del ribosoma y al eEF1A unido a GDP. De esta manera, se puede continuar con la formación del enlace peptídico en el centro peptidil transferasa (PTC, por sus siglas en inglés *peptidyl transferase center*), que se encuentra en la subunidad 60S. Posteriormente, se realiza la translocación para que el tRNA desacilado se coloque en el sitio E, y el peptidil-tRNA en el sitio P, luego el ribosoma se mueve exactamente 3 nucleótidos en dirección 5'-3' para colocar el siguiente codón en el sitio A. Esta tarea es realizada por el eEF2, que al hidrolizar GTP facilita la translocación. Este ciclo se repite hasta que se encuentra un codón de término (Dever *et al.*, 2018).

2.3 Terminación y reciclaje

La terminación ocurre cuando el codón de paro se ubica en el sitio A del ribosoma. El codón de paro es reconocido por el factor eRF1, en complejo con el eRF3 y GTP. La hidrólisis del GTP promueve la hidrólisis del péptido y su liberación del ribosoma, seguido de la liberación del péptido, el Factor ABCE1 promueve la disociación del ribosoma (Dever *et al.*, 2018).

2.4 Regulación de la traducción

La síntesis de proteínas es un proceso biológico que requiere una gran cantidad de energía celular para ser llevado a cabo. Por lo tanto, es necesario que, bajo condiciones de aumento de la demanda de energía celular, la tasa de la síntesis de proteínas se reduzca. Mediante la reducción de la síntesis de proteínas, la célula puede guardar y canalizar energía hacia otros procesos biológicos. La regulación global de la síntesis de

proteínas se encuentra principalmente en la etapa de iniciación, pues resulta más fácil para la célula detener globalmente el proceso cuando este apenas empieza (Sonenberg *et al.*, 2009).

La fosforilación es uno de los mecanismos que utilizan las células para la regulación de la traducción. Por ejemplo, la fosforilación del factor eIF2a, inhibe la traducción impidiendo la unión de Met-tRNA_i^{met} a los ribosomas. Por otra parte, la hipofosforilación de la proteína de unión a eIF4E (4EBP) secuestra a eIF4E y evita la formación del complejo eIF4F (Jackson *et al.*, 2010). Otra forma de regular la traducción es por medio de proteínas que se unen específicamente al mRNA, impidiendo su traducción. Para poder traducir dichos mRNAs es necesario secuestrar o degradar la proteína inhibidora (Jackson *et al.*, 2010).

2.5 Factores de traducción implicados en cáncer

Diversos estudios demuestran que los niveles altos de traducción no programada aceleran el crecimiento celular y conducen a cambios no programados en el ciclo celular. Por lo tanto, se han implicado un gran número de elementos de la maquinaria traduccional en el desarrollo y progresión del cáncer (Tabla 3) (Topisirovic *et al.*, 2015).

Tabla 3. Factores de traducción implicados en cancer

Factor de traducción	Tipo de cáncer	Mecanismo	Referencia
eIF4E	Vejiga Cabeza y cuello Hígado Colon Mama	Sobreexpresión	Shuda <i>et al.</i> 2000 Berkel <i>et al.</i> 2001 Robichaud <i>et al.</i> 2019
eIF4G	Pulmón	Amplificación del gen	Brass <i>et al.</i> 1997
eIF3a	Mama Cérvix Esófago Pulmón	Sobreexpresión	Lin <i>et al.</i> 2001 Pincheira <i>et al.</i> 2001
eIF3b	Mama Testicular	Sobrerregulado Niveles transcripcionales altos	Lin <i>et al.</i> 2001 Rothe <i>et al.</i> , 2000

eIF3h	Próstata Mama	Niveles transcripcionales altos	Nupponen <i>et al.</i> 1999
eIF2	Linfoma de Hodgkins Estómago Colon Recto	Sobreexpresión	Wang <i>et al.</i> 1999 Lobo <i>et al.</i> 2000
eIF4A	Hígado Piel	Niveles transcripcionales altos	Shuda <i>et al.</i> 2000 Eberle <i>et al.</i> 1997
eIF5	Ovario	Amplificación del gen	Guan <i>et al.</i> 2001

El factor de traducción eIF4E es un potente oncogen que se encuentra elevado en el 30% de los tumores malignos en humanos, incluidos mama, pulmón, vejiga, colon, próstata, ovario, cérvix, tiroides, hígado, cabeza y cuello, así como en linfomas y leucemia (Carroll *et al.*, 2013). El incremento en la expresión de eIF4E está asociado con un mal pronóstico. Diversos estudios realizados en líneas celulares y en modelos animales, han demostrado que la sobreexpresión de eIF4E conduce a la transformación oncogénica y a la formación de tumores. A nivel celular la sobreexpresión de eIF4E conduce a una mayor proliferación y supervivencia (Carroll *et al.*, 2013). Los niveles transcripcionales de eIF4E pueden estar desregulados por diferentes mecanismos: amplificación génica, desregulación transcripcional y estabilidad del mRNA. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes por lo que dependiendo del cáncer pueden estar presentes los 3 tipos de desregulación (Carroll *et al.*, 2013). También se ha observado que la fosforilación de eIF4E impulsa una serie de procesos importantes en la biología del cáncer, incluyendo la transformación celular, la proliferación, la apoptosis, la metástasis y la angiogénesis. (Yang *et al.*, 2020).

JUSTIFICACIÓN

Los virus de papiloma humano (VPHs) son los agentes infecciosos más frecuentemente transmitidos por contacto sexual en todo el mundo (Harden *et al.* 2017). De hecho la infección persistente con los VPHs de alto riesgo resultan ser el factor principal para que las mujeres desarrollen cáncer cervicouterino (Zur Hausen, 2009).

Por otra parte, las oncoproteínas E6 y E7 son transcritas desde el mismo promotor, generando mRNAs bisstronicos (Zheng *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2011). En líneas celulares se ha reportado que los genes de E6 y E7 de VPH-18 expresan al menos dos poblaciones de mRNAs que resultan de múltiples sitios de iniciación de la transcripción, de los cuales el que inicia en P105 es el mayoritario (Graham, 2010; Zheng and Mbacker, 2006; Thierry, 2009). Las regiones 5' no traducidas de estos mRNAs tienen 1-6 nucleótidos de longitud, y el transcrito mayoritario carece de 5'-UTR (por lo que se denominan mRNA leaderless) ya que el nucleótido 105 con el que inicia la transcripción es la A del codón ATG que inicia la traducción (Thierry, 2009; Schneider-Gädicke, and Schwarz, 1988; Thierry *et al.*, 1987). Así, la estructura de los mRNAs de E6 y E7 de VPH-18 contrasta drásticamente con la de los mRNAs eucariontes en general. El mecanismo por el cual se traducen los mRNAs leaderless de E6 y E7 de VPH-18 permanece completamente desconocido.

Por último, se ha observado que E6 forma parte de un bucle de retroalimentación oncogénica positiva, que involucra a los factores de iniciación de la traducción eIF4E (Ghittoni *et al.*, 2010 y Robichaud *et al.*, 2018), eIF4A y la cascada de mTOR (Spangle *et al.* 2010, 2012) que activa la traducción dependiente de cap. En general los niveles de traducción elevados son una característica en la gran mayoría de los cánceres (Robichaud *et al.*, 2019)

Por todo lo anterior en este trabajo nos interesó estudiar cómo se traduce la oncoproteína E6 de VPH-18 durante la tumorigénesis, debido a que su mRNA tiene un 5'-UTR extremadamente corto. Esta característica nunca se ha observado en otros virus (Mohr, 2016). Entender cómo se traducen este tipo de mRNAs en procesos carcinogénicos nos puede ayudar a descubrir nuevos blancos terapéuticos para tratar el cáncer cervicouterino

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo es la estructura del mRNA de E6 de VPH-18 en biopsias de tumor?

¿Cómo se traduce y se regula el mRNA de E6 de VPH18?

HIPÓTESIS

En biopsias de tumor de cáncer cervicouterino, el mRNA de la oncoproteína E6 de VPH-18 tendrá 5'-UTR extremadamente cortas o no tendrá un 5'-UTR.

La regulación de la traducción de E6 de VPH-18 se encontrará en su ORF.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la regulación de traducción del ARN mensajero de la oncoproteína E6 de los virus del papiloma humano del género alfa 7.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la longitud del 5'-UTR de la oncoproteína E6 de VPHs de alto riesgo en tumores.
2. Evaluar cómo se traduce el mRNA de la oncoproteína E6 con diferente longitud de 5'-UTR.
3. Determinar si la regulación de la traducción de la oncoproteína E6 se encuentra dentro de su secuencia codificante.

4. Determinar si la traducción de la oncoproteína E6 depende de los principales factores de la traducción canónica (eIF4E, eIF4AI, *cap* y cola poli(A)).

METODOLOGÍA

1. Obtención de las muestras

Se obtuvo un total de 66 biopsias de carcinomas cervicales o neoplasias intraepiteliales cervicales grado 3 (CIN3) del Banco de Tumores del Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Todo de acuerdo con la aprobación del Comité de Ética y del Comité de Ética en investigación de los protocolos: Protocolos de Ética Ref. (016/004 / IBI) (CEI / 1032/16) e INCAN / Of. CEI 071/16; INCAN / Of. CI 0053/16; y CEI / 1032, de 20 de enero de 2016) .

2. Extracción de DNA y RNA

La extracción de DNA de las biopsias de tumores se realizó con el *Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)* con el siguiente protocolo:

1. En un tubo Eppendorf de 1.5 mL colocar la biopsia de tumor.
2. Agregar 600 μ L de lisis *buffer* y 20 μ L de proteinasa K.
3. Dejar incubando a 55 °C en agitación constante toda la noche (16 horas).
4. Al día siguiente, agregar 200 μ L de la solución de precipitación de proteínas.
5. Mezclar por inversión y dejar incubar en hielo durante 5 min.
6. Centrifugar a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) por 5 min.
7. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo.
8. Agregar al sobrenadante 600 μ L de isopropanol (precipitación de DNA).
9. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min.
10. Eliminar el sobrenadante (la pastilla de DNA se debe observar al fondo el tubo).
11. Agregar 600 μ L de etanol al 70% (lavado de pastilla).
12. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min.
13. Eliminar el sobrenadante

14. Dejar secar la pastilla (aproximadamente por 10 min)
15. Resuspender la pastilla en 50 μ L de *buffer* de elución.
16. Cuantificar y guardar a -20 °C.

Por otra parte, la extracción del RNA total se realizó con el método de Trizol de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Homogeneizar la muestra utilizando nitrógeno líquido y mortero (para evitar contaminación, el mortero se cubre con papel aluminio estéril para procesar cada muestra).
2. Pasar la muestra a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y agregar 1 mL de Trizol.
3. Incubar a temperatura ambiente por 5 min.
4. Agregar 200 μ L de cloroformo
5. Mezclar con vortex por 15 seg.
6. Centrifugar a 11,000 rpm a 4°C por 10 min.
7. La muestra se separa en 3 fases, el RNA se encuentra en la fase acuosa (fase superior).
8. Transferir la fase de RNA a un tubo nuevo.
9. Agregar 500 μ L de isopropanol frío (precipitación de RNA)
10. Incubar a -20 por 1 hr.
11. Centrifugar a 11,000 rpm a 4 °C por 10 min.
12. Remover el sobrenadante con pipeta (la pastilla de RNA se debe observar al fondo del tubo).
13. Agregar 1 mL de etanol al 70% y mezclar por pipeteo (lavado de pastilla)
14. Centrifugar a 8,000 rpm a 4 °C por 5min.
15. Remover el sobrenadante con pipeta
16. Dejar secar la pastilla por 15 min a temperatura ambiente.
17. Resuspender la pastilla en 50 μ L de agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC).
18. Cuantificar y guardar a -80°C.

3. Caracterización de la longitud de los 5'-UTR

Para determinar la longitud del 5'-UTR se utilizó la técnica de rápida amplificación de los extremos de los cDNA (5'-RACE, *5-Rapid Amplification of cDNA Ends*), utilizando el kit *SMARTer™ RACE cDNA Amplification* (Clontech). Para obtener el cDNA se siguió el siguiente protocolo:

1. Para cada reacción de 5'-RACE mezclar en tubo de PCR (200 µL):

→ RNA (1 µg)	1.0 – 2.75 µL
→ 5'-CDS primer A	1.0 µL
→ H2O hasta un volumen final de	3.75 µL

2. Centrifugar a 13,000 rpm por 15 seg.

3. Incubar a 72 °C por 3 min, después enfriar a 42 °C por 2 min (usar el termociclador).

4. Adicionar 1 µL de SMARTer IIA.

5. Agregar a cada reacción lo siguiente:

→ 5X First-strandBuffer	2.0 µL
→ DTT (20mM)	1.0 µL
→ dNTPMix (10 mM)	1.0 µL
→ Rnase inhibidor (40/µL)	0.25 µL
→ SMARTScribe™ reverse transcriptase (100 U)	1.0 µL

6. Incubar a 42 °C por 90 min, después calentar a 70 °C por 10 min (usar el termociclador).

7. Agregar 20 µL Tricine-EDTA *buffer*.

8. Guardar a -20 °C

Posterior a la obtención del cDNA se llevó a cabo una PCR para amplificar el 5'-UTR, utilizando un oligonucleótido específico del E6 de VPH 18 (5'

GCAACTGGCCTCTATAGTCC 3´) y el UPM (*Universal Primer Mix*, incluido en el kit de RACE). Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 3.

Reacción de PCR:

- 10X PCR *buffer* 5.0 µL
 - 10mM dNTPs 1.0 µL
 - 50X Advantage 2 polimerasa mix 1.0 µL
 - UPM 1.0µL
 - 10 µM primer específico 1.0 µL
 - cDNA 2.5 µL
 - H2O 38.5 µL
- 50 µL Volumen final

Tabla 4. Programa de amplificación de los 5´-UTRs

Proceso	No. Ciclos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	5 min.	94 °C
Desnaturalización	35	30 seg.	94 °C
Alineamiento		30 seg.	68 °C
Elongación		3 min.	72 °C
Elongación final	1	5 min.	72 °C

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.5%. Todas las bandas observadas se cortaron del gel y se purificaron con el *kit Zymoclean Gel DNA Recovery* (*ZymoResearch*) siguiendo las condiciones del fabricante. Las bandas fueron clonadas en el vector pTZ57R/T del *kit InsTAclone™ PCR Cloning* (*ThermoFisherScientific*) (Figura 7). La reacción de ligación se dejó a 4 °C durante toda la noche.

Reacción de ligación

- 5X *buffer* de ligación 2.0 µL

- Vector 1.0 μL
 - T4 DNA ligasa 0.4 μL
 - Producto de PCR 5.0 μL
 - H₂O 1.6 μL
- 10.0 μL volumen final

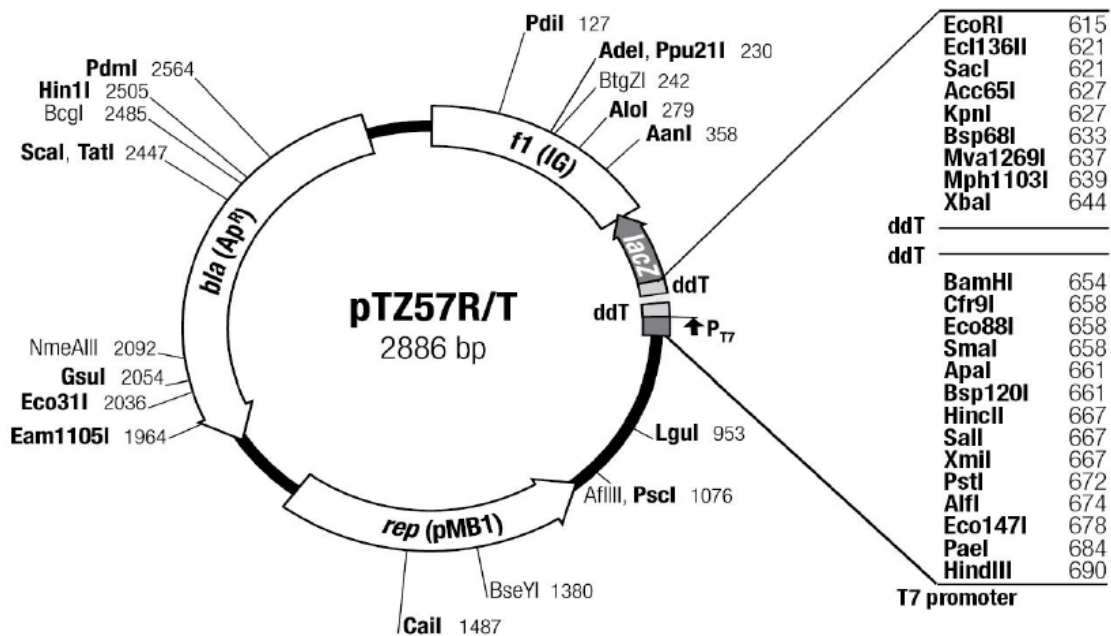


Figura 7. Mapa del vector pTZ57/T del kit *InsTAclone™ PCR Cloning*. Se muestran los diferentes sitios de restricción y el gen de resistencia a ampicilina. En este vector fueron clonados todos los productos de RACE.

Las ligaciones se transformaron con las bacterias químicamente competentes DH5 α (preparadas con el método de RbCl) con el siguiente protocolo:

1. Descongelar las bacterias competentes en hielo
2. En un tubo Eppendorf estéril agregar 5 μL de la reacción de ligación y 50 μL de las bacterias competentes.
3. Incubar en hielo por 30 min.
4. Incubar a 42 $^{\circ}\text{C}$ por 30 seg.

5. incubar en hielo por 3 min. (paso 4 y 5 son el choque térmico)
6. Agregar 450 μL de medio LB
7. incubar a 37 °C por 1 hr en agitación (600 rpm)
8. Centrifugar a 13,000 rpm por 30 seg.
9. Eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 100 μL
10. Plaquear los 100 μL en una placa de LB con ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
11. Incubar a 37 °C por 18 hrs.

De las colonias que crecieron en la placa, se seleccionaron 50 colonias y se les realizó PCR de colonia. La colonia se diluye en los 25 μL de la reacción. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 4.

Reacción de PCR de colonia

→ 10X PCR <i>buffer</i>	2.5 μL
→ 10 μM dNTPS	0.5 μL
→ MgCl_2	2 μL
→ Primer M13F	1 μL
→ Primer M13R	1 μL
→ Taqpolimerasa (fermentas)	0.1 μL
→ H ₂ O	<u>17.9 μL</u>
	25 μL volumen final

Tabla 5. Programa de amplificación de las PCR de colonia

Proceso	No. Ciclos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	2 min.	94 °C
Desnaturalización		30 seg.	94 °C
Alineamiento	35	30 seg.	60 °C

Elongación		1 min.	72 °C
Elongación final	1	5 min.	72 °C

Los PCRs de colonia se visualizaron en geles de agarosa al 1%. Las muestras positivas se secuenciaron con el *Kit BigDye® Terminator v3.1 Cyclesequencing (ThermoScientific)*. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 5. Las secuencias se analizaron con los programas *SnapGeneViewer* y *SerialCloner 2-6-1*.

Reacción del PCR de secuenciación

→ 10X <i>buffer</i>	2 µL
→ BigDye	1 µL
→ Primer	0.5 µL
→ 30 ng producto del PCR o 300 ng plásmido	-----
→ H ₂ O hasta un volumen final de	10 µL

Tabla 6. Programa de secuenciación

Proceso	No. Ciclos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	1 min.	96 °C
Desnaturalización	25	15 seg.	96 °C
Alineamiento		15 seg.	55 °C
Elongación		4 min.	60 °C

La purificación de las reacciones de secuenciación se llevó a cabo con el siguiente protocolo:

1. Agregar a la reacción de secuenciación 2.5 µL de EDTA 125 µM y mezclar bien.
2. Pasar a un tubo de 1.5 mL. Y agregar 30 µL de etanol al 100%.
3. Dejar incubar a temperatura ambiente por 15 min.

4. Centrifugar a 3000 RFC por 30 min.
5. Eliminar el sobrenadante.
6. Agregar 30 μ L de etanol al 70%
7. Centrifugar a 3000 RFC por 15 min.
8. Eliminar el sobrenadante con pipeta. Tratar de eliminar lo más posible.
9. Dejar secar a 37 °C por 45 min.

4. Construcción de los mRNA E6-Fluc

Para la construcción de todos los clones E6-Fluc, se usó como molde el vector pLUC-cassette (Gebauer *et al.* 1999). Este vector tiene un cistrón de luciferasa (Fluc) como reportero y una cola poli(A)₇₁ clonados en el vector *pBluescript* (Figura 8). Las construcciones fueron amplificadas por PCR (Tabla 6), usando un *primers forward* específico para cada construcción (Tabla 7). Este *primer* incluía la secuencia del promotor SP6, el 5'-UTR específico de cada construcción (7nt para el VPH16; 0, 3 o 50 nt para las construcciones de VPH 18), y los primeros 45 nucleótidos de la proteína E6, en marco con los primeros 18 nucleótidos de Fluc. También se realizaron 5 construcciones del VPH 18 con 3 nt de 5'-UTR y con mutaciones en el codón 2, en el codón 4, en el codón 2 y 3, en el nucleótido +4 y en los 3 nucleótidos antes del codón de inicio (Tabla 7). Se realizaron dos construcciones controles de 0 y 50 nucleótidos de longitud del 5'-UTR y el cistrón completo de Fluc. Como *primer reverse* de todas las construcciones se utilizó el primer T7 (Tabla 7).

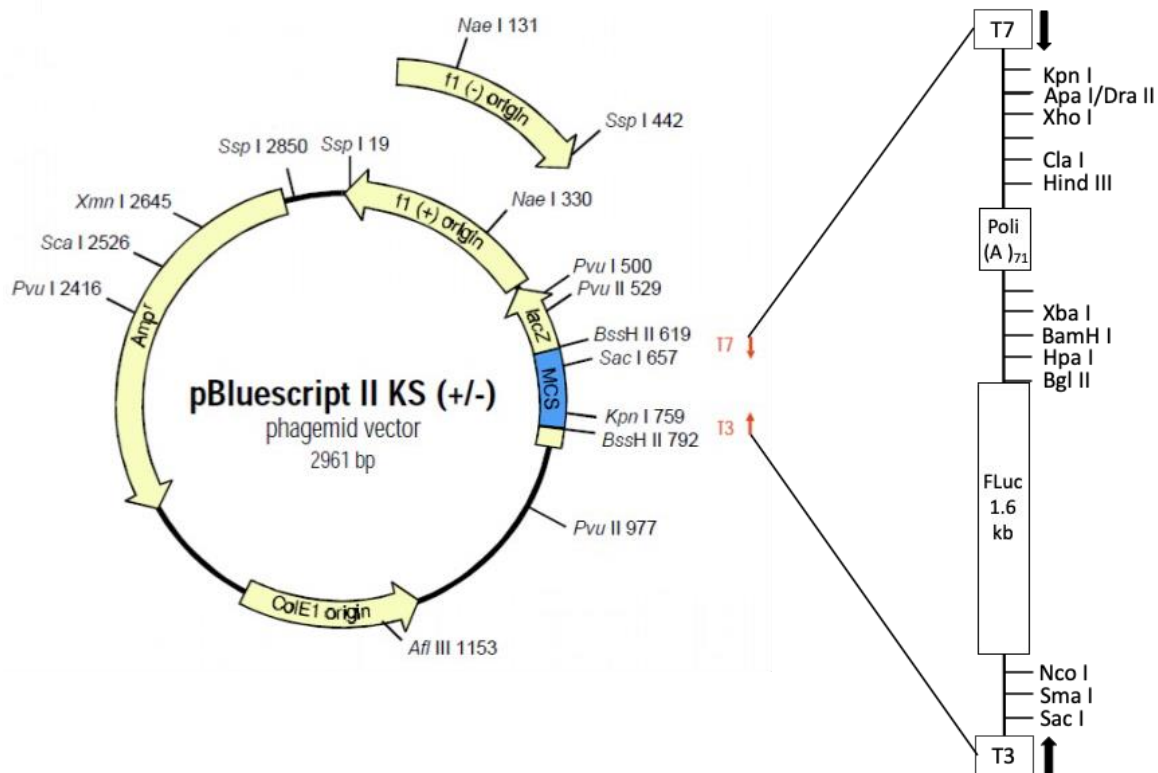


Figura 8. Mapa del plásmido reportero pLuc-cassette. Está clonado en el vector *pBluescript* II KS (-/+ con el ORF de Fluc y la cola poli(A)₇₁ (Gebauer *et al.*, 1999). Se muestran los promotores T3 y T7, la cola *Poli(A)*₇₁, el ORF de *FLuc* y diferentes sitios de restricción. El vector tiene el gen de resistencia a ampicilina.

Tabla 7. Programa de amplificación de todas las construcciones

Proceso	No. ciclos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	5 min.	94 °C
Desnaturalización	25	30 seg.	94 °C
Alineamiento		30 seg.	55 - 65 °C
Elongación		2 min.	68 °C
Elongación final	1	5 min.	68 °C

Reacción del PCR de todas las construcciones

→ 10X PCR <i>buffer</i>	2.5 μ L
→ 10 mM dNTPS	1.0 μ L
→ 50 mM MgSO ₂ 4	2.0 μ L
→ Primer Forward	2.0 μ L
→ Primer Reverse	2.0 μ L
→ Taq platinum high fidelity (invitrogen)	0.2 μ L
→ DNA	0.5 μ L (50 ng)
→ H ₂ O	<u>14.8 μL</u>
	25.0 μ L volumen final

Los PCRs fueron visualizados en geles de agarosa al 0.8%; el peso esperado de las amplificaciones fue de aproximadamente 1800 pb. Todas las bandas fueron cortadas y purificadas con el *kit Zymoclean Gel DNA Recovery (ZymoResearch)* siguiendo las condiciones del fabricante. Las bandas purificadas fueron ligadas (reacción antes mencionada), clonadas en el vector pTZ57R/T (Figura 7) y secuenciadas (protocolo antes mencionado). Para linealizar las construcciones se cortó 4000 ng con la enzima XhoI, el corte se visualizó en un gel de agarosa al 0.8 % y se purificó con el *kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research)*, siguiendo las condiciones del fabricante. Posteriormente, se realizó la transcripción *in vitro* con el *Kit mMACHINE™ SP6 (Invitrogen)*. La reacción de transcripción se incubó por 3 hrs en el termocicladora a 37 °C, pasando el tiempo se le agregó 1 μ L de TURBO DNasa y se dejó incubar por 30 minutos más a 37 °C. Por último, los mRNAs se limpiaron con el *Kit RNeasy MinElute Cleanup (QUIAGEN)* siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los mRNAs se cuantificaron y se guardaron en alícuotas a -80 °C.

Reacción de transcripción *in vitro* (*mMACHINE™ SP6*)

→ 10X <i>reaction buffer</i>	2 μ L
→ 2X NTP/CAP	10 μ L
→ Enzyme mix	2 μ L

→ DNA lineal 500 ng

→ H2O hasta un volumen de 20 µL

Tabla 8. Lista de primers de todas las construcciones

Primers E6-FLuc	
Primer	Secuencia 5'-3'
VPH16 R2	CTGTCAAAAGCCACTGTGTCCTG
VPH18 R1	GCACTGGCCTCTATAGTGCC
VPH18 R2	CCCAGTGTTAGTTAGTTTTTCCAATGTGTC
VPH31 R1	GGGACGACACACCACACGG
VPH31 R2	GACAAGCAGAACCGGACACATCC
VPH39 R1	GGGACGACACACCACACGG
VPH39 R2	GACAAGCAGAACCGGACACATCC
VPH45 R1	CAGAAACCATTGAACCCAGCAG
VPH45 R2	GGAGGAAAACGATGAAGCAGATGG
VPH58 R1	CGACCCGAAATATTATGAAACC
VPH58 R2	GTGGCCGGTTGTGCTTGTC
7nt-VPH16 <i>Forward</i>	ATTAGGTGACACTATAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCA CAGGAGCGACCCAGAAAGTTAGAAGAAGACGCCAAAAA CATAAAGA
Ont-VPH18 <i>Forward</i>	ATTAGGTGACACTATAGATGGCGCGCTTTGAGGATCCAA CACGGCGACCCTACAAGCTACCTGAAGAAGACGCCAAAAA ACATAAAGA

3nt-VPH18 <i>Forward</i>	ATTTAGGTGACACTATAACCATGGCGCGCTTTGAGGATCC AACACGGCGACCCTACAAGCTACCTGAAGAAGACGCCAA AAACATAAAGA
50nt-VPH18 <i>Forward</i>	ATTTAGGTGACACTATAGGGACCGAAAACGGTGTATATA AAAGATGTGAGAAACACACCACAATACCATGGCGCGCTT TGAGGATCCAACACGGCGACCCTACAAGCTACCTGAAGA AGACGCCAAAAACATAAAGA
0nt-control <i>Forward</i>	ATTTAGGTGACACTATAGATGGAAGACGCCAAAAACATA AAGA
50nt-control <i>Forward</i>	ATTTAGGTGACACTATAGACGCAATTAACCCTCACTAAAG GGAACAAAAGCTGGAGCTCGCCCGGGACCATGGAAGACG CCAAAAACATAAAGA
C2-VPH18 <i>Forward</i>	ATTTAGGTGACACTATAGACCATGTTTCGCTTTGAGGATC CAACACGGCGACCCTACAAGCTACCTGAAGAAGACGCCA AAAACATAAAGA
C4-VPH-18 <i>Forward</i>	ATTTAGGTGACACTATAGACCATGGCGCGCGGGGAGGAT CCAACACGGCGACCCTACAAGCTACCTGAAGAAGACGCC AAAAACATAAAGA
C2,3-VPH18 <i>Forward</i>	ATTTAGGTGACACTATAGACCATGTTTTTTTTTTGAGGATC CAACACGGCGACCCTACAAGCTACCTGAAGAAGACGCCA AAAACATAAAGA
(+4)-VPH18 <i>Forward</i>	ATTTAGGTGACACTATAGACCATGTCGCGCTTTGAGGATC CAACACGGCGACCCTACAAGCTACCTGAAGAAGACGCCA AAAACATAAAGA
US-VPH18 <i>Forward</i>	ATTTAGGTGACACTATAGGGATGGCGCGCTTTGAGGAT CCAACACGGCGACCCTACAAGCTACCTGAAGAAGACGCC

	AAAAACATAAAGA
T7 Reverse	TAATACGACTCACTATAGGG
	Primers E6-V5
0nt-VPH18 V5 <i>Forward</i>	ATTTAGGTGACACTATAGATGGCGCGCTTTGAGGATCC
3nt-VPH18 V5 <i>Forward</i>	ATTTAGGTGACACTATAACCATGGCGCGCTTTGAGG
50nt-VPH18 V5 <i>Forward</i>	ATTTAGGTGACACTATAGGGACCGAAAACGGTGTATATA AAAGATGTGAGAAACACACCACAATACCATGGCGCGCTT TGAGGATCC
C2-VPH18 V5 <i>Forward</i>	GGTACCATTTAGGTGACACTATAGACCATGTTTCGCTTTG AG
C4-VPH-18 V5 <i>Forward</i>	GGTACCATTTAGGTGACACTATAGACCATGGCG CGCGGGGAG
C2,3-VPH18 V5 <i>Forward</i>	GGTACCATTTAGGTGACACTATAGACCATGTTTTTTTTTTG AG
(+4)-VPH18 V5 <i>Forward</i>	GGTACCATTTAGGTGACACTATAGACCATGTCGCGCTTTG AG
US-VPH18 V5	GGTACCATTTAGGTGACACTATAGGGGATGGCGCGCTTT

<i>Forward</i>	GAG
V5 <i>Primer reverse</i>	CTCGAGTTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGG GATAGGCTTACCTACTTGTGTTTCTCTGCGTCGTTGGAGTC
TILM FLuc <i>Forward</i>	ATTTAGGTGACACTATAG <u>ACCATGGCGCGCTTT</u> GAAGACG CCAAAAAC
TILM FLucmut <i>Forward</i>	ATTTAGGTGACACTATAG <u>GGGATGTTTTTGGG</u> GAAGAC GCCAAAAAC

Letras en café: promotor SP6; letras en negro: 5'-UTR; letras azules: E6; letras amarillas: FLuc; letras anarjas: mutaciones; letras verde: enzimas de restricción; letras moradas: epitope V5; letras roja: codon de stop; letras subrayadas: motivi TILM.

Para realizar las construcciones E6-FLuc de 0nt-VPH18, 3nt-VPH18 y 50nt-VPH18 con un *cap* no funcional se utilizó la misma construcción antes mencionada, Sin embargo, para la transcripción *in vitro* se utilizó el *SP6 MaxiScript in vitro transcription kit* (Ambion), que nos permite cambiar el tipo de *cap*. Se utilizó el *cap* no funcional *AppG RNA cap structure analog* (New England Biolabs). Se realizó el mismo protocolo de transcripción *in vitro* y de purificación antes mencionado.

Reacción de transcripción *in vitro* (*SP6 MaxiScript*)

→ 10X <i>reaction buffer</i>	2 μL
→ 10 mM ATP	1 μL
→ 10 mM CTP	1 μL
→ 10 mM UTP	1 μL
→ 1.0 mM GTP	1 μL
→ 10 mM <i>Cap</i>	1 μL
→ Enzyme mix	2 μL

- DNA lineal 500 ng
- H₂O hasta un volumen de 20 µL

5. Construcción de los mRNA E6-V5

Para la construcción de los mRNAs E6-V5 se utilizó como molde el vector p3XFLAG-CMV-10 que tiene el ORF de la proteína E6 del VPH 18 (donado por la Dra. Marcela Lizano, Instituto Nacional de Cancerología, México). Todas las construcciones fueron amplificadas por PCR (Tabla 6). Para estas construcciones, el *primer forward* contenía la enzima de restricción KpnI, el promotor SP6, el 5'-UTR específico de cada construcción (0, 3 o 50 nt) y los primeros 15 nucleótidos de la proteína E6. De esta versión también se realizaron las 5 construcciones de 3 nt-VPH18 con mutaciones en el codón 2, en el codón 4, en el codón 2 y 3, en el nucleótido +4 y en los 3 nucleótidos antes del codón de inicio. El *primer reverse* contenía la secuencia del epítipo V5 y el sitio de restricción XhoI. (Tabla 7). Las construcciones fueron ligadas y clonadas (protocolos antes mencionados) en el plásmido pTZ57R/T-poli(A)₇₁(Fig. 9). De cada construcción se cortó 6000 ng con las enzimas EcoRI y HindIII para liberar el fragmento linealizado. El corte se visualizó en geles de agarosa al 0.8%, la banda se purificó con el *kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research)*. Posteriormente, se realizó la transcripción *in vitro* con el *Kit mMESAGE mMACHINE™ SP6 (Invitrogen)*. Siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

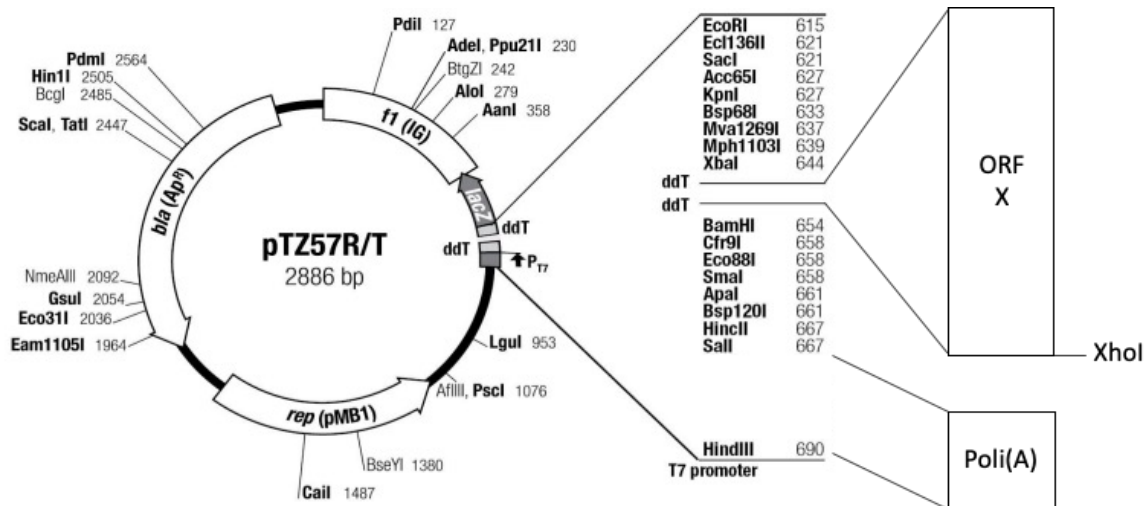


Figura 9. Mapa del plásmido pTZ57R/-poli(A)₇₁. Se muestra el sitio de clonación múltiple. La cola *poli(A)*₇₁ está clonada entre SalI y HindIII. Para clonar los fragmentos se liberó el *ORF X* con *KpnI/XhoI* y se clonaron las construcciones con estas mismas enzimas.

6. Cultivo celular

Las líneas celulares HeLa, HacaT y 293T fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% a 37 °C en una atmósfera de 95% de O₂. Las células HeLa eIF4E KD (KD, por sus siglas en inglés *Knocked-down*) y las células HeLa con shRNA inespecífico SC (SC, por sus siglas en inglés *scrambled*) fueron crecidas en presencia del antibiótico selectivo zeocina hasta llegar a una confluencia de 80%, posteriormente se les dio un pase a una caja de 125 cm² en una dilución 1:5 y se dejó crecer hasta llegar a una confluencia del 90% para posteriormente procesarlas.

7. Traducción *in vitro*

De todas las líneas celulares se realizaron lisados celulares competentes en traducción con el siguiente protocolo (Svitkin *et. al.*, 2012):

1. De cada línea celular crecer al menos 6 cajas de cultivo de 175 cm² a una confluencia entre 75-90%.

2. Lavar las células con 10 mL de PBS 1X.
3. Agregar 5 mL de tripsina e incubarlas aproximadamente 3 min a 37 °C para despegarlas.
4. Detener la reacción de la tripsina agregando 5 mL de medio de DMEM suplementado con 20% de SFB.
5. Transferir las células a tubos de 50 mL.
6. Filtrar las células con una gasa.
7. Centrifugar las células a 800 rpm por 5 min y eliminar el sobrenadante.
8. Lavar las células con 7 mL de *buffer* isotónico (HNG) frío y centrifugar a 800 rpm por 5 min.
9. Sin agregar más *buffer* centrifugar a 1500 rpm por 5 min, eliminar todo el sobrenadante.
10. Resuspender las células con 2 volúmenes de *buffer* hipotónico (HB).
11. Incubar las células por 30 min en hielo.
12. Lisar las células 18 veces con un homogenizador (*WHEATON® DounceTissueGrinder, 7 mL*).
13. Agregar 1/9 del volumen del lisado de *buffer* concentrador (CB).
14. Pasar el lisado a tubos de 1.5 mL y centrifugar a 12500 rpm por 10 min a 4°C.
15. Recolectar el sobrenadante y alicuotar.

Buffer isotónico (HNG)

- 35 mM HEPES-KOH pH 7.3
- 146 mM NaCl
- 11 mM glucosa

Esterilizar por filtración y guardar a 4 °C

Buffer hipotónico (HB)

- 25 mM HEPES-KOH pH 7.3
- 50 mM KCl
- 1.5 mM MgCl₂
- 1 mM DTT

Buffer concentrador (CB)

- 25 mM HEPES-KOH pH 7.5
- 1 M KCH₃COO
- 30 mM MgCl₂
- 30 mM DTT

Las reacciones de traducción *in vitro* se realizaron de acuerdo a Svitkin, 2004. La reacción fue incubada a 30 °C por 60 min, posteriormente la reacción se detuvo agregando 2 volúmenes de *passive lysis buffer* (Promega) frío. La expresión fue medida usando 12 µL de la reacción y 60 µL de substrato de luciferasa (Luciferase Reporter Assay Substrate, Promega).

Reacción de traducción *in vitro*

- Lisado de traducción 9.0 µL
- Mix de traducción 1.2 µL
- 2.5 mM Espermidina 1.2 µL
 N° cat. S2626, SIGMA
- mRNA 1-2 ng/µL

Mix de traducción

- 10 mM ATP
- 2.0 mM GTP
- 2.0 mM CTP
- 2.0 mM UTP
- 200 mM creatinina fosfatasa N° cat. 237911, CALBIOCHEM
- 1 mg/mL creatina cinasa N° cat. C3755, SIGMA
- 0.2 mM de cada aminoácido N° cat. L4461, Promega
- 125 mM HEPES-KOH pH 7.3

También se realizaron traducciones *in vitro* con los lisados comerciales de germen de trigo (*Wheat Germ Extract*, Promega N° cat L4380) y de reticulocitos de conejo (*Rabbit Reticulocyte Lysate*, Promega N° cat L4960). La reacción del lisado de germen de trigo, se incubó a 25 °C por 90 min, y la reacción del lisado de reticulocitos de conejo se incubó a 30 °C por 90 min. Ambas reacciones se detuvieron con 10 µL de *passive lysis buffer* (Promega). Para medir la expresión de luciferasa se utilizó 12 µL de la reacción y 50 µL de sustrato de luciferasa (Luciferase Reporter Assay Substrate, Promega). La traducción *in vitro* con el lisado de germen de trigo de las construcciones E6-V5 se midieron por *Western blot*.

Reacción de traducción germen de trigo

→ Lisado de trigo	6.4 µL
→ -Metionina	0.5 µL
→ -Leucina	0.5 µL
→ Acetato de potasio	0.9 µL
→ RNAsin (Promega N° cat N2122)	0.1 µL
→ mRNA	25 ng
→ H ₂ O hasta un volumen de	12.5 µL
→	

Reacción de traducción reticulocitos de conejo

→ Lisado de reticulocitos	9 µL
→ -Metionina	0.14 µL
→ -Cisteína	0.14 µL
→ RNAsin (Promega N° cat N2122)	0.28 µL
→ mRNA	25 ng
→ H ₂ O hasta un volumen de	14.0 µL

8. Extracción de proteínas y Western blot

Se obtuvieron extractos proteicos de las células Hela eIF4E KD y SC. Las células se lavaron dos veces con PBS 1X y despegaron con tripsina. Se centrifugaron a 800 rpm por 5 min a 4 °C. Se lisaron con 100 µL de *buffer* RIPA dejándolas incubar en hielo por 30 min, posteriormente, se centrifugaron a 15000 rpm por 10 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se realizaron alícuotas que se guardaron a -80 °C hasta su uso.

***Buffer* RIPA**

- 50 mM Tris-HCl pH 7.5
- 1 mM EDTA
- 100 mM NaCl
- 1 % NP-40

Para el *Western blot* se cargaron 20 µg de proteína en geles de acrilamida al 12 %, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Pierce ThermoScientific™). Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en PBT por 1 hr a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron en agitación con el anticuerpo primario *mouse* anti-eIF4E (BD, *TransductionLaboratories*) en una dilución 1:5000, o con *mouse* anti-β-actina (Sigma) en una dilución 1:10000 por 12 hrs a 4 °C. Las membranas se lavaron en agitación cuatro veces con PBT a temperatura ambiente; posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-*mouse* (GE Healthcare) en una dilución 1:2500 por 1 hr a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar 4 veces con PBT y por último se revelaron usando *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate*(Millipore).

Para el *Western blot* de las traducciones *in vitro* con el lisado de germen de trigo, se cargaron 8 µL de la reacción de traducción en geles de acrilamida al 15 %. Se llevó a cabo el mismo protocolo arriba mencionado. Se utilizó el anticuerpo primario *mouse* anti-V5 (Invitrogen) en una dilución 1:5000 y el anticuerpo secundario anti-*mouse*(GE Healthcare) en una dilución 1:3000.

Buffer de corrida geles de acrilamida 10X 1 L

- SDS 10 gr
- Tris-Base 30.3 gr
- Glicina 44.1 gr

Buffer de transferencia 1X 1 L

- Tris-Base 3.03 gr
- Glicina 14.0 gr
- Metanol 200 mL (20% V/V)

Buffer PBS 10X 1 L

- NaCl 80.0 gr
- KCl 2.0 gr
- Na₂HPO₄ 11.5 gr
- KH₂PO₄ 2.4 gr

Ajustar el pH a 7.4

Buffer PBT

- PBS 1X + 0.2% de Tween 20

Solución para bloquear

PBT + 5% de leche baja en grasa.

9. Producción de proteína recombinante 4E-BP

La metodología para la síntesis de proteína recombinante se realizó de acuerdo a *GST Gene Fusion System* de *Amersham pharmacia biotech*. La proteína 4E-BP se clonó en el vector pGEX 6P2 (Figura 10) y se transformaron en la cepa de *E. coli* BL-21.

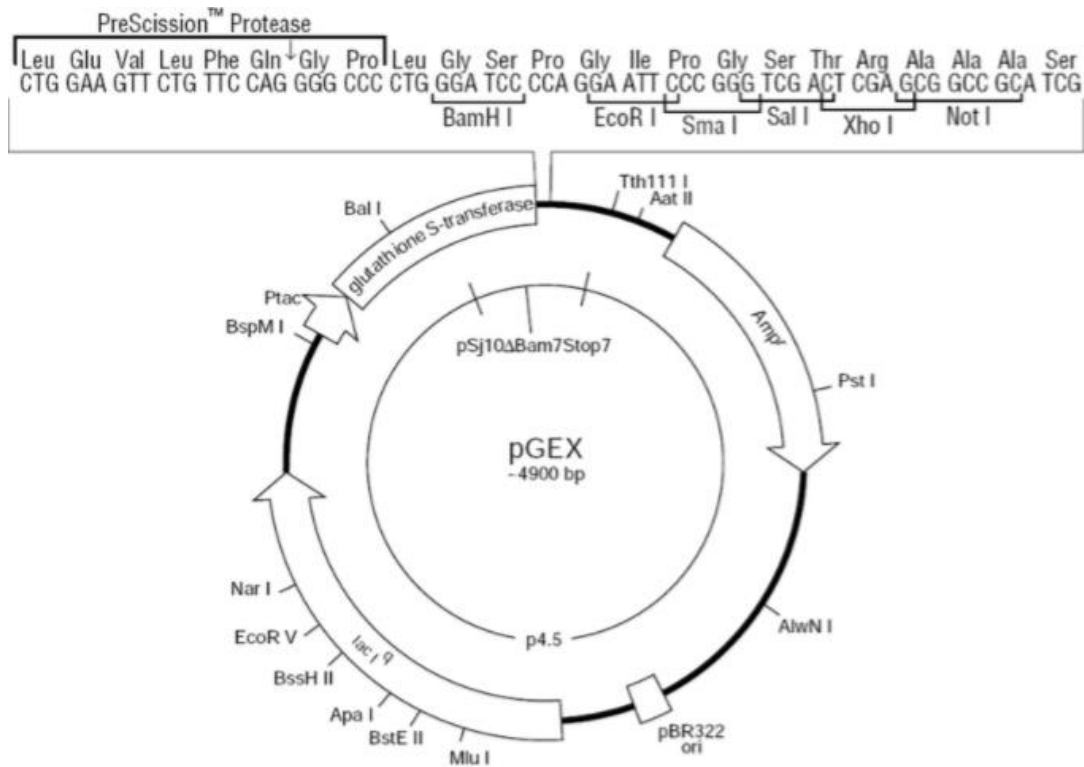


Figura 10. Mapa del vector pGEX 6P2. Se muestra el ORF de la *glutathione S-Transferase* (GST), el sitio de corte de la proteasa PreScission™ Protease y el sitio de clonación múltiple. Tiene el gen de resistencia a ampicilina (*Amp*).

Protocolo de purificación de la proteína recombinante

1. Precultivo. Inocular las bacterias BL21 GST-4E-PB en 10 mL de medio LB con ampicilina. Dejar crecer en agitación a 37 °C por 15 hrs.
2. Se inoculan 200 µL del precultivo en 200 mL de LB con ampicilina. Dejar crecer en agitación a 37°C hasta alcanzar una O.D entre 0.7-0.8
3. Inducir 4 hrs en agitación a 37 °C con isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM.
4. Centrifugar el cultivo a 7700 g por 10 min a 4 °C
5. Descartar el sobrenadante y colocar el tubo en hielo.
6. Resuspender la pastilla en 10 mL de *buffer* de sonicación.
7. Dejar incubar 30 min a 4 °C.
8. Sonicar a una amplitud de 30% durante 4 ciclos de 10 seg.
9. Agregar Triton X-100 a una concentración final de 1%.

10. Incubar a 4 °C en rotación por 30 min.
11. Centrifugar a 4°C a 12000 g por 10 min. recuperar el sobrenadante (lisado) en un tubo nuevo.
12. En un tubo agregar 200 uL de la resina glutatión sefarosa 4B.
13. Centrifugar a 4 °C a 500 g por 5 min.
14. Lavar la resina con 2 mL de PBS 1X
15. Resuspender la resina en 200 ul de PBS 1X y agregar el lisado del paso 11.
16. Incubar a 4 °C en rotación por 45 min.
17. Centrifugar a 500 g por 5 min. Eliminar el sobrenadante.
18. Lavar las perlas 1 veces con PBS 1X, eliminar el sobrenadante
19. Lavar con 1 mL de *buffer* de corte.
20. Centrifugar a 500 g por 5 min. Eliminar el sobrenadante.
21. Resuspender las perlas en 96 ul de *buffer* de corte más 4 ul de la proteasa PreScission.
22. Dejar incubar a 4 °C por 4 horas.
23. Centrifugar a 4 °C a 500 g por 5 min.
24. Recuperar el sobrenadante
25. Guardar en alícuotas a -80 °C

Buffer de sonicación

- PBS 1X
- PMSF a una concentración final de 1 mM
- 10 mg/mL Lisozima 1 mL

Buffer de corte

- 50 mM Tris-HCl pH 7
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 0.01 % Triton X-100

RESULTADOS

1. Los mRNAs que codifican para oncoproteína E6 de los VPH de alto riesgo de la especie alfa 7 presentan regiones 5'-UTR extremadamente cortas

La transcripción del genoma del virus se inicia en más de una región promotora, generando mRNA policistrónicos. En los VPH del género alfa, se han caracterizado dos promotores: el temprano y el tardío (Graham, 2010). Las oncoproteínas E6 y E7 son codificadas por un mRNA bicistrónico, que es transcrito por el promotor temprano (Graham, 2017). Sorprendentemente, diversos estudios que se han llevado a cabo en líneas celulares de carcinomas cervicales (Schneider *et. al.*, 1986; Thierry *et. al.*, 1987; Romanczuk *et. al.*, 1990, Smotkin *et. al.*, 1986 y Wang *et. al.*, 2010) han observado que en el VPH-18, la transcripción de E6 genera mRNAs con 5'-UTR extremadamente cortos. Incluso que la transcripción comienza en la adenina 105, que es la misma del codón de inicio de la traducción (AUG) del marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés *Open Reading Frame*) de E6. La generación de mRNAs con 5'-UTR extremadamente corto o sin 5'-UTR es un fenómeno sorprendente, ya que en virus no se ha descrito este fenómeno (Mohr & Walsh, 2016). Debido a que este fenómeno solo se ha observado *in vitro*, en este trabajo primero quisimos estudiar si este fenómeno sucede en biopsias de tumores de cáncer cervicouterino y si tiene relevancia en la regulación de la expresión genética del mRNA de E6. Mediante la técnica de RACE se caracterizó el 5'-UTR del mRNA de E6/E7 aislado de biopsias de tumor de diferentes tipos de VPH de alto riesgo (Tabla 8). Para el VPH-16, se detectaron dos poblaciones de mRNAs con 7 y 9 nucleótidos de longitud de su 5'-UTR. Para el VPH-18, se detectaron 5 poblaciones de mRNAs de 0, 1, 3, 4 y 5 nucleótidos de longitud en su 5'-UTR. Sin embargo, las poblaciones de 0 y 3 nucleótidos fueron las más representadas, con 106 y 135 clones analizados, respectivamente (Tabla 8).

Para el VPH-31, solo se encontró una población de mRNA con 9 nucleótidos en su 5'-UTR (Tabla 8). Para el VPH-39 se encontraron dos poblaciones con 3 y 1 nucleótidos en su 5'-UTR (Tabla 8). Para el VPH-45, se encontró solo una población con 3 nucleótidos en su 5'-UTR (Tabla 8). Por último, para el VPH-58 se encontró una población con 217 nucleótidos en su 5'-UTR (Tabla 8). Estos resultados mostraron que

el mRNA de E6 de los tipos virales 18, 39 y 45 en biopsias de tumor se transcriben con 5'-UTR extremadamente cortos (es decir, de 0 a 3 nucleótidos de longitud). *In vivo* estos tres tipos virales pertenecen a la especie alfa 7 de los VPH.

Tabla 9. Caracterización del 5'-UTR del mRNA de E6 en biopsias de tumores.

Tipo viral	Longitud del 5'-UTR	Secuencia del 5'-UTR	Clones analizados	Tumores analizados
16	9	AGAACUGCAA <u>AUG</u>	88	4
	7	<u>AACUGCA</u> <u>AUG</u>	16	
18	5	AUACC <u>AUG</u>	57	11
	4	UACC <u>AUG</u>	2	
	3	CC <u>AUG</u>	135	
	1	C <u>AUG</u>	1	
	0	<u>AUG</u>	106	
31	9	ACAGACGCC <u>AUG</u>	15	1
39	3	CCG <u>AUG</u>	35	1
	1	G <u>AUG</u>	9	
45	3	AGG <u>AUG</u>	70	2
58	217	...CAGGACT <u>AUG</u>	44	1

2. La síntesis de E6 de VPH-18 es llevada a cabo por mRNAs con un 5'-UTR extremadamente cortos o sin 5'-UTR.

Debido a que encontramos diferentes poblaciones de mRNAs, decidimos probar la capacidad de traducción de las dos poblaciones principales encontradas en el mRNA de E6 de VPH-18 (0 y 3 nucleótidos de 5'-UTR). Para esto, realizamos ensayos de traducción *in vitro* utilizando un lisado de traducción de células HeLa. Como se muestra

en la Figura 11A, clonamos el 5'-UTR de cada construcción, seguido de los primeros 45 nucleótidos de E6 en marco con el reportero de luciferasa (FLuc). Generamos tres construcciones del mRNA de E6 de VPH-18 con 0, 3 y 50 nucleótidos de longitud en su 5'-UTR (el 5'-UTR de 50 nucleótidos sólo se encontró en la línea celular HeLa). También se generó una construcción del mRNA de E6 de VPH-16 con 7 nucleótidos de 5'-UTR; previamente se reportó que este mensajero se traduce dependiente de *cap* y de *scanning* (Stacey, 2000). Como controles, generamos dos construcciones de mRNAs de FLuc con 50 nucleótidos de 5'-UTR y sin 5'-UTR. Una representación esquemática de estas construcciones se muestra en la Figura 1A. Estas construcciones se transcribieron *in vitro* para generar mRNAs con *cap* y poliadenilados, que posteriormente se usaron para realizar los ensayos de traducción *in vitro* utilizando los lisados de células HeLa (Figura 11B).

Como se esperaba, observamos que la traducción del mRNA de FLuc control sin 5'-UTR (0nt-control) se vio gravemente afectada debido a la pérdida del 5'-UTR, en comparación con el mRNA de FLuc control de 50 nucleótidos de 5'-UTR (50nt-control). También observamos que la traducción del mRNA de VPH-18 con 50 nucleótidos de 5'-UTR (50nt-VPH18) y la del mRNA de VPH18 con 3 nucleótidos de 5'-UTR (3nt-VPH18), mostraron eficiencias de traducción similares, y que la traducción del mRNA de VPH-18 sin 5'-UTR (0nt-VPH18) muestra la misma eficiencia de traducción que el control 50nt-control (Figura 11B). Sorprendentemente, la construcción de VPH-16 con 7 nucleótidos de 5'-UTR (7nt-VPH16) mostró una eficiencia de traducción más débil que el 0nt-VPH18 (Figura 11B).

La capacidad para impulsar la traducción de todas las construcciones también se probó en lisados de otras líneas celulares, incluidas HaCat y 293T, con las cuales obtuvimos resultados similares a los obtenidos en el lisado de HeLa (Figura 11 C y D). En ambas líneas celulares el 3nt-VPH18 obtuvo la mayor eficiencia de traducción, y el 0nt-VPH18 tuvo la misma eficiencia de traducción que el 50nt-VPH18 y que el 50nt-control.

También quisimos analizar la eficiencia de traducción en sistemas distantes, es decir, en reticulocitos de hígado conejo (RRL, por su siglas en inglés, *Rabbit Reticulocyte Lysate*) y en lisados de germen de trigo (WGL, por su siglas en

inglés, *Wheat Germ Lysates*), como se muestra en la Figura 11 panel E y F. En el lisado de germen de trigo observamos que al igual que en los lisados celulares el 3nt-VPH18 presentó la mayor eficiencia de traducción. En reticulocitos de conejo también el 3nt-VPH18 obtuvo la mayor eficiencia de traducción en comparación con el 0nt-VPH18 y 50nt-VPH18.

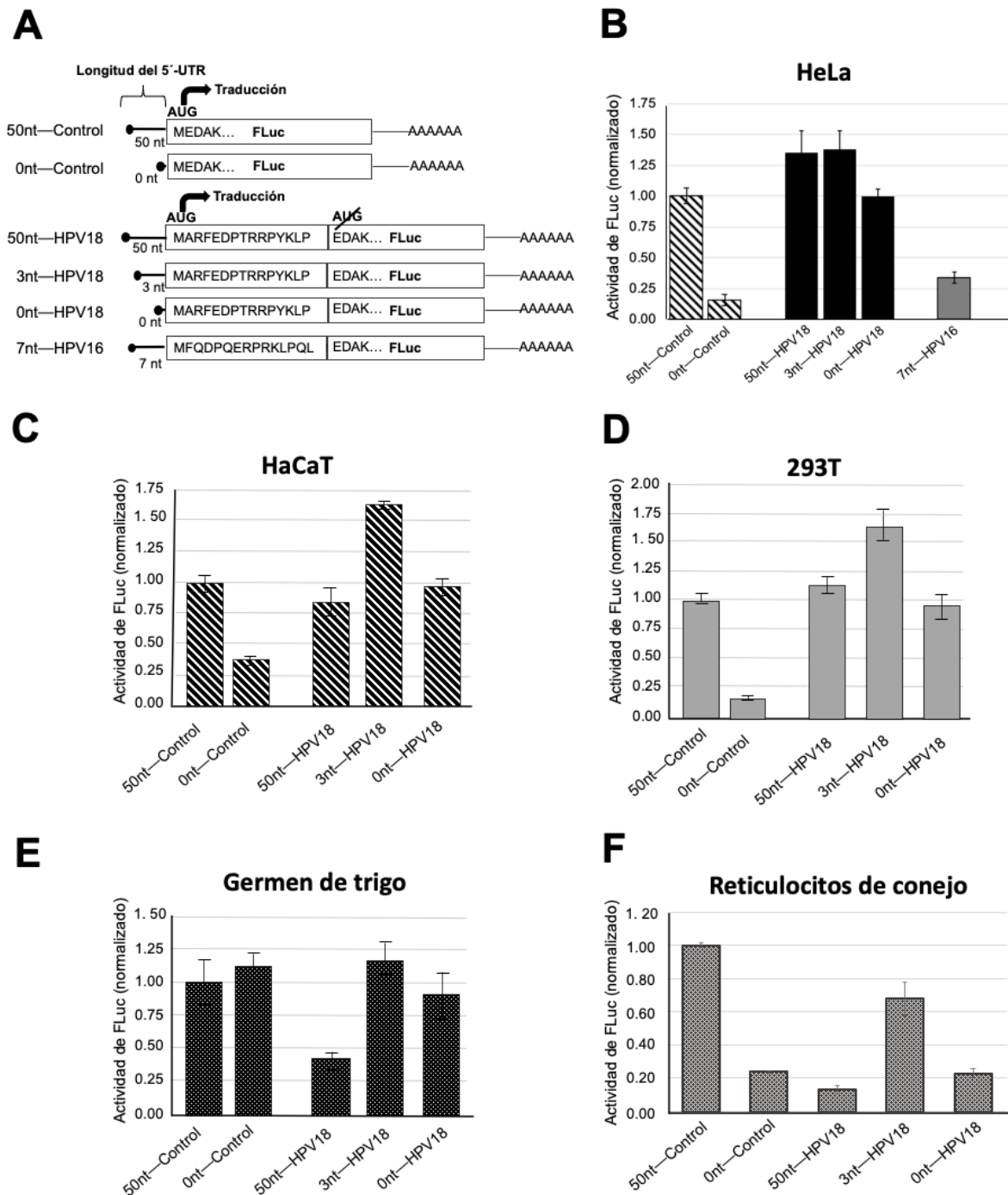


Figura 11. Los mRNAs del VPH-18 sin un 5'-UTR o con 5'-UTRs extremadamente cortos promueven la traducción de E6. A) Esquema de todas las construcciones. Se indica la longitud del 5'-UTR de cada construcción, y el codón inicio de la traducción AUG es indicado con una flecha. El 5'-UTR del 50nt—Control es una secuencia arbitraria de 50 nucleótidos del vector pBluescript(Shahbazian, 2014). Las construcciones de VPH-18 y VPH-16 contienen el 5'-UTR del mRNA de E6 de VPH-18 y VPH-16, respectivamente. Se indican los aminoácidos del 1-15 de VPH-18 o VPH-16 en marco con el ORF de FLuc. En todas las construcciones el codón de inicio de la traducción de FLuc fue eliminado, por lo que la traducción de las proteínas fusionadas solo se puede iniciar en el codón de inicio indicado con una flecha. **B-D)** Traducción *in vitro* de todas las construcciones en lisados celulares de: **(B)**HeLa, **(C)**HaCaTy **(D)**293T, y en los lisados de *germen de trigo* **(E)** y reticulocitos de *conejo***(F)**.

Utilizando la construcción 50nt-Control analizamos la eficiencia de traducción en tres diferentes sistemas (HeLa, reticulocitos de conejo y germen de trigo). Con los lisados de reticulocitos de conejo y germen de trigo se realizó traducción *in vitro*. En el lisado de HeLa transfectamos el mRNA 50nt-Control. Como podemos observar en la Figura 12, la traducción en lisados de germen de trigo fue significativamente mayor (alrededor de 70 veces) en comparación con los lisados de HeLa y reticulocitos de conejo.

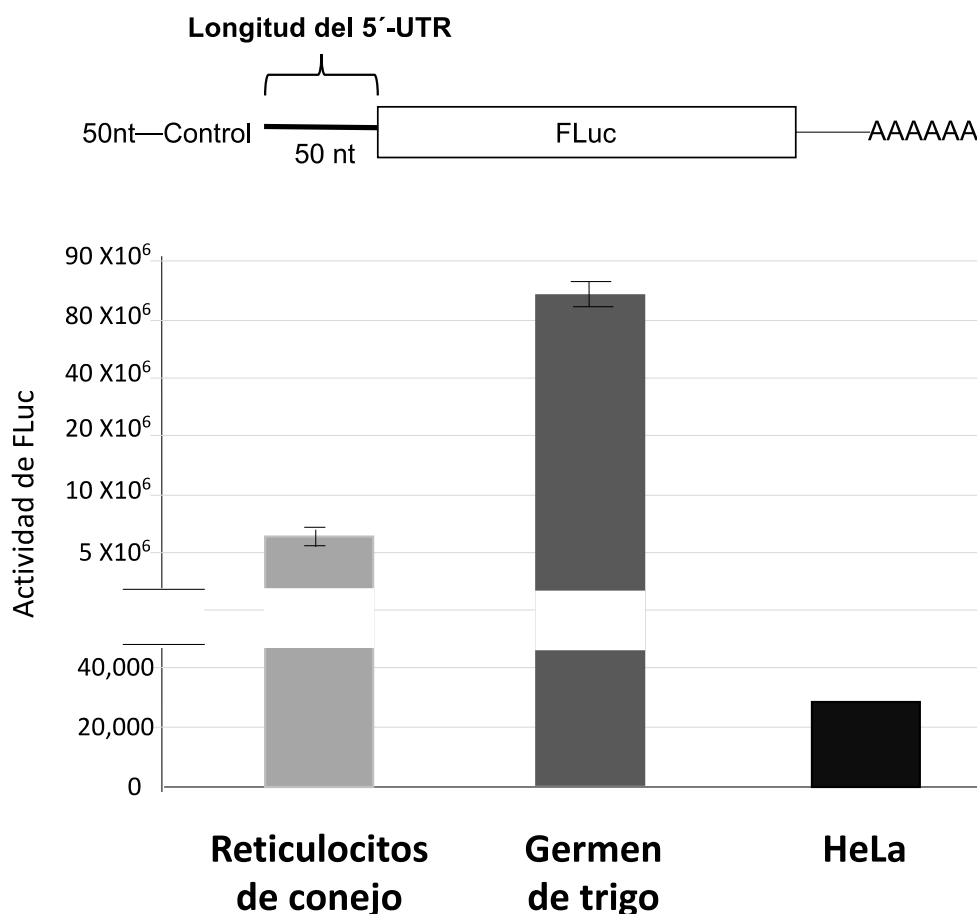


Figura 12. Actividad de FLuc en diferentes sistemas de traducción. La traducción *in vitro* se llevó a cabo utilizando el mRNA 50nt-control descrito en la Figura 1. También se utilizó el mRNA para transfectar células HeLa y medir la actividad de FLuc.

Luego analizamos la eficiencia traduccional de los 5'-UTRs en el contexto del ORF completo de E6 de VPH-18. Como observamos en los resultados anteriores, sólo se analizaron los primeros 45 nucleótidos del ORF de E6, y por esta razón quisimos saber

si la mayor eficiencia de traducción también es mayor con un 5'-UTR de 3 nucleótidos con la proteína completa. Para esto, clonamos el ORF completo de E6 en fase con el epítipo V5 (Figura 13A) y realizamos su traducción *in vitro*. Para estas construcciones, la traducción fue detectada por WB utilizando el anticuerpo anti-V5. Debido a que no pudimos detectar las proteínas sintetizadas en lisados de HeLa, ni en reticulocitos de conejo por medio de WB (porque su eficiencia de traducción es mucho más baja que con el lisado de germen de trigo) (Figura 12), utilizamos el lisado de germen de trigo para estos experimentos. Los resultados obtenidos concuerdan con los antes mencionados, es decir, la mayor eficiencia de traducción se obtuvo con el mRNA de 3nt-VPH18-V5, en comparación con los mRNAs de 0nt-VPH18 y 50nt-VPH18 (Figura 13B, C). En conjunto, estos resultados muestran que el VPH-18 expresa mRNAs con 5'-UTR de 0 y 3 nucleótidos para traducir a la proteína E6 de una manera eficiente, este tipo de mRNAs nunca antes se habían observado en virus (Mohr & Walsh, 2016).

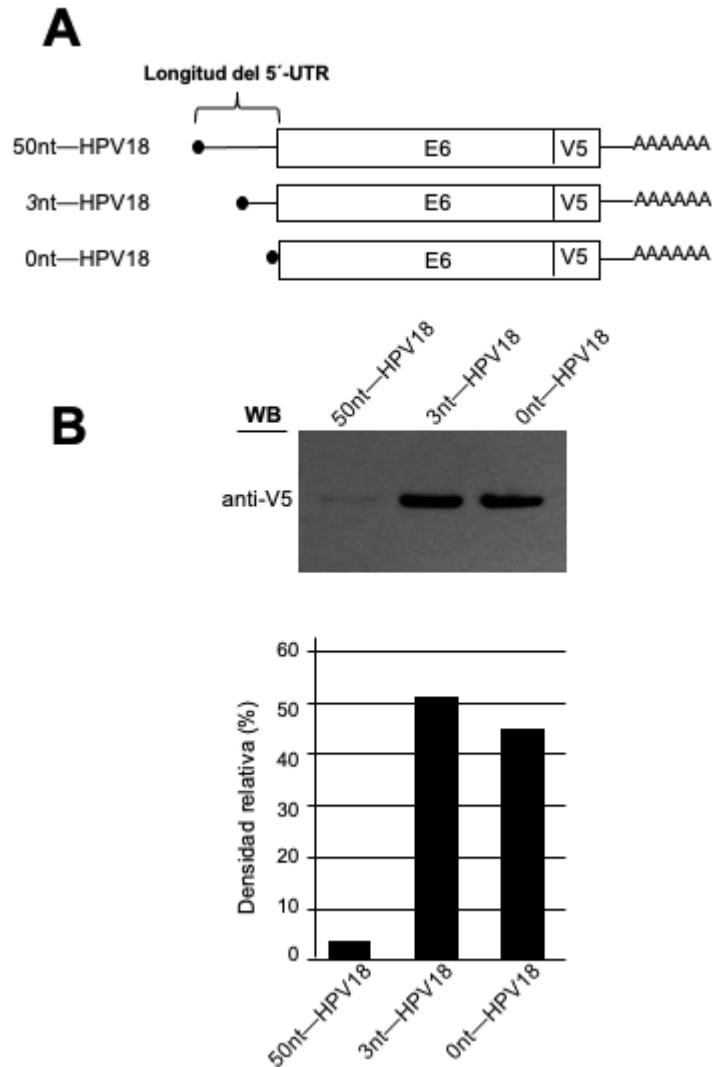


Figura 13. Los mRNAs de E6-V5 de VPH-18 se traducen eficazmente en lisados de germen de trigo. **A)** Esquema de las construcciones utilizadas para la traducción *in vitro*. Las construcciones contienen un 5'-UTR de 50, 3 y 0 nucleótidos respectivamente, y el ORF de E6 completo en fusión con el epítipo de V5. **B, arriba)** *Western blot* de las proteínas traducidas usando para la detección el anticuerpo anti-V5. **B, abajo)** densitometría del *Western blot*.

3. Los VPH de alto riesgo de la especie alfa 7 presentan una secuencia reguladora alrededor del codón de inicio.

Las regiones 5'-UTR juegan un papel importante en el control de la eficiencia de traducción de los mRNAs (Hinnebusch, 2016). Como lo demuestran los resultados anteriores, los VPHs 18, 39 y 45 presentan mRNAs con 5'-UTR extremadamente cortos o sin un 5'-UTR; este fenómeno nos llevó a pensar que la regulación de la traducción

en este tipo de mRNAs debería estar dentro del ORF de E6, río abajo del codón de inicio. Para probar esta hipótesis, estudiamos la influencia de la traducción de los nucleótidos alrededor del codón de inicio (AUG). Para estos experimentos, utilizamos la población de mensajeros de VPH-18 más frecuente y con mayor eficiencia de traducción, es decir, el 3nt-VPH18. Hicimos seis construcciones mutando el segundo codón del ORF de E6 (C2-3nt-VPH18), el cuarto codón (C4-3nt-VPH18), el segundo y el tercer codón (C2,3-VPH18), el nucleótido +4 ((+4)-3nt-VPH18) y los nucleótidos -1, -2 y -3 río arriba del con codón de inicio (US-3nt-VPH18), como control se utilizó el 3nt-VPH18 sin ninguna mutación (WT-3nt-VPH18, descrito en la Figura 11). Como se muestra en la Figura 14A y B arriba, se realizaron dos versiones de cada mutación, una con los primeros 45 nucleótidos de E6 en marco con FLuc, y la otra con el ORF completo de E6 en fase con el epítipo de V5. Como podemos observar en la Figura 14A abajo, la mutación C2 dio como resultado un efecto inhibitor drástico de la traducción del 82%; la mutación C2,3 llevó a una inhibición del 100% de la traducción; la mutación C4 condujo a una inhibición del 30%; la mutación del nucleótido (+4) inhibió la traducción en un 70%; y la mutación de los nucleótidos -1- -3 inhibieron la traducción aproximadamente un 90%. Utilizando el lisado de germen de trigo analizamos el impacto de dichas mutaciones con el contexto del ORF completo E6 (Figura 14B abajo). Todas las mutaciones tuvieron un efecto inhibitor; pero menos marcado que en el lisado de células HeLa, es decir, de 35% a 42% de inhibición de la traducción.

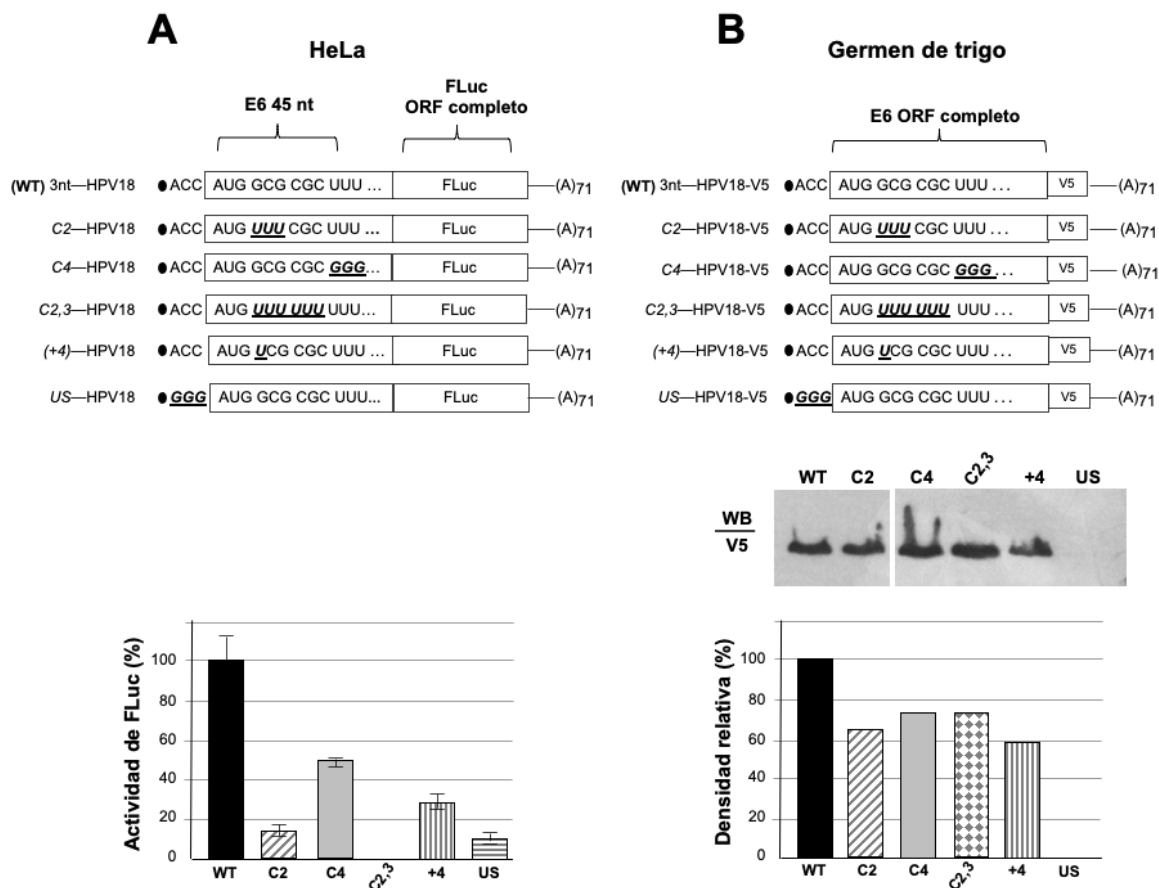


Figura 14. Mutaciones alrededor del codón de inicio AUG afectan la traducción del mRNA de E6 de VPH-18. *A, B*) Traducción *in vitro* de mRNAs de E6 de VPH-18 con un 5'-UTR de 3 nucleótidos. *A*) traducción *in vitro* utilizando lisados de HeLa y mRNAs con el ORF de E6 en marco con el ORF de FLuc. *B*) Traducción *in vitro* utilizando lisados de germen de trigo y mRNAs con el ORF completo de E6 en fase con el epítipo de V5. Como control positivo se utilizó la construcción E6 de VPH-18 con un 5'-UTR de 3 nucleótidos de la Figura 1 (aquí nombrado *WT 3nt-VPH18*). Se produjeron mutaciones en el segundo codón (*C2-VPH18*), en el cuarto codón (*C4-VPH18*), en el segundo y tercer codón (*C2,3-VPH18*), en el nucleótido +4 (*(+4)-VPH18*) y en los nucleótidos -1 -3 río arriba del codón de inicio AUG (*US-VPH18*). *A, arriba*) Actividad de FLuc. *B, centro*) Western blot de las proteínas traducidas utilizando el anticuerpo anti-V5. *B, abajo*) densitometría del western blot. Por simplicidad, las posiciones mutadas se indican como *C2, C4, C2,3, +4* y *US*.

Estos resultados mostraron que la secuencia contexto alrededor del codón de inicio del -3 al +12, es importante para la traducción del ORF de E6. Es interesante que los nucleótidos del 1 al 12 están conservados en los tipos virales 18, 39, 45, 59, 68, 70

y 97 de los VPH (Figura 15A). Estos tipos virales forman parte de un grupo monofilogenético del género alfa, especie 7 de los VPH de alto riesgo (Figura 15B). Por lo tanto, la secuencia ACCaugGCGCG (C/A) UUU, define un motivo novedoso alrededor del codón de inicio AUG para la traducción. A este motivo lo denominamos: iniciación de la traducción de mRNA sin líder (TILM, por sus siglas *Translation Initiation of Leaderless mRNAs*).

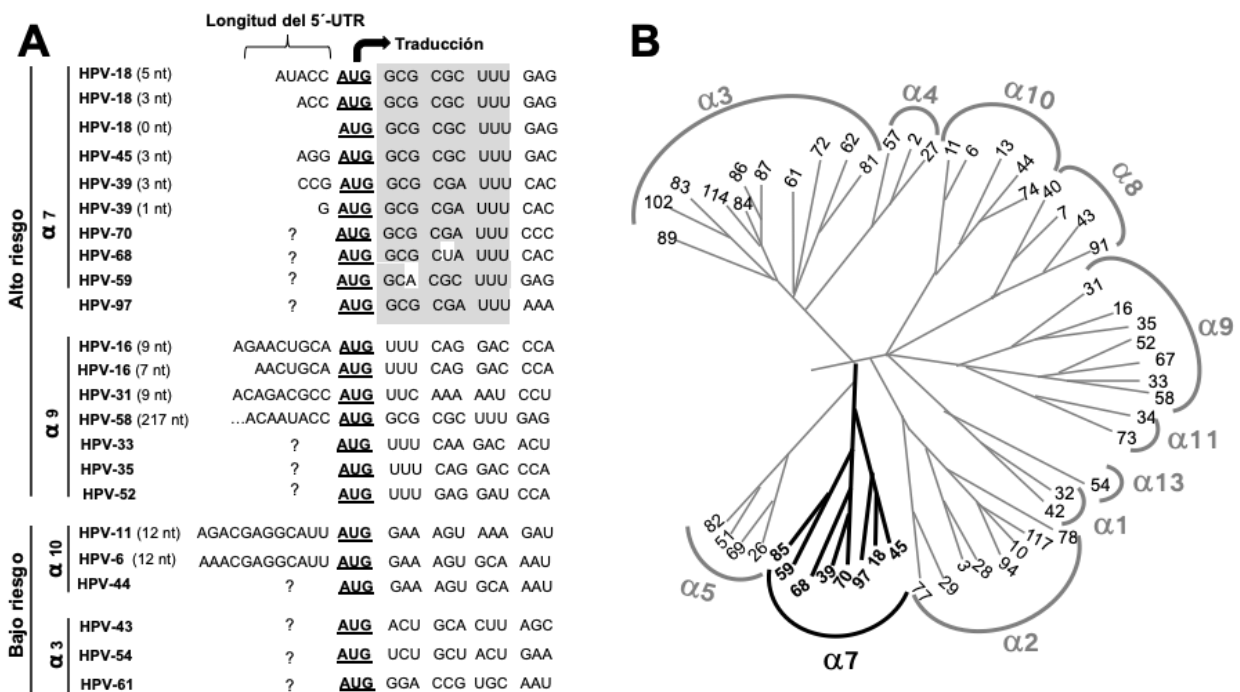


Figura 15. El ORF de E6 de los VPH de alto riesgo del género alfa, especie 7 comparten el motivo TILM que promueve la traducción. A) Comparación de secuencias de los mRNA de E6 de diferentes VPH de alto riesgo y de bajo riesgo. Todos los tipos virales del género alfa, especie 7, comparten una secuencia de nueve nucleótidos (*sombreado en gris*) río abajo del codón de inicio *AUG* (*resaltado en negritas y subrayado*), importante para llevar a cabo la traducción. El codón *AUG* que inicia la traducción se indica con una *flecha*. El motivo ACC AUG GCG CG (C/A) UUU se nombró TILM. La longitud de las 5'-UTR encontradas en tumores se encuentran entre paréntesis. El signo ? indica las 5'-UTR no caracterizadas. **B)** Relación filogenética entre los tipos de VPH de algunas especies (numeradas) del género alfa modificado de la referencia 21. Las especies 7 del género alfa están resaltadas en negritas.

Para comprobar la importancia funcional del motivo TILM, decidimos probarlo en un contexto diferente al de E6. Para esto clonamos el motivo TILM y una versión mutada de este en fase con el ORF de FLuc; realizamos traducción *in vitro* utilizando el lisado de reticulocitos de conejo. Como controles utilizamos el 0nt-Control y el 50nt-Control descritos en la Figura 11. Como se observa en la Figura 16B, el motivo TILM rescata casi al doble la traducción del 0nt-Control; además, al mutar este motivo la traducción decayó al mismo nivel que el control 0nt-Control. Estos resultados demuestran que el motivo TILM es importante para promover la traducción de un mRNA.

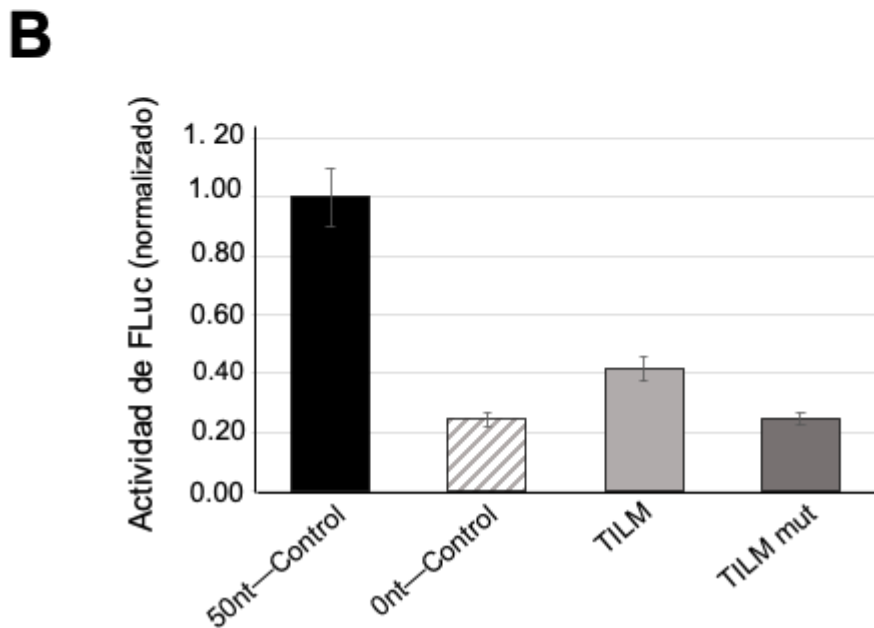
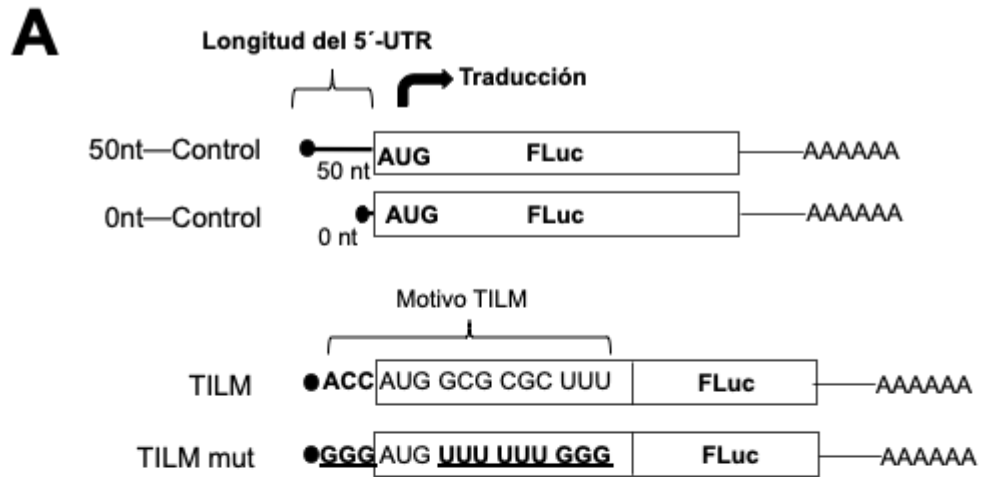


Figura 16. El motivo TILM promueve la traducción de ORF de FLuc. *A*) Esquema de las construcciones para la traducción *in vitro* utilizando el lisado de reticulocitos de conejo. Se indica la longitud del 5'-UTR de los controles (*50nt-Control* y *0nt-Control*); el codón inicio de la traducción AUG es indicado con una flecha. El motivo TILM se clonó en marco con el ORF de FLuc (*TILM*). También se clonó su versión mutada del motivo TILM (*TILM mut*). Las mutaciones del motivo están en negritas y subrayadas. *B*) Actividad de FLuc.

4. La expresión de E6 depende de los factores de traducción eIF4E y eIF4AI

La desregulación de la traducción conduce a una serie de enfermedades que incluyen el cáncer (Topisirovic, *et al.*, 2015). Diversos estudios han implicado a un gran número de componentes de la maquinaria traduccional en oncogénesis y progresión tumoral (Topisirovic *et al.* 2015). El complejo traduccional eIF4F es fundamental para la señalización oncogénica, ya que integra señales mitogénicas para mejorar la síntesis de factores pro-crecimiento y pro-supervivencia. Tanto eIF4E como eIF4AI son componentes del complejo eIF4F y contienen vínculos cruciales entre el inicio de la traducción y el desarrollo del cáncer (Pelletier *et al.* 2015; Shahbazian *et al.* 2014; Robichaud *et al.* 2018, Ali, 2017). Se ha reportado que el E6 de los VPH promueve la proliferación y la migración celular en células de cáncer de cuello uterino mediante la regulación positiva de la transcripción de eIF4E (Wang, 2013), y que eIF4E se sobreexpresa en prácticamente todos los carcinomas de cuello uterino (Wang, 2013). Por todo lo anterior, decidimos determinar la dependencia del mRNA de E6 de VPH-18 a diversos componentes de la maquinaria traduccional. Usando lisados de células HeLa primero analizamos la dependencia a la estructura de *cap* (m⁷GpppG), y a la cola poli(A). Para estos experimentos, utilizamos los mRNAs descritos en la Figura 17A. Por medio de transcripción *in vitro* sintetizamos estos mRNAs con una estructura de *cap* no funcional (ApppG) y una cola poli(A) o con un *cap* funcional (m⁷GpppG), pero sin una cola poli(A), y los utilizamos para ensayos de traducción *in vitro*. Podemos observar que la falta de *cap* funcional (barras negras) o de la cola poly(A) (barras grises) produjeron una reducción de cinco a diez veces la traducción en comparación con los mRNAs control con *uncap* funcional y una cola poli(A). Como era de esperarse, la falta de estos elementos también afectó la traducción de las construcciones controles (50nt-control y ont-control) (Figura 17B).

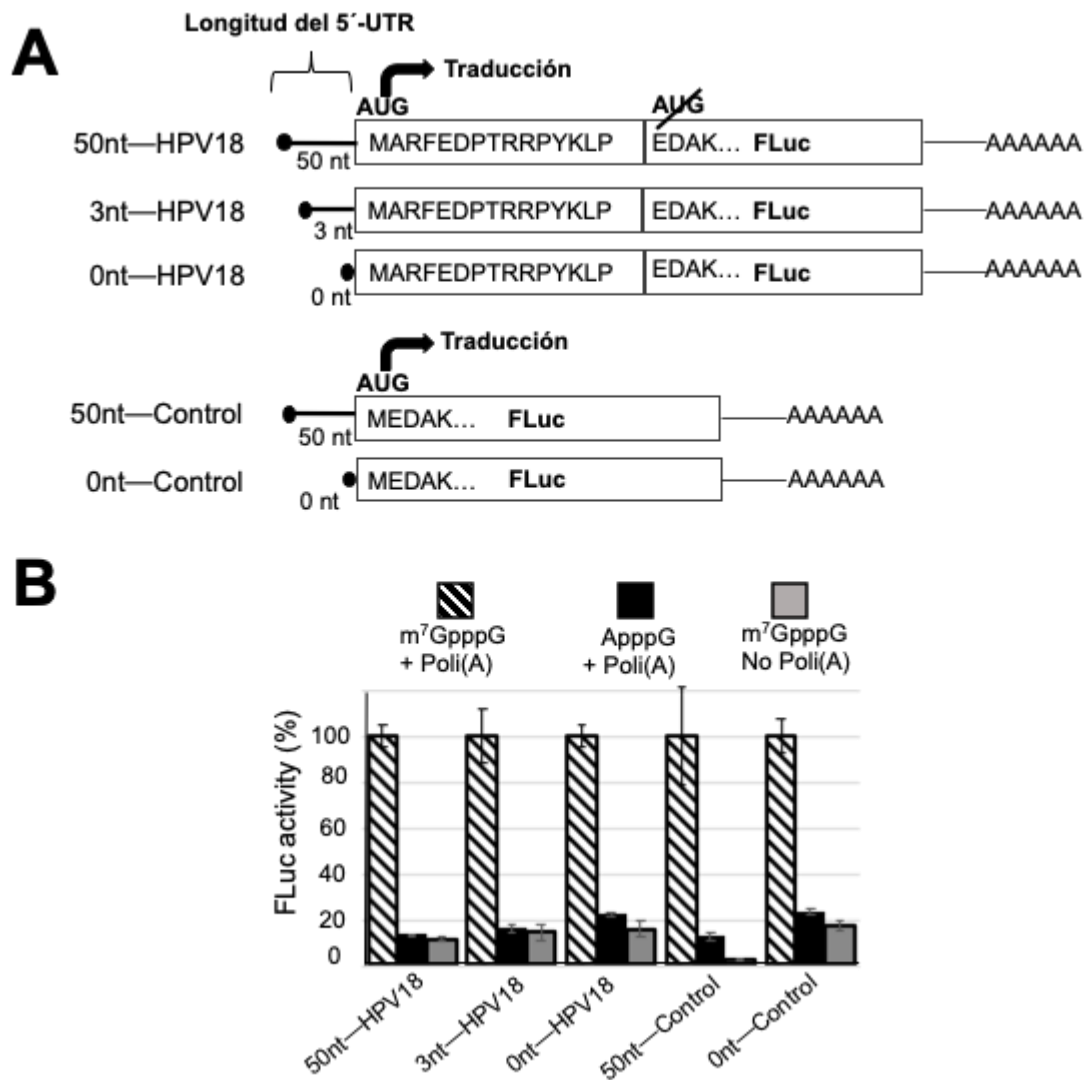


Figura 17. Los 5'-UTR de los mRNA de E6 de VPH18 promueven la traducción dependiente de *cap* y de poli(A). **A)** Esquema de todas las construcciones. Se indica la longitud del 5'-UTR de cada construcción, y el codón inicio de la traducción AUG se indica con una flecha. El 5'-UTR del 50nt-control es una secuencia arbitraria de 50 nucleótidos del vector pBluescript (Shahbazian, 2014). Las construcciones de VPH-18 contienen el 5'-UTR del mRNA de E6 de VPH-18. Se indican los aminoácidos del 1-15 de VPH-18 o VPH-16 en fase con el ORF de FLuc. **B)** Traducción *in vitro* de todas las construcciones en lisados celulares de HeLa. Todos los mRNAs se sintetizaron con: un *cap* funcional m^7GpppG y cola poli(A) (barras discontinuas); con un *cap* no funcional $ApppG$ y la cola poli(A) (barras negras); o con un *cap* funcional m^7GpppG y sin cola poli(A) (barras grises).

Estos experimentos se complementaron con ensayos de traducción en presencia de concentraciones crecientes de *cap* libre. Como control utilizamos el mRNA de E6 de VPH-16 que tiene un 5'-UTR de 7 nucleótidos, y que se demostró que se traduce de una manera dependiente de *cap* y de eIF4E (Stacey, 2000). En todos los mensajeros se observó una reducción de la traducción aproximadamente de cinco veces (Figura 18A).

Posteriormente, probamos la dependencia de la traducción a eIF4E y a la proteína de unión a eIF4E recombinante (4E-BP, por sus siglas en inglés *4E-binding proteins*) del mismo conjunto de mRNAs. La 4E-BP inhibe la traducción dependiente de *cap* al secuestrar a eIF4E. En la Figura 18B, se observa que 4E-BP produjo una disminución en la traducción del 80% al 90% de todos los mRNAs (barras negras). También realizamos traducción *in vitro* utilizando células *Knocked-down*(KD) de eIF4E (Yanagiya, 2012). Como se muestra en la Figura 18C, la falta de eIF4E produjo una reducción de los niveles de traducción del 60% al 80% en todos los mRNAs (barras negras) con respecto a los valores del control (barras discontinuas), es decir, los lisados celulares tratados con un shRNA (short hairpin RNA, SC) inespecífico.

Por último, nos preguntamos cuál es la participación de eIF4AI en la traducción de los mRNAs de VPH-18. Para abordar esta cuestión, realizamos traducción *in vitro* en presencia de concentraciones crecientes de hippuristanol, un inhibidor específico de eIF4AI y del inicio de la traducción dependiente de eIF4AI (Bordeleau, 2006). Como se observa en la Figura 18D, el hippuristanol inhibió la traducción de 3nt-VPH18, 0nt-VPH18 y 50nt-VPH18 hasta un 12% -14% en comparación con los valores control sin este compuesto. También el hippuristanol inhibió la traducción de los mRNAs 0nt-control y 7nt-VPH16, que se traducen dependientemente de *scanning*, proceso que requiere de eIF4A. Por el contrario, el control HCV- Control, cuya traducción es por medio de IRES y no depende de eIF4AI (Bordeleau, 2006) se tradujo al 60% del valor control sin hippuristanol. En conjunto, estos datos demuestran que la traducción de mRNA de E6 de VPH18 depende de la estructura del *cap*, de eIF4E y de eIF4AI.

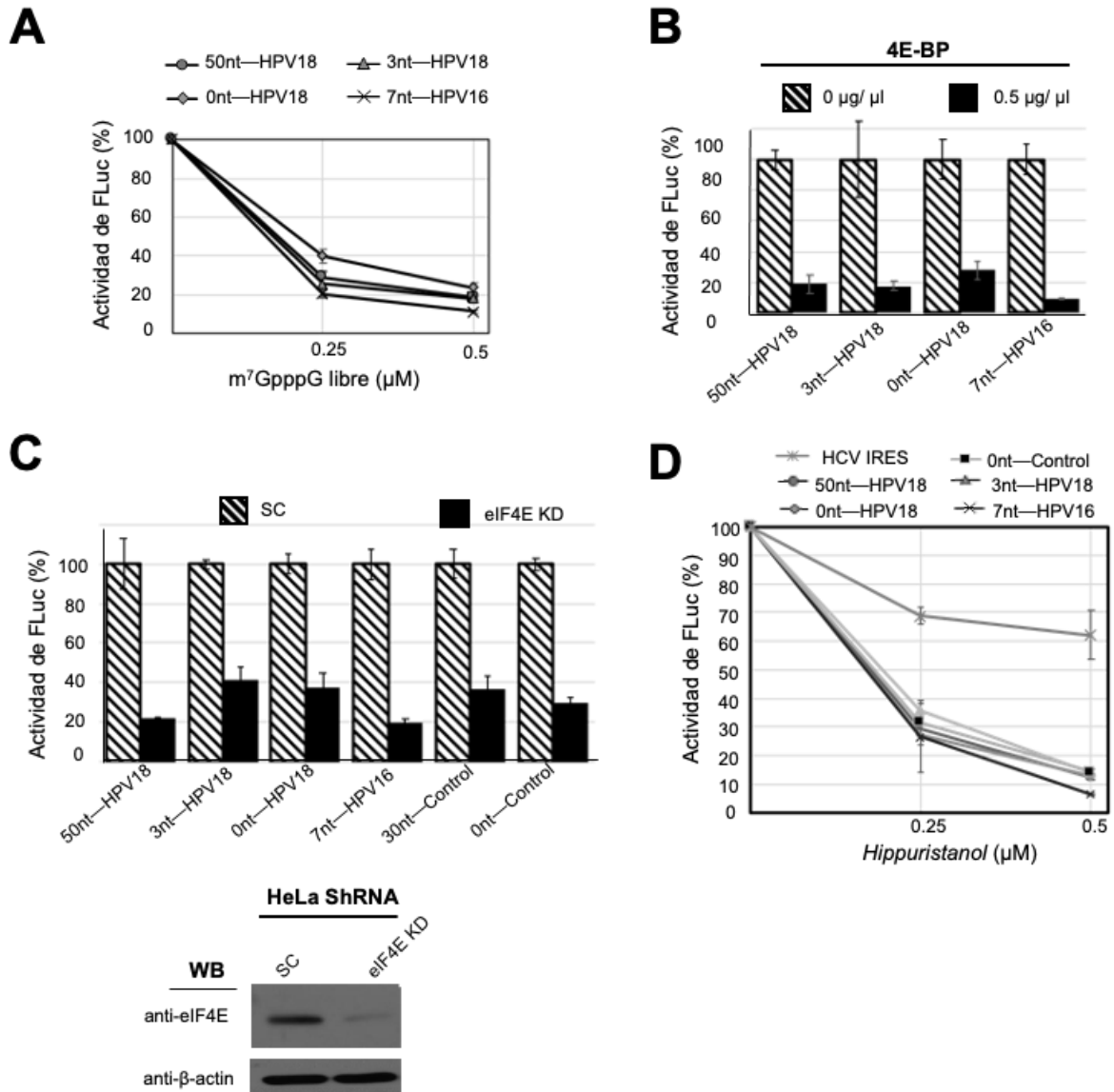


Figura 18. Los 5'-UTR de los mRNA de E6 de VPH18 promueven la traducción dependiente de *cap*, eIF4E y eIF4A. (A-D) Traducción *in vitro* de las construcciones representadas en la Figura 1 usando lisados de HeLa. En todas las gráficas se muestra la desviación estándar. (A y B) Traducción *in vitro* en presencia de concentraciones crecientes de *cap* libre m⁷GpppG (A) o del represor de la traducción 4E-BP (B). C) Traducción de los mRNA en lisados celulares tratados con *shRNA* inespecífico (SC) o con *eIF4E* (KD). (C, abajo) Western blot de lisados de células tratadas con *shRNA* inespecífico (SC) o con *eIF4E* (KD). D) traducción *in vitro* de los mRNA en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor de eIF4A *hippuristanol* que inhibe al eIF4A.

DISCUSIÓN

1. El mRNA de E6 de los VPH presenta 5'-UTR extremadamente cortos y un nuevo motivo.

En este estudio hemos demostramos que el mRNA de E6, de los virus del papiloma humano tipo 18, 39 y 45 presentan 5'-UTR extremadamente cortos, entre cero y tres nucleótidos. A los mRNAs con cero nucleótidos en su 5'-UTR se les nombra mRNAs sin líder (*leaderless* mRNAs). Además estos mRNAs contienen un nuevo motivo ACCaug (GCGCG(C/A)UUU, que promueve la traducción de la oncoproteína E6. Hemos nombrado a este nuevo motivo como iniciación de la traducción de mRNA sin líder (TILM, por sus siglas en inglés translation initiation *Translation Initiation of Leaderless mRNAs*).

La región 5'-UTR determina la eficiencia de la traducción, ya que es fundamental para la unión del ribosoma y para el scanning, además esta región es blanco de diversas proteínas de unión a RNA (Hinnebusch, 2016; Leppek *et al.* 2018). Por lo tanto, los mRNAs con 5'-URS de menos de 20 nucleótidos suelen traducirse deficientemente (Kozak, 1991 y Arribere *et al.*, 2013). Por un lado, en promedio la longitud del 5'-UTR es de 53 a 164 nucleótidos en eucariontes; por otro lado, los mRNA celulares sin líder son bastantes raros (Leppek *et al.*, 2018). Se han reportado mRNAs con 5'-UTR extremadamente cortos (es decir, menor o igual de 12 nucleótidos) en el parásito unicelular *Giardia lamblia* (Adam, 2000), la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Arribere *et al.*, 2013), y en *Entamoeba histolytica* (Bruchhaus *et al.*, 1993). En muy pocos genes humanos se han reportado mRNAs con 5'-UTR extremadamente cortos, y se ha observado que estos mRNAs presentan el elemento de iniciación de la traducción con 5'-UTRs cortas (TISU, *Translation Initiation of Short 5'-UTR*). Este elemento consta de 12 – 30 nucleótidos de longitud del 5'-UTR (Elfakes *et al.*, 2008, 2011). También se ha reportado que algunos mRNAs mitocondriales tienen 5'-UTRs con 5 nucleótidos (Gandin *et al.*, 2016; Montoya *et al.*, 1981). En virus, mRNAs sin líder o con 5'-UTR extremadamente cortos nunca han sido reportados *in vivo*. En este estudio hemos demostrado que en tumores de CC, los mRNAs de E6 de los VPH-18, 39 y 45 poseen 5'-UTR de cero a cinco nucleótidos. También hemos demostrado que

la traducción del mRNA de E6 del VPH-18, con un 5'-UTR de 3 nucleótidos de longitud, depende del motivo TILM, que rodea el codón de inicio AUG. Nuestros resultados encontrados en biopsias de tumores concuerdan con los resultados publicados previamente en líneas celulares. Wang y colaboradores detectaron un sitio de inicio de la transcripción en el nucleótido 55 que genera mRNAs con un 5'-UTR de 55 nucleótidos, en tejidos infectados con VPH-18 derivados de queratinocitos vaginales. En nuestros experimentos no pudimos detectar este inicio de la transcripción, muy probablemente debido al tipo de tejido analizado.

Debido a que los virus de papiloma humano tardan años, incluso décadas, en volverse tumorigénicos, tal vez la ausencia de 5'-UTR hace que el mRNA de E6 pase desapercibido por los mecanismos celulares de degradación dirigidos al 5'-UTR. Para compensar la falta de un 5'-UTR, el mRNA de E6 posee el motivo TILM que es una secuencia efectiva pero muy lenta para promover la síntesis de la proteína E6.

Es importante señalar que el motivo TILM está muy conservado en la especie 7 del género alfa de los VPHs (Figura 15). Por el contrario, los mRNAs de la especie 9 de género alfa (es decir, VPH-16, 31, 58, 11 y 6) contienen 5-UTRs más largos y no contienen el elemento TILM. Por tanto, la traducción del E6 de VPH-16 se realiza de manera dependiente de *cap* y de scanning (Stacey *et al.*, 2000).

Anteriormente, el elemento TISU, con la secuencia SAASauggGCGGC (S es G o C), se describió cerca del extremo 5' de los mRNAs de mamíferos sintetizados principalmente por promotores sin TATA. La única similitud entre los elementos TILM y TISU se encuentra aguas abajo del codón de inicio AUG. Interesantemente, TISU impulsa la traducción de mRNAs con 5'-UTRs muy cortos (con una media de 12 nucleótidos) (Elfakes *et al.*, 2008, 2011). El elemento TILM es el primer motivo descubierto que impulsa la traducción de mRNAs sin líder o con 5'-UTR extremadamente cortos en virus.

2. La traducción del mRNA de E6 de VPH-18 con un motivo TILM depende en gran medida de eIF4E y eIF4A1

En el presente estudio hemos demostrado que la traducción del mRNA de E6 de VPH-18 depende en gran medida de la cola poli(A), el *cap*, eIF4E, eIF4A1 y del motivo

TILM. Similar a TISU (Elfakes *et al.*, 20011), el elemento TILM impulsa la traducción del mRNA independiente del scanning. El factor de traducción eIF4A es necesario no sólo para el scanning, si no también para la unión inicial de eIF4F al extremo 5' de algunos mRNAs, lo que se denomina “activación del mensajero” (Merrick, 2015). Por ejemplo, la iniciación en EMCV IRES (que no implica scanning) requiere de eIF4A (Lomakin *et al.*, 2000). Recientemente se caracterizó la estructura tridimensional del complejo de preinicio de la traducción PIC 48S de humano. Se observó que durante el reclutamiento del mRNA por el ribosoma, eIF4A sólo se une a eIF3 del complejo PIC 48S, y su afinidad aumenta en presencia de eIF4G como parte del complejo eIF4F (Brito *et al.*, 2020). Observamos que la traducción del mRNAs de E6 de VPH-18 también depende de eIF4A, lo que es congruente con estos hallazgos. Por el contrario, la traducción de los mRNAs impulsados por TISU no depende de eIF4A (Elfakes *et al.*, 2011), lo que sugiere un mecanismo diferente para el inicio de la traducción. Como se reportó para la traducción mediada por TISU (Elfakes *et al.*, 2011), nosotros observamos que la traducción del mRNA de E6 de VPH-18 también depende en gran medida de la estructura del *cap* y de eIF4E. Una fuerte dependencia por el complejo eIF4F está respaldada por la dependencia de la cola poli(A) y de PABP, cuya función principal es estabilizar la asociación del complejo eIF4G con el *cap* (Kahvejian *et al.*, 2005).

El reconocimiento eficiente del codón de inicio AUG requiere de un 5'-UTR de 12 a 20 nucleótidos (Pestova *et al.*, 2002; Pisarev *et al.*, 2008) porque cuando el sitio A de la subunidad ribosomal 40S se coloca en el codón AUG, hace contacto con 17 nucleótidos aguas arriba y 11 nucleótidos aguas abajo del codón AUG (Pisarev *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2020). Por lo tanto, un líder de menos de 12 nucleótidos colocaría al *cap* en el canal de salida del mRNA de la subunidad 40S, y no quedaría completamente enganchado por los nucleótidos aguas arriba del AUG, lo que lo volvería algo inestable (Hinnebusch, 2017). En consecuencia, se ha observado en líneas celulares que los 5'-UTRs (de 1 a 5 nucleótidos de largo) impulsan la traducción mediante mecanismos alternativos, como la unión del ribosoma ensamblado 80S en el extremo 5' del mRNA, o por eIF2-, o iniciación de la traducción asistida por eIF5B (Pestova *et al.*, 2002; Akulich *et al.*, 2016; Andreev *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2016). Por lo tanto, los mRNAs

de E6 de los VPH-18, 39 y 45 deben de seguir alguno de estos mecanismos alternativos de traducción. Debido a su fuerte dependencia por eIF4F, lo más probable es que la traducción de los mRNAs de E6 se inicie mediante la unión de la subunidad 40S en lugar del ribosoma 80S. Sin embargo, podría haber una especie de scanning hacia atrás para permitir que el codón de inicio se acomode en el sitio P de la subunidad 40S.

3. La síntesis de E6 establece nuevos circuitos oncogénicos de retroalimentación con la maquinaria traduccional

El factor de transcripción eIF4E se sobreexpresa en gran medida en lesiones precancerosas y carcinomas de cuello uterino causados por VPH (Robichaud *et al.*, 2019; Ali, 2017 y Asimomytis *et al.*, 2019). La sobreexpresión de eIF4E puede conducir a la tumorigénesis porque mejora la eficiencia de traducción de los mRNAs altamente sensibles a la concentración de eIF4E. Muchos de estos mRNAs codifican para proteínas que promueven la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis, la metástasis, la angiogénesis y la resistencia a la apoptosis, como c-MYC, VEGF, beta-catenina, ciclina D1, ornitina. Descarboxilasa y BCL-XL (Robichaud *et al.*, 2018; De Bendetii *et al.*, 2004 y Mamane *et al.*, 2007).

Dado que la oncoproteína E6 VPH promueve la proliferación y migración de las células de cáncer de cuello uterino a través de la regulación positiva de la transcripción de eIF4E (Wang, 2013), nuestros resultados sugieren un nuevo ciclo de retroalimentación oncogénica positiva donde E6 promueve la transcripción de eIF4E y eIF4E, a su vez, regula a la alza la traducción de E6 (Figura 19 A). Se ha observado que la oncoproteína E6 de los VPH de alto riesgo, activan la señalización del complejo mTOR 1 (mTORC1), la traducción dependiente de *cap* (Spangle *et al.*, 2010, 2012) y la cascada de mTOR, la cual desencadena la aparición de carcinomas cervicales inducidos por VPH (Callejas-Valera *et al.*, 2016). Estos datos sugieren la existencia de un segundo ciclo oncogénico de retroalimentación positiva que involucra a eIF4E, E6, y a la cascada de mTOR (Figura 19 B). Tras diversos estímulos, esta cascada hiperfosforila al inhibidor de eIF4E, la proteína 4E-BP, lo que da como resultado un aumento en la actividad de eIF4E y una mayor traducción de E6, que a su vez activa la señalización de mTORC1 una vez más. Dado que la cascada de mTOR está regulada al

alza en los carcinomas de cuello uterino, y en el 80% de los cánceres de endometrio (Feng *et al.*, 2009 y Molinolo *et al.*, 2012), los bucles que involucran a E6 y eIF4E aumentan aún más en estos cánceres. La interacción establecida de E6 con el supresor de tumores p53 (Ghittoni *et al.*, 2010 y Robichaud *et al.*, 2018), revela la aparición de un tercer ciclo de retroalimentación oncogénica dependiente de eIF4E en tumores. Mientras que en las células normales p53 se une a la oncoproteína c-MYC para evitar la activación transcripcional de eIF4E, en las células transformadas con E6 se desencadena transitoriamente la degradación de p53. De esta manera, la regulación a la alza de la traducción de E6 por la sobreexpresión de eIF4E mejora la degradación de p53, lo que a su vez conduciría a la activación transcripcional de eIF4E por c-MYC, lo que conduciría a una mayor regulación al alza de la traducción de E6 (Figura 19 C). La ausencia de p53 juega un papel importante para la traducción de E6. En células normales se ha observado que p53 desfosforila a 4E-BP, provocando un aumento de la unión de 4E-BP a eIF4E, bloqueando así la traducción dependiente de cap. La degradación de p53 por E6 permite un aumento en la traducción de E6 (Figura 19 D) (Constantinou *et al.*, 2007).

Por otra parte, la integración del genoma viral a las células huésped es un fenómeno que se observa en la mayoría de los cánceres cervicouterinos. La expresión de las oncoproteínas E6 y E7 tiene como consecuencia una mala segregación cromosómica y un alto grado de recombinación. Se han reportado transcritos de las oncoproteínas E6 y E7 con integración de DNA celular en proteínas virales E1 y E2. La integración del genoma celular en esta posición juega un papel importante en la regulación de las oncoproteínas E6 y E7. Se ha demostrado que la región promotora de los VPH contienen sitios de unión a E2 y la unión de E2 en esta región reprime la transcripción viral. Por lo tanto, la eliminación de la expresión de E2 conduce a un aumento en expresión de E6 y E7 (Figura 19 E) (Wentzensen *et al.*, 2002 y 2004; Vinther *et al.*, 2005; Lace *et al.*, 2011; Jeon *et al.*, 1995).

En general, este trabajo revela que la traducción de E6 parece desempeñar un papel central en la interacción entre eIF4E, E6, mTOR, c-MYC y p53 para promover fenotipos tumorigénicos en infecciones por VPH de alto riesgo.

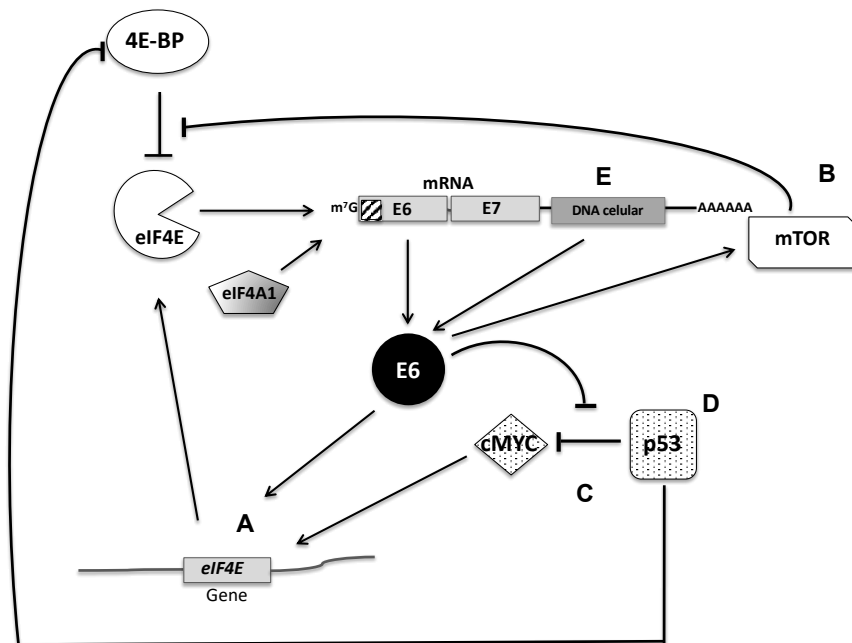


Figura 19. Ciclos de retroalimentación oncogénica positiva que involucran a E6 y a eIF4E. **A)** Se forma un ciclo cuando E6 promueve la carcinogénesis a través de la regulación al alza de la transcripción de *eIF4E* y *eIF4E*, a su vez, regula al alza la traducción del *mRNA* de E6. **B)** Se forma un segundo ciclo por activación directa de la cascada mTOR por E6. Esta cascada promueve la hiperfosforilación de 4E-BP, inhibidor de *eIF4E*. Las hiperfosforilación de 4E-BP liberan *eIF4E*, aumentando su actividad. **C)** E6, *c-MYC* y *p53* forman un tercer ciclo. En condiciones normales, *p53* se une a la oncoproteína *c-MYC*, un factor transcripcional que activa la transcripción del gen *eIF4E*. El complejo *p53—c-MYC* previene la actividad transcripcional de *c-MYC*. En células infectadas con VPH, E6 degrada a *p53* lo que conduce a una regulación al alza de la activación transcripcional de *eIF4E* por *c-MYC*. *eIF4A1* promueve la síntesis de E6. **D)** La ausencia de *p53* favorece la traducción de E6, bloqueando la regulación negativa de la traducción por parte de 4E-BP. **E)** La formación de mRNA quiméricos de las oncoproteínas con DNA celular promueve un aumento en la expresión de E6 y E7. Las proteínas involucradas en la traducción están sombreadas en gris. Un cuadrado con rayas diagonales muestra el motivo TILM.

CONCLUSIONES

- En biopsias de tumor de cáncer cervicouterino el mRNA de E6 de VPH18 contiene 5'-UTRs extremadamente cortas entre 0 y 5 nucleótidos.
- La población de mRNAs de E6 de VPH18 con 3 nucleótidos en su 5'-UTRs es la más representada.
- Los VPH de alto riesgo de la especie 7 contienen la secuencia reguladora TISU alrededor del codón de inicio.
- La traducción de E6 de VPH18 es dependiente del *cap*, eIF4E y eIF4A.
- La oncoproteína E6 desempeña un rol central en el ciclo de retroalimentación oncogénica entre eIF4E, E6, mTOR, c-MYC y p53.

PERSPECTIVAS

En este trabajo encontramos un nuevo motivo dentro del marco de lectura del mRNA de E6, el cual regula su traducción, nosotros lo nombramos TILM. Observamos que al mutar este motivo la traducción de E6 se ve afectada. Al probar este motivo en un contexto diferente al de E6, observamos que la traducción también se ve afectada. Por lo tanto, como perspectiva de este trabajo, se puede buscar proteínas de unión a este motivo las cuales promuevan o estabilicen la traducción de E6.

Por otra parte, observamos que E6 forma un bucle de retroalimentación positiva que permite su traducción constante. Como observamos que al mutar este motivo la traducción de E6 disminuye; este motivo se podría usar como blanco terapéutico para tratar neoplasias malignas que involucren a E6.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam RD (2000) The Giardia lamblia genome. *Int. J. Parasitol.* 30:475-484.

Ali MU, Rahman MS, Jia Z, & Jiang C (2017) Eukaryotic translation initiation factors and cancer. *Tumor Biol.* 39:1010428317709805.

Asimomytis A, *et al.* (2016) mTOR downstream effectors, 4EBP1 and eIF4E, are overexpressed and associated with HPV status in precancerous lesions and carcinomas of the uterine cervix. *Oncol. Lett.* 12:3234-3240.

Arribere JA & Gilbert WV (2013) Roles for transcript leaders in translation and mRNA decay revealed by transcript leader sequencing. *Genome Res.* 23(6):977-987.

Beck HJ, Moll I. (2018) Leaderless mRNAs in the Spotlight: Ancient but Not Outdated! *Microbiol Spectr.* Jul;6(4).

Berkel HJ, Turbat-Herrera EA, Shi R, de Benedetti A (2001) Expression of the translation initiation factor eIF4E in the polyp- cancer sequence in the colon. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 663 – 666.

Bernard, H. *et al.* (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401:70-79.

Bordeleau ME, *et al.* (2006) Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nature Chem. Biol.* 2:213 - 220.

Brass N, Heckel D, Sahin U, Pfreundschuh M, Sybrecht GW, Meese E (1997) Translation initiation factor eIF-4gamma is encoded by an amplified gene and induces an immune response in squamous cell lung carcinoma. *Hum Mol Genet* 6: 33 – 39.

Brito Querido J, *et al.* (2020) Structure of a human 48S translational initiation complex. *Science* 369:1220-1227.

Bruchhaus I, Leippe M, Lioutas C, & Tannich E (1993) Unusual gene organization in the protozoan parasite Entamoeba histolytica. *DNA Cell Biol.* 12:925-933.

Carroll, M., & Borden, K. L. (2013). The oncogene eIF4E: using biochemical insights to target cancer. *J Interferon Cytokine Res.* 33(5), 227–238.

Callejas-Valera JL, *et al.* (2016) mTOR inhibition prevents rapid-onset of carcinogen-induced malignancies in a novel inducible HPV-16 E6/E7 mouse model. *Carcinogenesis* 37:1014-1025.

Chirenje ZM & Guzha BT (2020) Cervical cancer. *World Cancer Report. Cancer research for cancer prevention*, eds Wild CP, Weiderpass E, & Stewart BW (International Agency for Research on Cancer. World Health Organization, Lyon), pp 394-402.

- Constantinou C, Clemens MJ. (2007) Regulation of translation factors eIF4GI and 4E-BP1 during recovery of protein synthesis from inhibition by p53. *Cell Death Differ.* Mar;14(3):576-85.
- Crow JM. (2012) HPV: The global burden. *Nature.* Aug 30;488(7413):S2-3.
- de Villeres EM. et al. (2004) classification of papillomaviruses. *Virology*, 324:17-27.
- Dever, T.; Dinman, J.; Green, R. (2018) Translation elongation and recoding in eukaryotes. *CSHL Press.* Pág. 1-20.
- De Benedetti A & Graff JR (2004) eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 23:11.
- Doorbar, J. (2005) The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol.*, 32 (Suppl.1):S7-15.
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine.* Nov 20;30 Suppl 5:F55-70.
- Duensing S & Munger K. (2004) Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer.* 109:157-162.
- Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom S, Gonzalez S, Crum CP, Munger K. (2000) The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10002-10007.
- Eberle J, Krasagakis K, Orfanos CE (1997) Translation initiation factor eIF4A1 mRNA is consistently overexpressed in human melanoma cells *in vitro*. *Int J Cancer* 71: 396 – 401.
- Elfakes R & Dikstein R (2008) A translation initiation element specific to mRNAs with very short 5'UTR that also regulates transcription. *PLoS One* 3:e3094.
- Elfakes R, et al. (2011) Unique translation initiation of mRNAs-containing TISU element. *Nucleic Acid Res.* 39:7598–7609.
- Feng W, Duan X, Liu J, & Brown RE (2009) Motphoproteomic evidence of constitutively activated and overexpressed mTOR pathway in cervical carcinoma and high grade intraepithelial lesions. *Int. J. Clin. Exp. Pathol* 2:249-260.
- Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Plummer M, Franceschi S. (2012) Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine.* 30 Suppl 5:F12–23.
- Gandin V, et al. (2016) nanoCAGE reveals 5' UTR features that define specific modes of translation of functionally related MTOR-sensitive mRNAs. *Genome Res.* 26:636-648.
- Gebauer F, Corona DF, Preiss T, Becker PB, Hentze MW. (1999) Translational control of dosage compensation in Drosophila by Sex-lethal: cooperative silencing via the 5' and 3' UTRs of msl-2 mRNA is independent of the poly(A) tail. *EMBO J.* Nov 1;18(21):6146-54.

Graham, S.V. (2010) Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiol.*, 5:1493–1506.

Graham SV (2017) The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin. Sci. (Lond)* 131(17):2201-2221.

Guan XY, Sham JS, Tang TC, Fang Y, Huo KK, Yang JM (2001) Isolation of a novel candidate oncogene within a frequently amplified region at 3q26 in ovarian cancer. *Cancer Res* 61: 3806 – 3809.

Harden ME, Munger K. (2017) Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Rev Mutat Res.* Apr-Jun;772:3-12.

Hinnebusch AG, Ivanov IP, Sonenberg N. (2016) Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science.* Jun 17;352(6292):1413-6.

Hinnebusch AG (2017) Structural insights into the mechanism of scanning and start codon recognition in eukaryotic translation initiation. *Trends Biochem. Sci.* 42:589-611.

Hayashi S, Nishimura K, Fukuchi-Shimogori T, Kashiwagi K, Igarashi K (2000) Increase in cap- and IRES-dependent protein synthesis by overproduction of translation initiation factor eIF4G. *BiochemBiophys ResCommun* 277: 117 – 123.

Hildesheim A, *et. al.* (2007) Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *JAMA.* 298:743–753.

Hinnebusch, A.G., (2014). The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annual review of biochemistry* , 83(January), pp.779–812.

Hong S, Laimins LA. (2013) Regulation of the life cycle of HPVs by differentiation and the DNA damage response. *Future Microbiol.* 8:1547–1557.

Jan E, Mohr I, & Walsh D (2016) A cap-to-tail guide to mRNA translation strategies in virus-infected cells. *Annu. Rev. Virol.* 3(1):283-307.

Jabbar SF, Park S, Schweizer J, Berard-Bergery M, Pitot HC, Lee D, Lambert PF. (2012) Cervical cancers require the continuous expression of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein even in the presence of the viral E6 oncoprotein. *Cancer Res.* 72:4008-4016.

Jackson, R.J., Hellen, C.U.T. & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(2), pp.113–127.

Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. (1995) Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol.* May;69(5):2989-97.

Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE, Bouchard C, Mao C, Mehlsen J, Moreira ED Jr, Ngan Y, Petersen LK, Lazcano-Ponce E, Pitisuttithum P, Restrepo JA, Stuart G, Woelber L, Yang YC, Cuzick J, *et.al.* (2015) A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *N Engl J Med.* 372:711–723.

Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, &Sonenberg N (2005) Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev.* 19:104-113.

Kombe AJ, Li B, Zahid A, Mengist HM, Bounda GA, Zhou Y, Jin T. (2021) Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation. *Front Public Health.* Jan 20;8:552028.

Kozak M (1991) A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Expr.* 1:111-115.

Lace MJ, Anson JR, Klussmann JP, *et. al.* (2011) Human papillomavirus type 16 (HPV-16) genomes integrated in head and neck cancers and in HPV-16-immortalized human keratinocyte clones express chimeric virus-cell mRNAs similar to those found in cervical cancers. *J Virol.* 85(4):1645-1654.

Levine AJ, Oren M. (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer.* Oct;9(10):749-58.

Leppek K, Das R, &Barna M (2018) Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19:158–174.

Lin L, Holbro T, Alonso G, Gerosa D, Burger MM (2001) Molecular interaction between human tumor marker protein p150, the largest subunit of eIF3, and intermediate filament protein K7. *J Cell Biochem* 80: 483 – 490.

Lobo MV, Martin ME, Perez MI, Alonso FJ, Redondo C, Alvarez MI, Salinas M (2000) Levels, phosphorylation status and cellular localization of translational factor eIF2 in gastrointestinal carcinomas. *Histochem J* 32: 139 – 150.

Lomakin IB, Hellen CU, &Pestova TV (2000) Physical association of eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) with eIF4A strongly enhances binding of eIF4G to the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and is required for internal initiation of translation. *Mol. Cell. Biol.* 20(16):6019-6029.

Luna-Aguirre CM, Reyes-Cortés LM, Torres-Grimaldo AA, Karr-de-León SF, *et. al.* (2018) Prevalence of human papillomavirus types in North and Central regions of Mexico. *Epidemiol Infect.* Oct;146(13):1724-1730.

Mamane Y, *et al.* (2007) Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. *PLoS One* 2:13.

Merrick WC, Pavitt GD. (2018) Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Dec 3;10(12):a033092.

- Merrick WC (2015) eIF4F: A retrospective. *J. Biol. Chem.* 290:24091-24099.
- Mignone, F. et al. (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* 3: 1-10
- Molinolo AA, et al. (2012) mTOR as a molecular target in HPV-associated oral and cervical squamous carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 18:2558-2568.
- Montoya J, Ojala D, &Attardi G (1981) Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature* 290:465–470.
- Mühr LSA, Eklund C, Dillner J. (2018) Towards quality and order in human papillomavirus research. *Virology*.Jun;519:74-76.
- Nupponen NN, Porkka K, Kakkola L, Tanner M, Persson K, Borg A, Isola J, Visakorpi T (1999) Amplification and overexpression of p40 subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 in breast and prostate cancer. *Am J Pathol*154: 1777 – 1783.
- Nygaard M, et. al. (2015) Evaluation of the Long-Term Anti-Human Papillomavirus 6 (HPV6), 11, 16, and 18 Immune Responses Generated by the Quadrivalent HPV Vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* 22:943–948.
- Ostor AG (1993) Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol.* 12:186-192.
- Organización Mundial de la Salud (2020) MÉxico source:Globocan 2020. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>
- Pelletier J, Graff J, Ruggero D, &Sonenberg N (2015) Targeting the eIF4F translation initiation complex: a Critical nexus for cancer development. *Cancer Res.* 75:250-263.
- Pelletier J, Sonenberg N. (2019) The Organizing Principles of Eukaryotic Ribosome Recruitment. *Annu Rev Biochem.* Jun 20;88:307-335.
- Pestova TV &Kolupaeva VG (2002) The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev.* 16:2906-2922.
- Pincheira R, Chen Q, Zhang JT (2001) Identification of a 170-kDa protein over-expressed in lung cancers. *Br J Cancer* 84: 1520 – 1527.
- Pisarev AV, Kolupaeva VG, Yusupov MM, Hellen CU, &Pestova TV (2008) Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes. *EMBO J.* 27:1609-1621.
- Pesole, G. et al. (2001) Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene* 276: 73-81
- Robichaud N, Sonenberg N, Ruggero D, Schneider RJ. (2019) Translational Control in Cancer. *Cold Spring HarbPerspectBiol.*Jul 1;11(7):a032896.

Romanczuk H, Thierry F, & Howley PM (1990) Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J. Virol.* 64:2849-2859.

Rothe M, Ko Y, Albers P, Wernert N (2000) Eukaryotic initiation factor 3 p110 mRNA is overexpressed in testicular seminomas. *Am J Pathol* 157: 1597 – 1604.

Schiffman M, Castle PE. (2003) Human Papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med.* 127:930-934.

Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007; 370:890–907.

Shahbazian D, Pelletier J, Svitkin Y, Hershey JWB, & Parsyan A (2014) RNA helicases and their cofactors *Translation and its regulation in cancer biology and medicine*, ed Parsyan A (Springer, Heidelberg, New York, London).

Shuda M, Kondoh N, Tanaka K, Ryo A, Wakatsuki T, Hada A, Goseki N, Igari T, Hatsuse K, Aihara T, Horiuchi S, Shichita M, Yamamoto N, Yamamoto M (2000) Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 20: 2489 – 2494.

Sonenberg, N. & Hinnebusch, A.G. (2009) Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: *Mechanisms and Biological Targets.* Cell, 136(4), pp.731–745.

Schneider-Gädicke A & Schwarz E (1986) Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J.* 5:2285-2292.

Shuda M, Kondoh N, Tanaka K, Ryo A, Wakatsuki T, Hada A, Goseki N, Igari T, Hatsuse K, Aihara T, Horiuchi S, Shichita M, Yamamoto N, Yamamoto M (2000) Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 20: 2489 – 2494.

Smotkin D & Wettstein FO (1986) Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83:4680-4684.

Stacey SN, *et al.* (2000) Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA. *J. Virol.* 74:7284–7297.

Spangle JM & Munger K (2010) The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein activates mTORC1 signalling and increases protein synthesis. *J. Virol.* 84:9398-9407.

Spangle JM, Ghosh-Choudhury N, & Munger K (2012) Activation of capdependent translation by mucosal human papillomavirus E6 proteins is dependent on the integrity of the LXXLL binding motif. *J. Virol.* 86:7466-7472.

Svitkin Y & Sonenberg N (2004) An Efficient System for Cap- and Poly(A)- Dependent Translation *in vitro.* *Methods Mol. Biol.* 257:155-170.

- Tommasino M. (2014) The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 26:13-21.
- Thierry, F. (2009) Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* 384: 375-379
- Thierry F, Heard JM, Dartmann K, & Yaniv M (1987) Characterization of a transcriptional promoter of human papillomavirus 18 and modulation of its expression by simian virus 40 and adenovirus early antigens. *J. Virol.* 61:134-142.
- Topisirovic I, Sonenberg N. (2015) Translation and cancer. *Biochim Biophys Acta.* Jul;1849(7):751-2.
- Vinther J, Rosenstjerne MW, Kristiansen K, Norrild B. (2005) The 3' region of human papillomavirus type 16 early mRNAs decrease expression. *BMC Infect Dis.* Oct 14;5:83.
- Wang S, Rosenwald IB, Hutzler MJ, Pihan GA, Savas L, Chen JJ, Woda BA (1999) Expression of the eukaryotic translation initiation factors 4E and 2alpha in non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* 155: 247 – 255.
- Wang X, Meyers C, Wang HK, Chow LT, & Zheng, Z.M. (2011) Construction of a full transcription map of human papillomavirus type 18 during productive viral infection. *J. Virol.* 85:8080–8092.
- Wang S, *et al.* (2013) HPV E6 induces eIF4E transcription to promote the proliferation and migration of cervical cancer. *FEBS Lett.* 587:690-697.
- Wentzensen N, Ridder R, Klaes R, Vinokurova S, Schaefer U, Doeberitz Mv. (2002) Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions. *Oncogene.* Jan 17;21(3):419-26.
- Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. (2004) Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res.* Jun 1;64(11):3878-84.
- Yanagiya A, *et al.* (2012) Translational homeostasis via the mRNA cap-binding protein, eIF4E. *Mol. Cell* 46:847-858.
- Yang A, Jeang J, Cheng K, Cheng T, Yang B, Wu TC, Hung CF. (2016) Current state in the development of candidate therapeutic HPV vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 1–19.
- Yang X, Zhong W, Cao R. (2020) Phosphorylation of the mRNA cap-binding protein eIF4E and cancer. *Cell Signal.* Sep;73:109689.
- Zheng, Z.M. and Mbacker, C.C. (2006) Papillomavirus genome structure, expression and post-transcriptional regulation. *Front. Biosci.* 11: 2286-2302.
- Zur Hausen, H. (2009) Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, 384: 260.

Anexo. (Artículo científico para la obtención del grado)

High-risk human papillomavirus-18 uses an mRNA sequence to synthesize oncoprotein E6 in tumors

Alejandra García^a, Giovanna Maldonado^a, José L. González^b, Yuri Svitkin^c, David Cantú^d, Alejandro García-Carranca^{b,e}, Nahum Sonenberg^c, and Greco Hernández^{a,1}

^aUnit of Biomedical Research on Cancer, Laboratory of Translation and Cancer, National Institute of Cancer (Instituto Nacional de Cancerología), Mexico City 14080, Mexico; ^bUnit of Biomedical Research on Cancer, Laboratory of Virus and Cancer, National Institute of Cancer (Instituto Nacional de Cancerología), Mexico City 14080, Mexico; ^cDepartment of Biochemistry and Goodman Cancer Research Centre, McGill University, Montreal H3A 1A3, QC, Canada; ^dUnit of Biomedical Research on Cancer, Division of Basic Research, National Institute of Cancer, Mexico City 14080, Mexico; and ^eInstitute of Biomedical Research, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

Edited by Peter M. Howley, Harvard Medical School, Boston, MA, and approved August 17, 2021 (received for review May 4, 2021)

Cervical cancer is the fourth most common cause of cancer in women worldwide in terms of both incidence and mortality. Persistent infection with high-risk types of human papillomavirus (HPV), namely 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68, constitute a necessary cause for the development of cervical cancer. Viral oncoproteins E6 and E7 play central roles in the carcinogenic process by virtue of their interactions with cell master proteins such as p53, retinoblastoma (Rb), mammalian target of rapamycin (mTOR), and c-MYC. For the synthesis of E6 and E7, HPVs use a bicistronic messenger RNA (mRNA) that has been studied in cultured cells. Here, we report that in cervical tumors, HPV-18, -39, and -45 transcribe E6/E7 mRNAs with extremely short 5' untranslated regions (UTRs) or even lacking a 5' UTR (i.e., zero to three nucleotides long) to express E6. We show that the translation of HPV-18 E6 cistron is regulated by the motif ACCaugGCGCG(C/A)UUU surrounding the AUG start codon, which we term Translation Initiation of Leaderless mRNAs (TILM). This motif is conserved in all HPV types of the phylogenetically coherent group forming genus alpha, species 7, which infect mucosal epithelia. We further show that the translation of HPV-18 E6 largely relies on the cap structure and eIF4E and eIF4AI, two key translation initiation factors linking translation and cancer but does not involve scanning. Our results support the notion that E6 forms the center of the positive oncogenic feedback loop node involving eIF4E, the mTOR cascade, and p53.

HPV | E6 | translation | cancer | TILM

Papillomaviruses comprise a diverse group of DNA viruses that infect cutaneous or mucosal epithelial cells of mammalian, reptile, and bird species. A total of 221 human papillomaviruses (HPV) types have been identified that cause diverse diseases ranging from benign warts to invasive tumors (1, 2). HPVs play key roles in developing cancer in the anus, vagina, vulva, penis, head, and neck. In cervical epithelium, persistent infection with high-risk (HR) HPVs dramatically increases the risk of development of both squamous cell cancer and adenocarcinomas (2).

Several prophylactic HPV vaccines have been licensed for clinical use, and their massive implementation has been successful in some high-income countries. Still, in many others, their accessibility is limited because they are expensive and thus available only on a user-pays basis (3). Therefore, the heavy disease burden of cervical cancer is paramount for public health worldwide, remaining the fourth most common cancer in women for both incidence and mortality and second in low-human development index countries (4). It is also the most commonly diagnosed cancer in 28 countries. In 2018, ~570,000 new cases and ~311,000 deaths were reported around the world (4). HR HPV types 16 and 18 cause ~70% of this burden across the globe, while the remaining ~30% are caused by types 45, 31, 33, 58, 52, 35, 39, and 59 (2).

Viral protein E6 plays a central role in the oncogenic properties of HR HPVs, since its continuous expression along with the protein E7 leads to cell proliferation and malignant phenotypes (5). E6 inactivates p53, inhibits apoptosis, forms a complex with

c-MYC, disrupts cell adhesion, polarity, and epithelial differentiation, activates telomerase, alters transcription, reduces immune recognition of HPV-infected cells, activates mammalian target of rapamycin (mTOR) cascade, and enhances cap-dependent translation (5). Despite its crucial role in promoting cancer, regulation of E6 synthesis remains poorly understood during tumorigenesis. It has been studied primarily in cultured cells at the level of messenger RNA (mRNA) transcription and splicing but not translation (2).

In eukaryotes, the vast majority of mRNAs are translated in a cap-dependent manner. The scaffold protein eIF4G binds both the cap-binding protein eIF4E and the RNA helicase eIF4A to form an eIF4F complex in this mechanism. eIF4E recognizes the cap structure (⁷mGpppX, where X is any nucleotide) located at the 5' end of the mRNA. Subsequently, a preassembled 43S preinitiation complex (PIC) comprising the ribosomal 40S subunit, initiation factors eIF1, eIF1A, and eIF3, and the ternary complex eIF2-GTP/Met-tRNA^{Met} is recruited to the 5' end of the mRNA via interaction of eIF4G with 43S PIC-associated eIF3. eIF4G also interacts with the poly(A)-binding protein (PABP) bound to the poly(A) tail of the mRNA, promoting crosstalk between 5' and 3' ends of mRNA that enhances translation. The ribosomal complex thus formed is termed a 48S PIC. The 48S PIC scans in a 5' → 3' direction the mRNA 5' untranslated region (UTR) to reach the

Significance

Cervical cancer is the fourth most common cancer in women for both incidence and mortality worldwide. The causal agent is a group of viruses termed high-risk human papillomavirus (HPV). Viral types 16 and 18 cause ~70% of this burden disease. HPV E6 is a potent oncoprotein that plays a central role in carcinogenesis, but its synthesis remains poorly understood at the level of mRNA translation. We discovered that in cervical tumors, mRNAs possessing 5' UTRs of 0 to 5 nucleotides and harboring the motif ACCaugGCGCG(C/A)UUU control E6 mRNA translation. This process is highly dependent on eIF4E and eIF4AI, two translation factors linking translation and cancer. We suggest the use of drugs targeting these factors as antineoplastic compounds for HPV-caused cancers.

Author contributions: A.G., Y.S., A.G.-C., and G.H. designed research; A.G., G.M., J.L.G., and Y.S. performed research; D.C., A.G.-C., N.S., and G.H. contributed new reagents/analytical tools; A.G., G.M., J.L.G., Y.S., D.C., A.G.-C., N.S., and G.H. analyzed data; and G.H. wrote the paper.

The authors declare no competing interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Published under the PNAS license.

¹To whom correspondence may be addressed. Email: ghernandez@incan.edu.mx.

This article contains supporting information online at <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2108359118/-DCSupplemental>.

Published October 6, 2021.

AUG start codon. During this process, eIF4A unwinds the secondary structure present at the 5' UTR of the mRNA (6, 7).

This study has characterized the E6/E7 mRNA 5' UTRs of HR HPV types 16, 18, 31, 39, and 45 in uterine cervical tumors. We also report that HPV-18 uses a strategy for E6 expression, that is, the translation of mRNAs with extremely short 5' UTR or leaderless mRNAs using a conserved motif around the E6 mRNA AUG start codon but involving no scanning. Moreover, we describe a dependence of E6 mRNA translation on eIF4E and eIF4AI, two proteins key for cancer development. Our results support the notion that an interplay, relevant for cancer development, between E6, eIF4E, p53, c-MYC, and the mTOR cascade occur during cervical carcinogenesis.

Results

HR HPVs Express E6/E7 mRNAs with a Structure That Drives Translation.

E6 and E7 oncoproteins are encoded by a single bicistronic mRNA transcribed from the early promoter of HR HPVs genome (2). Studies carried out in cultured cervical keratinocytes and carcinoma cells and organotypic epithelial raft cultures (8–10) established that in HPV-18, the early promoter ^P₁₀₅ drives transcription initiation predominantly from adenine 105. Intriguingly, nucleotide 105 is indeed the adenine of the translation start codon AUG of E6 open reading frame (ORF). Thus, HPV-18 early promoter ^P₁₀₅ mainly generates mRNAs lacking a 5' UTR in cultured cells. This phenomenon is rather startling since leaderless mRNAs in viruses had not been described (11). However, whether this phenomenon also exists in actual tumors is not known.

Therefore, we first sought to characterize E6/E7 mRNA 5' UTR isolated from tumors. We purified total RNA from cervical tumors from patients attending the Gynecology Unit of the National Institute of Cancer in Mexico City. We performed 5' rapid amplification of complementary DNA (cDNA) ends (RACE) experiments. The resulting bands obtained from every tumor were gel extracted and cloned and independent clones were sequenced (*SI Appendix, Table S1*). For HPV-16, we detected two mRNA populations with 5' UTRs of seven and nine nucleotides, respectively. For HPV-18, we detected two main mRNA populations harboring 5' UTRs of zero and three nucleotides long, respectively (*SI Appendix, Table S1*). A third, minor population of mRNA with 5' UTRs of five nucleotides was also observed. As a control, we analyzed E6/E7 mRNA from HeLa cells (which is an HPV-18-positive line) and detected the same two 5' UTR lengths previously reported, namely zero and three nucleotides long (8–10).

For HPV-31, HPV-39, and HPV-45, a single mRNA with a 5' UTR of nine nucleotides, two mRNAs with 5' UTR of one and three nucleotides, and a single mRNA containing a three-nucleotide-long 5' UTR were obtained, respectively (*SI Appendix, Table S1*). These results showed that HR HPV-18, HPV-39, and HPV-45 transcribe in tumors E6/E7 mRNAs with extremely short 5' UTR or even lacking a 5' UTR (i.e., 0 to 3 nucleotides long).

Our observations raised the question of the ability to drive the translation of the different E6 mRNAs from HPV-18. To address this, we performed in vitro translation assays using a cell-free system from HeLa cells (12). As shown in Fig. 1A, we cloned each 5' UTR obtained from tumors upstream nucleotides 1 to 45 of HPV-18 E6 ORF in frame with the reporter firefly luciferase (FLuc) cistron that contains a poly(A) tail (13). In these fusions, the FLuc AUG initiation codon has been eliminated so that the translation initiates at the AUG start codon of HPV-18 E6 ORF (see arrow in Fig. 1A). We generated three constructs, termed 50 nucleotide (nt)-VPH18, 3 nt-VPH18, and 0 nt-VPH18, containing 5' UTRs of 50 (only found in HeLa cells), 3, or 0 nucleotides from HPV-18 E6/E7 mRNAs, respectively. For comparison, we generated the construct 7 nt-VPH16 that harbors the 5' UTR from HPV-16 E6/E7 mRNA reported to drive cap- and scanning-dependent translation (14). We also generated two control FLuc constructs, one harboring 50 nucleotides of a random sequence as 5' UTR and

the other lacking a 5' UTR, termed 50 nt-Control and 0 nt-Control, respectively (Fig. 1A). Moreover, an additional group of control plasmids was constructed in which the E6 AUG initiator codon of the fused transcripts was mutated toward AAA. Thus, no AUG codon is present within the FLuc cistron.

Using these constructs as templates, we generated in vitro-transcribed monocistronic, m⁷GpppG-capped, and polyadenylated reporter mRNAs containing the 5' UTRs mentioned above and used them to perform cell-free, in vitro translation assays using lysates from HeLa cells (Fig. 1B). As expected, we observed that translation of 0 nt-Control mRNA was severely impaired due to the lack of a 5' UTR leader. We then translated the reporter transcripts containing HPV-18 5' UTRs and observed that 3 nt-HPV18 and 50 nt-HPV18 mRNAs showed identical translational efficiencies and that 0 nt-HPV18 showed the same translational efficiency as 50 nt-Control. Surprisingly, control mRNA 7 nt-HPV16 showed a weaker capacity to drive translation than 0 nt-HPV18 mRNA. None of the reporter mRNAs with the E6 AUG start codon mutated to AAA showed any translational activity, ruling out translation driven by internal, non-AUG codons.

The ability to drive the translation of all mRNAs was also tested in lysates from other model human epithelial cell lines, including HaCaT, 293T, and CaSki (Fig. 1C–E), obtaining similar results to those with HeLa lysates. In both HaCaT and 293T cell lysates, the 3 nt-HPV18 mRNA conferred the most robust translational capacity, and the 0 nt-HPV18 was translated as efficiently as the control mRNAs 50 nt-HPV18 and 50 nt-Control (Fig. 1C and D). In CaSki cell lysates, both 3 nt-HPV18 and 50 nt-HPV18 mRNAs showed the same translational ability and even higher than 50 nt-Control (Fig. 1E). We also analyzed translation in a distant system (i.e., wheat germ lysates), observing the same pattern of translation ability of HPV-18 mRNAs, the 3 nt-HPV18 mRNA being the one that conferred the most robust translational capacity (Fig. 1F).

Next, we analyzed the ability to drive the translation of the HPV-18 5' UTRs in the context of the actual E6 ORF. Thus, we subcloned HPV18 full-length E6 ORF in frame with the V5 epitope (Fig. 1G) and performed in vitro translation. Reporter mRNA translation was detected by Western blot experiments using an anti-V5 antibody. While we could not detect the synthesized proteins in cultured cell lysates or rabbit reticulocytes lysate (RRL), wheat germ lysates showed higher translational efficiency and allowed us to detect the synthesis of E6-V5. In agreement with the aforementioned results, we observed that 3 nt-HPV18-V5 mRNA conferred the strongest translational capacity, as compared to 0 nt-HPV18-V5 and 50 nt-HPV18-V5 mRNAs (Fig. 1H and *SI Appendix, Fig. S1*). Altogether, these results prove that HPV-18 expresses E6/E7 mRNAs with 5' UTRs of three or zero nucleotides to efficiently drive translation. Leaderless mRNA have never been observed in other viruses (11).

Regulatory Sequence Surrounding the AUG Start Codon. We rationalized that the presence of an extremely short 5' UTR or the lack of it in HPV-18, HPV-39, and HPV-45 E6/E7 mRNAs implied that the regulatory elements of these mRNAs, if any, might be located downstream the AUG start codon. This idea prompted us to determine whether sequences downstream the AUG start codon might play a role in E6 ORF translation. We first tested whether nucleotides 1 to 45 of HPV-18 E6 ORF contain an internal ribosome entry site (IRES) element. To this end, we used the bicistronic plasmid FLuc/hairpin/RLuc (renilla luciferase) (13), in which the first cistron (FLuc) is translated in a cap-dependent manner and the second cistron (RLuc) is translated in an IRES-dependent manner. The construct contains a hairpin (*h*) downstream the FLuc cistron that blocks any ribosome readthrough, as well as a poly(A) tail (*SI Appendix, Fig. S2A*). As shown in *SI Appendix, Fig. S2B*, nucleotides 1 to 45 of HPV-18 E6 ORF placed downstream of the hairpin did not show any ability to

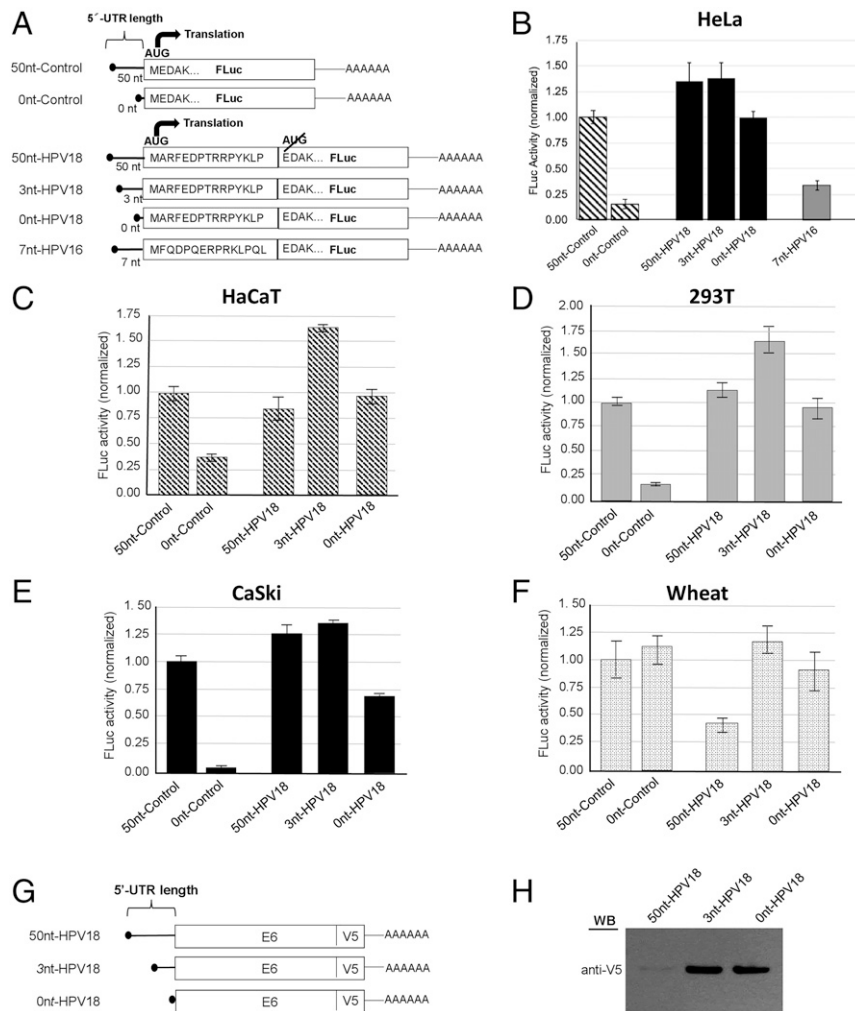


Fig. 1. Leaderless mRNAs or mRNAs with extremely short 5' UTRs promote translation of HPV-18 E6. (A) Monocistronic *FLuc* reporter mRNAs used for in vitro translation. For all constructs, the 5' UTR length is indicated, and the AUG codon that initiates translation is indicated with an arrow. 5' UTR of 50 nt–Control is a 50-nucleotide-long arbitrary sequence from the pBluescript vector (15). *HPV18* and *HPV16* constructs harbor 5' UTRs of HPV-18 and HPV-16 E6/E7 mRNAs, respectively. Amino acids 1 to 15 of HPV-18 or HPV-16 E6 in frame with the *FLuc* cistron are indicated. In these constructs, the *FLuc* AUG initiation codon has been eliminated so that the translation of the fusion proteins initiates at the indicated AUG start codon (arrow). (B–F and H) In vitro translation of capped and polyadenylated reporter transcripts in cell-free translation systems. SDs are shown. (B) HeLa, (C) HaCaT, (D) 293T, (E) CaSki, and (F) wheat germ. (G and H) Monocistronic, capped, and polyadenylated HPV-18 E6-V5 mRNAs are efficiently translated in cell-free in vitro translation of wheat germ lysates. (G) Transcripts containing the full-length HPV-18 E6 ORF in frame with the V5 epitope and 5' UTRs of 50-, 3-, or 0-nucleotides long are depicted. (H) Western blot of the translated proteins using an anti-V5 antibody.

drive IRES-dependent translation of the second cistron, even when we used two different magnesium acetate concentrations that strongly favor IRES-dependent translation. For comparison, see the *Drosophila reaper* (*rpr*) IRES activity used as a positive control (13). These results indicated that translation of HPV-18 E6 ORF is not driven by an IRES and should be promoted by a different structural element.

We next studied the influence on mRNA translation of the nucleotides around the initiator AUG in the most frequent and most efficient mRNA, that is, the three-nucleotide-long 5' UTR. As depicted in Fig. 2A, we mutated the 3 nt–HPV18 reporter in different positions, namely the ORF second codon (mutant C2), fourth codon (mutant C4), second and third codons (mutant C2,3), nucleotide +4 (mutant +4), or nucleotides –1, –2, and –3 upstream the AUG (mutant US). We observed (Fig. 2B) that introduction of C2 mutations resulted in a drastic inhibitory effect of translation in HeLa cell lysates, ranging from 82 to 100% inhibition; the mutation in the fourth codon led to 30% translation inhibition; mutation of second and third codons together had the

strongest effect, resulting in a total translation inhibition; mutation of nucleotide +4 inhibited 70% translation; and mutating nucleotides –1 to –3 impaired up to ~90% translation.

These results show that the context sequence –3 to +12 surrounding the AUG start codon is critical for E6 ORF translation. Interestingly, nucleotides 1 to 12 are highly conserved among HPV types 18, 39, 45, 59, 68, 70, and 97 (Fig. 3A), which form a monophylogenetic group of HR HPVs, namely species 7 of genus alpha (Fig. 3B) (1). Thus, the sequence ACCaugGCGCG(C/A)UUU defines a motif around the AUG start codon for translation. We termed this motif Translation Initiation of Leaderless mRNAs (TILM).

E6 Expression Is Dependent on eIF4E and eIF4AI. The eIF4F complex is pivotal for oncogenic signaling as it integrates mitogenic signals to enhance the synthesis of progrowth and prosurvival factors. Both eIF4E and eIF4AI are components of the eIF4F complex and represent crucial links between translation initiation and cancer development (15–17). Interestingly, HPVs E6 promotes

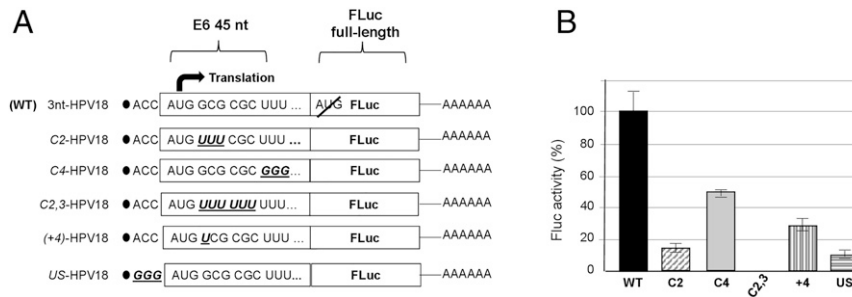


Fig. 2. Mutations around the AUG initiation codon affect the translation of the HPV-18 E6 mRNA. (A) FLuc monocistronic, capped, and polyadenylated reporter mRNAs harboring a three-nucleotide-long 5' UTR. The AUG codon that initiates translation is indicated with an arrow. The FLuc AUG initiation codon has been eliminated so that the translation of the fusion proteins initiates at the indicated AUG start codon. (B) Cell-free in vitro translation in HeLa cells lysates. FLuc activity SDs are shown. The wild-type constructs possessing 5' UTRs of three nucleotides long from Fig. 1 (here, depicted as WT 3 nt-HPV18) were used as control. Mutations were in the second (C2-HPV18), fourth (C4-HPV18), second and third (C2,3-HPV18) codons, nucleotide +4 ((+4)-HPV18), or nucleotides -1 to -3 upstream the AUG start codon (US-HPV18). For simplicity, mutated positions are indicated as C2, C4, C2,3, +4, and US.

proliferation and migration of cervical cancer cells via up-regulation of *eIF4E* transcription (18), and *eIF4E* is overexpressed in virtually all cervix-derived carcinomas (19).

Thus, we sought to determine the dependence of HPV-18 E6 translation on the mRNA cap structure and *eIF4E*. Using HeLa cells lysates, we analyzed the HPV-18 mRNAs depicted in Fig. 1A using in vitro translation assays. We synthesized these mRNAs bearing either a nonfunctional cap structure (ApppG) and a poly(A) tail or a functional cap (m^7GpppG) but lacking a poly(A) tail and used them to drive in vitro translation assays. We observed that the lack of either a functional cap (black bars) or a poly(A) tail (gray bars) resulted in a 5- to 10-fold reduction in translation, as compared to m^7GpppG -capped and polyadenylated control mRNAs. As expected, similar inhibition of translation was observed for the control mRNAs, namely 50 nt-Control and 0 nt-Control (SI Appendix, Fig. S3B). We complemented these analyses with translation experiments in the presence of increasing concentrations of a free cap (Fig. 4A). As a control, we tested the mRNA reporter containing the seven-nucleotide-long 5' UTR of HPV-16 E6/E7 mRNA (7 nt-HPV16), demonstrated to be translated in a cap- and *eIF4E*-dependent manner (14). For all mRNAs, this resulted in an approximately fivefold reduction of translation.

We next tested the translation dependency of the same set of mRNAs on *eIF4E* in the presence of recombinant *eIF4E*-binding protein (4E-BP) that inhibits cap-dependent translation by *eIF4E* sequestering. We observed that 4E-BP caused 80 to 90% impairment of translation of all mRNAs (Fig. 4B, black bars). We also performed in vitro translation using lysates prepared from *eIF4E* knocked-down (KD) cells (20). As shown in Fig. 4C, lack of *eIF4E* led to a reduction in the translation of 60 to 80% (black bars) of control values (dashed bars), that is, lysates of cells treated with scrambled short hairpin RNA (shRNA, SC). As expected, this was also the case for the 7 nt-HPV16 and 50 nt-Control mRNAs.

Next, we asked what the involvement of *eIF4AI* in HPV-18 mRNAs translation is. To address this question, we performed in vitro translation in the presence of increasing concentrations of hippuristanol, a specific inhibitor of *eIF4AI* and *eIF4AI*-dependent modes of translation initiation (21). As shown in Fig. 4D, hippuristanol severely impaired translation of 3 nt-HPV18 and 50 nt-HPV18 down to 12 to 14% of the control values without this compound. This was also the case of the 0 nt-Control mRNA, as well as the 7 nt-HPV16 mRNA, reported to be translated in a scanning-dependent manner (14), a process that requires *eIF4A*. They were translated 14 and 6%, respectively, of control assays

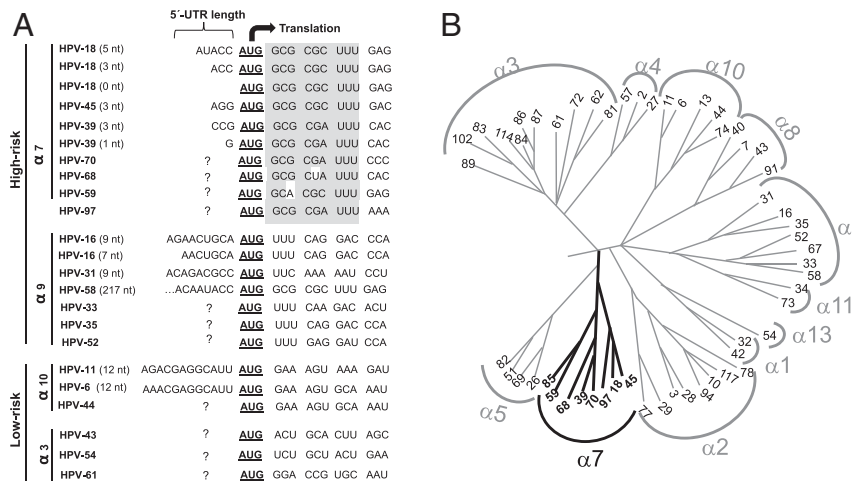


Fig. 3. HR HPV E6 ORF from genus alpha, species 7 share the motif TILM that promotes translation. (A) Sequence comparison of E6 ORF 5' end from different HR and low-risk HPVs. All viral types from genus alpha, species 7 share a conserved nine-nucleotide sequence (shaded in gray) downstream the AUG start codon (highlighted in bold and underlined), important to drive translation. The AUG codon that initiates translation is indicated with an arrow. The motif ACC AUG GCG CG(C/A) UUU is termed TILM. The 5' UTRs length found in tumors is indicated between parenthesis. ? indicates uncharacterized 5' UTRs. Codons 2nd to fourth necessary for translation are gray shaded. (B) Phylogenetic relationships between HPV types from some species (numbered) of the genus alpha. Modified from ref. 1, with permission from Elsevier. Each clade represents the indicated viral type. HR species alpha 7 are bold highlighted.

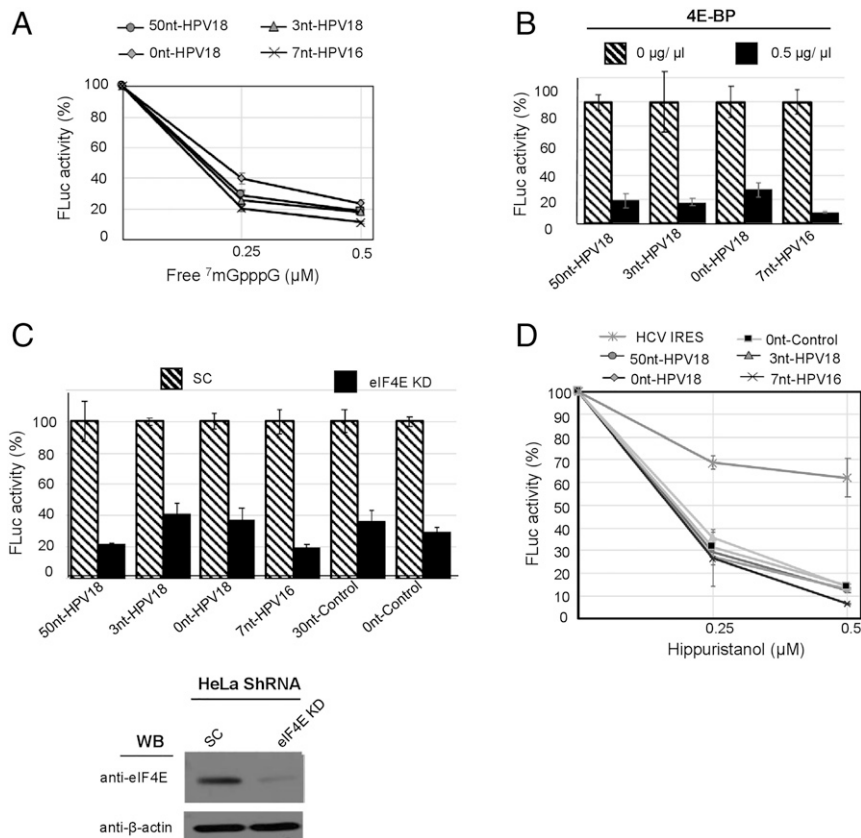


Fig. 4. The 5' UTRs of HPV-18 E6/E7 mRNAs promote translation in a cap-, eIF4E, and eIF4AI-dependent manner. (A–D) In vitro translation of the capped and polyadenylated, monocistronic reporter mRNAs depicted in Fig. 1 using a HeLa cell-free translation system. SDs are shown. (A and B) Translation of mRNAs in the presence of increasing concentrations of free cap m⁷GpppG (A) or the translational repressor 4E-BP1 (B). (C) Translation of mRNAs in extracts from cells treated either with scrambled (SC) or eIF4E (KD) shRNAs. (C, Lower) Western blot of extract cells treated either with scrambled (SC) or eIF4E (KD) shRNAs (10). (D) In vitro translation of mRNAs in the presence of increasing concentrations of the eIF4A inhibitor hippuristanol.

without hippuristanol. In contrast, the HCV-Control mRNA, whose translation is driven by the HCV IRES and is not dependent on eIF4AI (21), was translated 60% of the control value without hippuristanol. Altogether, these results prove that the translation of HPV-18 E6 mRNAs depends on the poly(A) tail, the cap structure, eIF4E, and eIF4AI but is independent on the scanning.

Discussion

An Uncharacterized mRNA Structure among Viruses. We have provided evidence that HPV-18, -39, and -45 have evolved an mRNA structure in tumors unique among viruses, namely mRNAs with zero- to three-nucleotide-long 5' UTRs and harboring the motif ACC_{aug}GCGCG(C/A)UUU to drive the translation of oncoprotein E6. We have termed this motif TILM.

mRNA 5' UTR determines translation efficiency, as it is critical for ribosomal landing, scanning, and binding of regulatory RNA-binding proteins (22, 23). Accordingly, 5' UTRs shorter than 20 nucleotides are generally highly detrimental for translation (24–26), and 5'-UTR length averages 53 to 164 nucleotides across eukaryotes (22). In contrast, leaderless mRNAs are rather seldom (22). Extremely short 5' UTRs (i.e., ≤12 nucleotides) have been reported among mRNAs from the unicellular parasitic protists *Giardia lamblia* (27), the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (26), and *Entamoeba histolytica* (28). Regarding multicellular species, extremely short 5' UTRs have only been found in a few human genes, including the nuclear-encoded mRNAs harboring the element Translation Initiation of Short 5' UTR (TISU), consisting of 12- to 30-nucleotide-long 5' UTRs (29, 30) and some mitochondrial mRNAs with 5' UTRs

shorter than 5 nucleotides (31, 32). In viruses, leaderless mRNAs or even mRNAs possessing extremely short 5' UTRs have never been reported in vivo. In this study, we have demonstrated that HPV-18, HPV-39, and HPV-45 E6/E7 mRNAs possess 5' UTRs of zero to five nucleotides in cervical tumors. We also have shown that the translation of HPV-18 E6/E7 mRNA harboring three-nucleotide-long 5' UTRs depends on the motif TILM surrounding the AUG start codon. Our findings carried out in actual cervical tumors complement the observations made in previous in vitro studies. Wang et al. (10) detected an additional transcription start site to nucleotide 55 in HPV18-infected raft tissues derived from vaginal or foreskin keratinocytes. In our experiments, we could not detect this mRNA, most probably due to the differences in the nature of the samples analyzed.

Because papillomaviruses take years, even decades, to become tumorigenic, perhaps the absence of a 5' UTR makes E6 mRNA pass unnoticed to the cellular mechanisms of mRNA degradation targeting the 5' UTR. To compensate the lack of a 5' UTR, the viral E6 mRNA possesses a TILM motif, which is an effective yet very slow sequence to promote E6 protein synthesis. Interestingly, the TILM motif is highly conserved across the species 7, genus alpha of HPVs, which form a phylogenetically coherent group of HR viral types (Fig. 3). In contrast, the characterized E6/E7 transcripts from other species (namely, HPV-16, -31, -58, -11, and -6) contain longer 5' UTRs and don't harbor the TILM element. Accordingly, the translation of HPV-16 E6 is performed in cap- and scanning-dependent manner (14).

Previously, the TISU element, with the sequence SAAS_{aug}GCGGC (S is G or C), was discovered close to the 5' end of mammalian

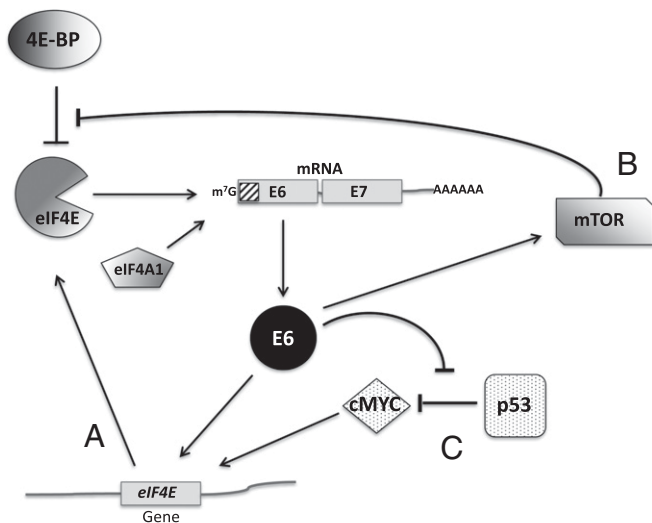


Fig. 5. E6 and eIF4E form a node of oncogenic positive feedback loops that drive cervical carcinogenesis. A model is presented that integrates the reported functional interactions of HR HPV E6 with the translation machinery and the c-MYC/p53 axis. (A) A loop is formed when E6 promotes carcinogenesis via up-regulation of *eIF4E* transcription and eIF4E, which in turn up-regulates E6 mRNA translation. (B) A second loop forms by direct activation of the mTOR cascade by E6. This cascade promotes hyperphosphorylation of the eIF4E-inhibitor 4E-BPs. Hyperphosphorylated 4E-BPs release eIF4E, increasing its activity. (C) E6, c-MYC, and p53 form a third loop. Under normal conditions, cells p53 binds to oncoprotein c-MYC, a transcriptional factor that activates *eIF4E* gene transcription. The complex p53–c-MYC prevents c-MYC transcriptional activity. E6 triggers p53 degradation in HPV-infected cells, and more E6 enhances p53 degradation, leading to up-regulation of *eIF4E* transcriptional activation by c-MYC. eIF4A1 promotes E6 synthesis. Proteins involved in translation are gray shaded. A square with diagonal dashes shows the TILM motif.

mRNAs synthesized mostly by TATA-less promoters. The only partial similarity is found between TILM and TISU elements downstream the AUG initiator. Interestingly, TISU drives efficient translation initiation of mRNAs with very short 5' UTRs (with a median of 12 nucleotides) (29, 30). The TILM element is a motif discovered in viruses to drive translation in leaderless mRNAs or transcripts with extremely short 5' UTRs.

Translation of HPV-18 E6 mRNAs with a TILM Motif Is Strongly Dependent on eIF4E and eIF4A1. Efficient recognition of an AUG requires a 5' UTR of 12 to 20 nucleotides (24, 33) because when the P site of the 40S ribosomal subunit is placed on the AUG codon, it makes contact with 17 nucleotides upstream and 11 nucleotides downstream of it (33, 34). Thus, a leader of <12 nucleotides would place the m⁷G cap in the mRNA exit channel of the 40S ribosomal subunit, remaining not fully engaged by nucleotides upstream of the AUG, rendering it somewhat unstable (35). Accordingly, extremely short leaders (1 to 5 nucleotides long) drive translation in mammalian cell-free systems by several alternative mechanisms, namely the direct binding of the nondissociated 80S ribosome to the 5' end of mRNA or by eIF2- or eIF5B-assisted translation initiation (24, 36–38). Thus, HPV-18, -39, and -45 E6 mRNAs must follow any of these mechanisms for translation. Because of its strong eIF4F dependence, the translation of E6 mRNAs is most likely initiated by binding of the 40S subunit rather than the 80S ribosome. However, there might be a kind of backward scanning to allow for the accommodation of the AUG start codon in the A-site of the 40S.

As reported for the TISU-mediated translation (30), we observed that the translation of HPV-18 E6 mRNAs is also strongly dependent on the cap structure and eIF4E. A robust dependence

of this translation on the eIF4F complex is further supported by the dependence on poly(A) tail and by inference on PABP, whose primary function is to stabilize the association of the eIF4E–eIF4G complex with the cap (39).

eIF4A is required not only for scanning but also for the initial binding of eIF4F to the 5' end of some mRNAs, called “mRNA activation” (40). For example, initiation on EMCV IRES (which does not involve scanning) requires eIF4A (41). A recent tridimensional structure of the human 48S PIC was elucidated. It was observed that during mRNA recruitment by the ribosome, eIF4A alone binds to eIF3 of the 48S PIC, and its affinity is increased in the presence of eIF4G being part of the eIF4F complex (34). We observed that the translation of HPV-18 E6 mRNAs is also dependent on eIF4A, which is consistent with these findings. In contrast, the TISU-driven translation of mRNAs did not reveal a dependence on eIF4A (30), suggesting a different mechanism for translation initiation.

E6 Synthesis Establishes Oncogenic Feedback Loops with the Translation Machinery. eIF4E is highly overexpressed in HPV-caused precancerous lesions and carcinomas of the uterine cervix (16, 17, 19). eIF4E overexpression may lead to tumorigenesis because it enhances the translational efficiency of mRNAs highly sensitive to the eIF4E concentration. Many of these mRNAs encode proteins promoting cell proliferation, apoptosis inhibition, metastasis, angiogenesis, and apoptosis resistance such as c-MYC, VEGF, beta-catenin, cyclin D1, ornithin decarboxylase, and BCL-XL (16, 42, 43).

Since HPVs E6 promotes proliferation and migration of cervical cancer cells via up-regulation of *eIF4E* transcription (18), our results suggest the occurrence of a positive oncogenic feedback loop where E6 promotes *eIF4E* transcription and eIF4E in turn up-regulates E6 translation. The observations that HR HPVs E6 activate mTOR complex 1 (mTORC1) signaling and cap-dependent translation (44, 45) and that the mTOR cascade triggers the onset of HPV-induced cervical carcinomas (46) suggest the existence of a second oncogenic positive loop involving eIF4E, E6, and the mTOR cascade; upon diverse stimuli, this cascade hyperphosphorylates the eIF4E-inhibitors 4E-BPs resulting in eIF4E activity enhancement and further E6 translation, which activates mTORC1 signaling once again. Since mTOR cascade is up-regulated in cervical carcinomas and 80% of endometrial cancers (47, 48), both loops involving E6 and eIF4E are further enhanced in these cancers.

The established interplay between E6 with the tumor suppressor p53 (5, 16) unveils the emergence of a third eIF4E-dependent oncogenic feedback loop in tumors: whereas in normal cells, p53 binds to oncoprotein c-MYC to prevent transcriptional activation of *eIF4E*, in HPV-transformed cells E6 transiently triggers p53 degradation. In this way, up-regulation of E6 translation by eIF4E overexpression enhances p53 degradation, which would lead to *eIF4E* transcriptional activation by c-MYC, leading to further up-regulation of E6 translation. Overall, E6 translation appears to play a central role in the interplay between eIF4E, E6, mTOR, c-MYC, and p53 to promote tumorigenic phenotypes upon HR HPV infection in the cervix. A model integrating the reported functional interactions of HR HPV E6 with the translation machinery and the c-MYC/p53 axis is presented in Fig. 5. According to this model, we predict that activation of mTOR cascade might result in up-regulation of E6 translation (via eIF4E) that would enhance p53 degradation.

Clinical trials that evaluate targeting of key factors of the translation machinery, such as eIF4E and eIF4A, are ongoing. The recently developed pharmacological molecules such as 4Ei-1, 4ERCat1, 4EASO4, and Cmpd 33 to inhibit eIF4E, 4EGI-1 that inhibits the eIF4E/eIF4G association, and hippuristanol, rocaglamides, silvestrol, pateamine, and Zotatifin (eFT226) for eIF4A1 are being used in preclinical and clinical studies or various cancer models as anticarcinogenic, antimetastatic, or tumor suppressors (15–17, 49, 50). Our findings underpin the idea of using the

molecules targeting eIF4E and eIF4AI as antineoplastic compounds for HPV-caused cancers.

Materials and Methods

Clinical Samples. Biopsies of fresh-frozen cervical carcinomas or cervical intraepithelial neoplasias grade 3 (CIN3) harboring integrated HPV were obtained from the Tumor Bank of the National Institute for Cancer (Instituto Nacional de Cancerología, INCAN), Mexico. For all biopsies, HPV type was determined by PCR.

Characterization of the 5' UTR Length of HPVs. Total RNA (1 µg) from HPV-positive tumors (*SI Appendix, Table S1*) was used to perform 5' RACE with the SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech). PCR products were cloned onto vector pTZ57R of the InStAdone PCR Cloning kit (Thermo Scientific). 5' UTRs of E6/E7 mRNAs were mapped by plasmid isolation of independent colonies and further 5'-end sequencing.

Plasmids Construction. Plasmids used in this study were derived from pLUC cassette, which contains the FLuc cistron as a reporter and a poly(A)₇₁ tail (13). All constructs were PCR amplified using pLUC cassette as a template and 5'-end specific primers that included the SP6 promoter sequence and primer T7 for the 3' ends. E6-V5 constructs were PCR amplified using a plasmid containing the HPV-18 E6 ORF as a template. Mutated versions of FLuc reporters were constructed by PCR amplification using the mentioned DNA templates and primers with mutations in the indicated positions. Bicistronic plasmid FLuc/hairpin/rpr/RLuc was previously described (13).

In Vitro Transcription. For in vitro transcription of m⁷GpppG-capped mRNAs, plasmids were linearized and further transcribed using the SP6 mMACHINE in vitro transcription kit (Ambion). ApppG-capped mRNAs were synthesized using the ApppG RNA cap structure analog (New England Biolabs) and the SP6 MaxIScript in vitro transcription kit (Ambion).

Cell Culture and KD Cell Preparation. HeLa, HEK-293T, CaSki, and HaCaT cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. HeLa eIF4E KD and scrambled (SC) cells (20) were grown in Petri dishes in the presence of zeocin to 80% confluency. Afterward, cells were washed twice with phosphate-buffered saline, detached with trypsin treatment, and immediately processed for cell-free extract preparation.

Cell-Free Extract Preparation and In Vitro Translation Assays. Cell-free extracts for in vitro translation were prepared as described (12). The in vitro translation assays were performed according to ref. 12. The in vitro translation in wheat germ lysates (Promega) was performed according to the manufacturer. Reporter expression was measured using luciferase substrate from the Luciferase Reporter Assay Substrate (Promega) in a 20/20 GloMax luminometer.

Western blot analyses. We performed Western blot using the following primary antibodies and working dilutions: mouse monoclonal anti-eIF4E (BD Transduction Laboratories), 1:5,000; and mouse anti-β-actin (Sigma), 1:10,000. In vitro translation in wheat germ extract was analyzed by Western blot using the anti-V5 epitope antibody (Invitrogen, 1: 5,000).

For further details, reference *SI Appendix*.

Data Availability. All study data are included in the article and/or *SI Appendix*.

ACKNOWLEDGMENTS. We are thankful to Akiko Yanagiya and Tommy Alain for cell lines, Jerry Pelletier for hippuristanol, Miriam C. Guido Jiménez for technical assistance, and Marcela Lizano and Leticia Rocha for useful comments on the manuscript. We also thank the anonymous reviewers for their critical and constructive comments that improved our manuscript. This work is part of the A.G. and G.M. curricula in the Ph.D. Programs on Biological Sciences (A.G.) and Biochemical Sciences (G.M.) (Doctorado en Ciencias Biológicas y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México). This work was supported by Grant No. 168154 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (México) to G.H. and by the intramural funding program of INCAN to G.H. and A.G.-C. CONACYT Ph.D. fellowships were awarded to A.G. (No. 436200) and G.M. (No. 772862).

- L. S. A. Mühr, C. Eklund, J. Dillner, Towards quality and order in human papillomavirus research. *Virology* **519**, 74–76 (2018).
- S. V. Graham, The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: A comprehensive review. *Clin. Sci. (Lond.)* **131**, 2201–2221 (2017).
- C. M. de Oliveira, J. H. T. G. Fregnani, L. L. Villa, HPV vaccine: Updates and highlights. *Acta Cytol.* **63**, 159–168 (2019).
- F. Bray *et al.*, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
- R. Ghittoni *et al.*, The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* **40**, 1–13 (2010).
- J. Pelletier, N. Sonenberg, The organizing principles of eukaryotic ribosome recruitment. *Annu. Rev. Biochem.* **88**, 307–335 (2019).
- A. G. Hinnebusch, The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 779–812 (2014).
- A. Schneider-Gädick, E. Schwarz, Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J.* **5**, 2285–2292 (1986).
- F. Thierry, J. M. Heard, K. Dartmann, M. Yaniv, Characterization of a transcriptional promoter of human papillomavirus 18 and modulation of its expression by simian virus 40 and adenovirus early antigens. *J. Virol.* **61**, 134–142 (1987).
- X. Wang, C. Meyers, H. K. Wang, L. T. Chow, Z. M. Zheng, Construction of a full transcription map of human papillomavirus type 18 during productive viral infection. *J. Virol.* **85**, 8080–8092 (2011).
- E. Jan, I. Mohr, D. Walsh, A cap-to-tail guide to mRNA translation strategies in virus-infected cells. *Annu. Rev. Virol.* **3**, 283–307 (2016).
- Y. V. Svitkin, N. Sonenberg, An efficient system for cap- and poly(A)-dependent translation in vitro. *Methods Mol. Biol.* **257**, 155–170 (2004).
- G. Hernández, P. Vázquez-Pianzola, J. M. Sierra, R. Rivera-Pomar, Internal ribosome entry site drives cap-independent translation of reaper and heat shock protein 70 mRNAs in *Drosophila* embryos. *RNA* **10**, 1783–1797 (2004).
- S. N. Stacey *et al.*, Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA. *J. Virol.* **74**, 7284–7297 (2000).
- D. Shahbazian, J. Pelletier, Y. Svitkin, J. W. B. Hershey, A. Parsyan, "RNA helicases and their cofactors" in *Translation and Its Regulation in Cancer Biology and Medicine*, A. Parsyan, Ed. (Springer, 2014), pp. 115–134.
- N. Robichaud, N. Sonenberg, D. Ruggero, R. J. Schneider, Translational control in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11**, a032896 (2019).
- M. U. Ali, M. S. Ur Rahman, Z. Jia, C. Jiang, Eukaryotic translation initiation factors and cancer. *Tumour Biol.* **39**, 1010428317709805 (2017).
- S. Wang *et al.*, HPV E6 induces eIF4E transcription to promote the proliferation and migration of cervical cancer. *FEBS Lett.* **587**, 690–697 (2013).
- A. Asimomytis *et al.*, mTOR downstream effectors, 4EBP1 and eIF4E, are overexpressed and associated with HPV status in precancerous lesions and carcinomas of the uterine cervix. *Oncol. Lett.* **12**, 3234–3240 (2016).
- A. Yanagiya *et al.*, Translational homeostasis via the mRNA cap-binding protein, eIF4E. *Mol. Cell* **46**, 847–858 (2012).
- M. E. Bordeleau *et al.*, Functional characterization of IREs by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 213–220 (2006).
- K. Leppik, R. Das, M. Barna, Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 158–174 (2018).
- A. G. Hinnebusch, I. P. Ivanov, N. Sonenberg, Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science* **352**, 1413–1416 (2016).
- T. V. Pestova, V. G. Kolupaeva, The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev.* **16**, 2906–2922 (2002).
- M. Kozak, A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Expr.* **1**, 111–115 (1991).
- J. A. Arribere, W. V. Gilbert, Roles for transcript leaders in translation and mRNA decay revealed by transcript leader sequencing. *Genome Res.* **23**, 977–987 (2013).
- R. D. Adam, The *Giardia lamblia* genome. *Int. J. Parasitol.* **30**, 475–484 (2000).
- I. Bruchhaus, M. Leippe, C. Lioutas, E. Tannich, Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *DNA Cell Biol.* **12**, 925–933 (1993).
- R. Elfakess, R. Dikstein, A translation initiation element specific to mRNAs with very short 5'UTR that also regulates transcription. *PLoS One* **3**, e3094 (2008).
- R. Elfakess *et al.*, Unique translation initiation of mRNAs-containing TISU element. *Nucleic Acids Res.* **39**, 7598–7609 (2011).
- V. Gandin *et al.*, nanoCAGE reveals 5' UTR features that define specific modes of translation of functionally related MTOR-sensitive mRNAs. *Genome Res.* **26**, 636–648 (2016).
- J. Montoya, D. Ojala, G. Attardi, Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature* **290**, 465–470 (1981).
- A. V. Pisarev, V. G. Kolupaeva, M. M. Yusupov, C. U. Hellen, T. V. Pestova, Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes. *EMBO J.* **27**, 1609–1621 (2008).
- J. Brito Querido *et al.*, Structure of a human 48S translational initiation complex. *Science* **369**, 1220–1227 (2020).
- A. G. Hinnebusch, Structural insights into the mechanism of scanning and start codon recognition in eukaryotic translation initiation. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 589–611 (2017).
- K. A. Akulich *et al.*, Four translation initiation pathways employed by the leaderless mRNA in eukaryotes. *Sci. Rep.* **6**, 37905 (2016).
- P. Kumar, C. U. Hellen, T. V. Pestova, Toward the mechanism of eIF4F-mediated ribosomal attachment to mammalian capped mRNAs. *Genes Dev.* **30**, 1573–1588 (2016).

38. D. E. Andreev, I. M. Terenin, Y. E. Dunaevsky, S. E. Dmitriev, I. N. Shatsky, A leaderless mRNA can bind to mammalian 80S ribosomes and direct polypeptide synthesis in the absence of translation initiation factors. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3164–3169 (2006).
39. A. Kahvejian, Y. V. Svitkin, R. Sukarieh, M. N. M'Boutchou, N. Sonenberg, Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev.* **19**, 104–113 (2005).
40. W. C. Merrick, eIF4F: A retrospective. *J. Biol. Chem.* **290**, 24091–24099 (2015).
41. I. B. Lomakin, C. U. Hellen, T. V. Pestova, Physical association of eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) with eIF4A strongly enhances binding of eIF4G to the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and is required for internal initiation of translation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6019–6029 (2000).
42. A. De Benedetti, J. R. Graff, eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* **23**, 3189–3199 (2004).
43. Y. Mamane *et al.*, Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. *PLoS One* **2**, e242 (2007).
44. J. M. Spangle, K. Munger, The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein activates mTORC1 signaling and increases protein synthesis. *J. Virol.* **84**, 9398–9407 (2010).
45. J. M. Spangle, N. Ghosh-Choudhury, K. Munger, Activation of cap-dependent translation by mucosal human papillomavirus E6 proteins is dependent on the integrity of the LXXLL binding motif. *J. Virol.* **86**, 7466–7472 (2012).
46. J. L. Callejas-Valera *et al.*, mTOR inhibition prevents rapid-onset of carcinogen-induced malignancies in a novel inducible HPV-16 E6/E7 mouse model. *Carcinogenesis* **37**, 1014–1025 (2016).
47. W. Feng, X. Duan, J. Liu, R. E. Brown, Morphoproteomic evidence of constitutively activated and overexpressed mTOR pathway in cervical squamous carcinoma and high grade squamous intraepithelial lesions. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2**, 249–260 (2009).
48. A. A. Molinolo *et al.*, mTOR as a molecular target in HPV-associated oral and cervical squamous carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **18**, 2558–2568 (2012).
49. J. Pelletier, J. Graff, D. Ruggero, N. Sonenberg, Targeting the eIF4F translation initiation complex: A critical nexus for cancer development. *Cancer Res.* **75**, 250–263 (2015).
50. J. T. Ernst *et al.*, Design of development candidate eFT226, a first in class inhibitor of eukaryotic initiation factor 4A RNA helicase. *J. Med. Chem.* **63**, 5879–5955 (2020).



Supplementary Information for
High-Risk Human Papillomavirus-18 Uses a Novel mRNA
Sequence to Synthesize Oncoprotein E6 in Tumors

**Alejandra García^a, Giovanna Maldonado^a, José L. González^b, Yuri Svitkin^c,
David Cantú^d, Alejandro García-Carrancá^{b,e}, Nahum Sonenberg^c and Greco
Hernández^a**

Corresponding author: Greco Hernández
Email: gghernandezr@incan.edu.mx; greco.hernandez@gmail.com.

This PDF file includes:

Supplementary text
Figures S1 to S3
Tables S1
SI References

Materials and Methods

Clinical Samples

The research was performed under the approved protocols by both the Ethics Committee (approval CEI/1032/16) and the Research Committee (approval 016/004/IBI) of the National Institute of Cancer, Mexico (Instituto Nacional de Cancerología, Mexico). We confirm that all research was performed in accordance with the guidelines and regulations of the National Institute of Cancer, Mexico and following the Declaration of Helsinki.

Biopsies of fresh-frozen cervical carcinomas or cervical intraepithelial neoplasias grade 3 (CIN3) harboring integrated HPV were obtained from the Tumor Bank of the National Institute for Cancer (Instituto Nacional de Cancerología, INCAN), Mexico, according to the Ethics Committee's approved protocols (Ethics Protocols Ref. (016/004/IBI) (CEI/1032/16) and INCAN/ Of. CEI 071/16; INCAN/ Of. CI 0053/16; and CEI/1032, from January 20th of 2016). Simultaneous extraction of DNA and RNA was performed using the All Prep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen). For all biopsies, HPV type was determined by PCR amplification using total DNA and primers to amplify a 450-base pairs fragment of L1 gene from 30 different HPVs, and further sequencing of fragments.

Characterization of the 5'-UTR length of HPVs

Total RNA (1 ug) from HPVs-positive tumors (Table 1) was used to perform 5'-rapid amplification cDNA ends (5'-RACE) with the SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech), using the forward universal primer mix of the kit along with reverse specific primers. For each viral type (except for HPV-16), two different reverse primers, now termed R1 and R2, were separately used. PCR products were gel-extracted and further cloned onto vector pTZ57R of the InsTAclone PCR Cloning kit (Thermo Scientific). 5'-UTRs of E6/E7 mRNAs were mapped by plasmid isolation of independent colonies and further 5'-end sequencing using the respective primers R1.

Plasmids Construction and In Vitro Transcription

Plasmids used in this study were derived from pLUC-cassette, which contains the FLuc cistron as a reporter and a poly(A)₇₁ tail (1). All constructs were PCR-amplified using pLUC-cassette as a template and 5'-end specific primers that included the SP6 promoter

sequence and primer T7 for the 3' ends. Thus, plasmids 0nt—HPV18, 3nt—HPV18, 50nt—HPV18, and 7nt—HPV16 were constructed amplifying the 5'-UTR sequences of E6/E7 mRNAs (0-, 3-, 50- and 7-nucleotides-long, respectively), downstream SP6 promoter followed by nucleotides 1 — 45 of respective E6 ORF in-frame with the FLuc ORF. Plasmids 0nt—Control and 50nt—Control harbor 0 or 50 nucleotides, respectively, of a random, arbitrary sequence as 5'-UTR. Fragments were cloned onto the pTZ57R/T vector of the InsTAclone PCR Cloning kit (ThermoFisher Scientific). E6-V5 constructs were PCR-amplified using plasmid p3XFLAG-CMV-10 as a template containing the HPV-18 E6 open reading frame (kindly donated by Dra. Marcela Lizano, National Institute of Cancer, Mexico). Mutated versions of FLuc reporters were constructed by PCR-amplification using the mentioned DNA templates and primers with mutations in the second (construct *C2—HPV18*), fourth (construct *C4—HPV18*), second and third (construct *C2,3—HPV18*) codons, nucleotide +4 (construct *(+4)—HPV18*), or nucleotides -1 — -3 upstream the AUG start codon (construct *US—HPV18*). Fragments were cloned onto pTZ57R/T vector from the InsTAclone PCR Cloning kit (ThermoFisher Scientific). Bicistronic plasmid FLuc/hairpin/*rpr*/RLuc was previously described (1). It contains the FLuc as a first reporter cistron, a high stability synthetic hairpin to prevent ribosomal read-through, and the internal ribosome entry site (IRES) of *Drosophila reaper* to drive the translation of the second cistron reporter *renilla* luciferase (RLuc). All constructions used in this work were verified by sequencing.

For *in vitro* transcription of m⁷GpppG-capped mRNAs, either with or without a poly(A) tail, plasmids were linearized with XhoI, HindIII, or SalI, respectively, and further transcribed using the SP6 mMESSAGING MACHINE *in vitro* transcription kit (Ambion). ApppG-capped mRNAs were synthesized using the ApppG RNA cap structure analog (New England Biolabs) and the SP6 MaxiScript *in vitro* transcription kit (Ambion). Because *in vitro* transcription was performed using the SP6 RNA polymerase, all reporter mRNAs harbor an extra guanine as the first nucleotide.

Cell Culture and Knock-down Cells Preparation

HeLa, HEK-293T, CaSki, and HaCaT cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics. HeLa eIF4E KD and scrambled (*SC*) cells (2) were grown in Petri

dishes in the presence of zeocin to 80% confluency and afterward serially passaged at 1:5 dilutions to new 125 cm² flasks until 90% confluency was reached. Afterward, cells were washed twice with PBS, detached with trypsin treatment, and immediately processed for cell-free extract preparation.

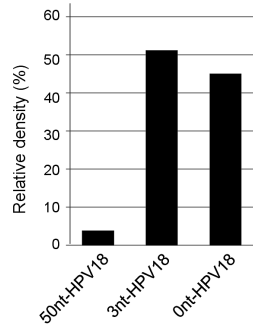
Cell-Free Extract Preparation and In Vitro Translation Assays

Cell-free extracts for *in vitro* translation were prepared as described (3) with the following modifications. Twenty-four hours before cell-free extract preparation, the medium was replaced with a fresh medium without antibiotics. Cells were washed twice with PBS, detached with trypsin, and immediately processed. From this point on, all steps were performed at 4 °C. Cells were centrifuged at 800 rpm for 5 minutes and further washed twice with cold HNG 1X buffer (3.5 mM HEPES-KOH pH 7.3, 14.6 mM NaCl, and 1.1 mM D-glucose). A final spin was performed at 1500 rpm; cell pellets were resuspended in 2 volumes of cold hypotonic buffer (25 mM HEPES-KOH pH 7.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, and 1mM DTT) and incubated for 30 minutes on ice. The solution was then transferred to a 7 ml Dounce homogenizer (Wheaton), and cells were lysed on ice by ~15 strokes with an A-Type (tight-fit) pestle until suspension became viscose and slightly bubbled. After lysis, 1/9 volume of concentrated buffer (25 mM HEPES-KOH pH 7.3, 1M KCH₃COO, 30 mM MgCl₂, and 30 mM DTT) was added to the solution to increase osmotic strength. Finally, the solution was centrifuged at 12 500 rpm for 10 minutes and the supernatant containing S10 fraction was treated with micrococcal RNase, aliquoted, and snap-frozen at -70 °C.

In vitro translation assays were according to (3) using 9 µl of cell-free extract supplemented with 1.2 µl of energy translation mix (125 mM HEPES-KOH pH 7.3, 10 mM ATP, 2 mM GTP, 200 mM creatine phosphate, 285U creatine phosphokinase, and 200 µM amino acids mix), 1.2 µl of 2.5 mM spermidine dihydrochloride and 1-2 ng/µl of mRNA per reaction. Reactions were performed by incubation at 30 °C for 60 minutes and further stopped by adding 2 volumes of cold passive lysis solution (Promega) on ice. Reporter gene expression was measured using 12 µl of the reaction and 60 µl of luciferase substrate from the Luciferase Reporter Assay Substrate (Promega) in a 20/20 GloMax luminometer. *In vitro* translation in wheat germ lysates (Promega) was performed according to the

manufacturer using 6.4 μ l of wheat extract, 0.5 μ l of -methionine amino acids mixture, 0.5 μ l of -leucine amino acids mixture, 0.9 μ l of potassium acetate, 0.1 μ l of RNAsin and 25ng of mRNA. Reactions were performed by incubation at 25 ° C for 90 minutes.

Cultured Cells and Western Blot Analyses —Cells were washed twice with PBS, detached by trypsin treatment, harvested, centrifuged at 800 rpm for 5 minutes at 4 °C, and lysed in 100 μ L RIPA buffer on ice for 30 min. Lysates were spun at 15,000 g for 10 min at 4 °C, and the supernatant was analyzed by Western blot using the following primary antibodies and working dilutions: mouse monoclonal anti-eIF4E (BD Transduction Laboratories), 1:5,000; and mouse anti- β -actin (Sigma), 1:10,000. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit (1:5,000) and anti-mouse (1:2,500) secondary antibodies (GE Healthcare). *In vitro* translation in wheat germ extract was analyzed by Western blot using the anti-V5 epitope antibody (Invitrogen, 1: 5,000) and detected with the secondary anti-mouse antibody (GE Healthcare, 1: 3000). ECL enhanced chemiluminescent reagent (PerkinElmer) was used for detection.



Supplemental Fig. 1. García et al. 2021

Fig. S1. Densitometry. The Western blot of the translated proteins using an anti-V5 antibody depicted in Fig. 1H was analyzed by densitometry.

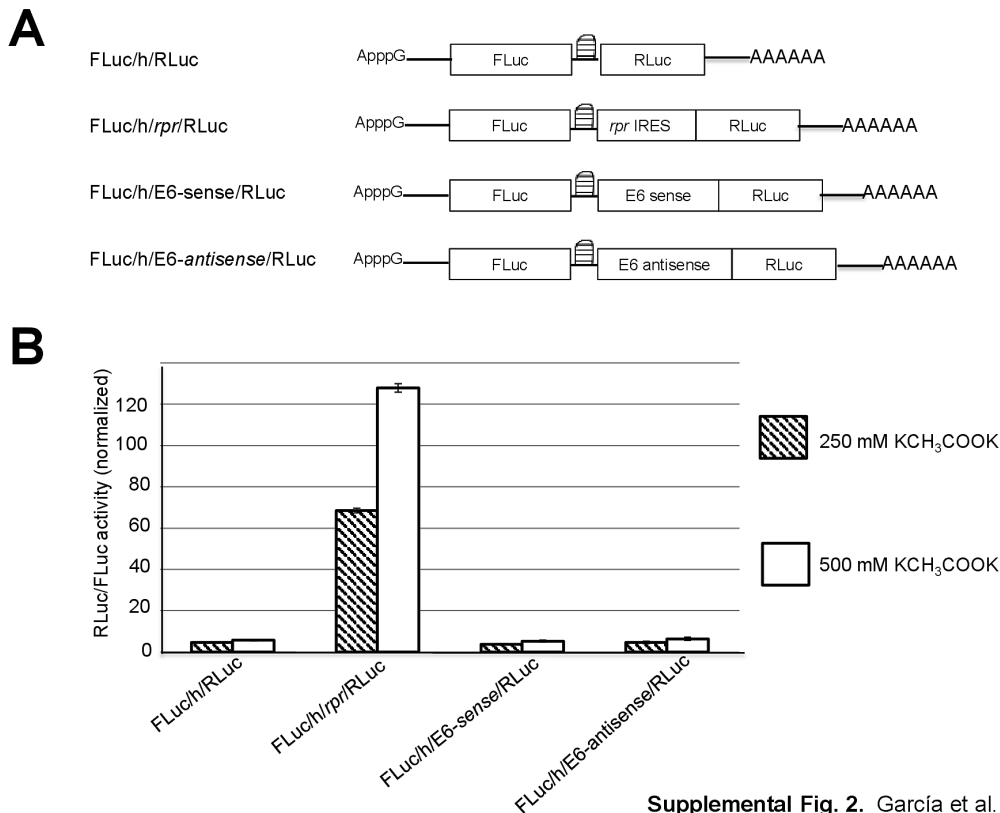
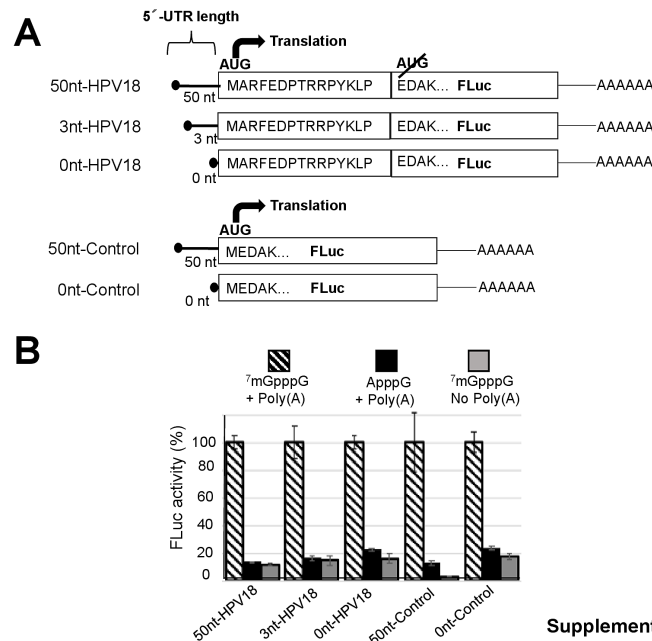


Fig. S2. Nucleotides 1 — 45 of HPV-18 E6 ORF do not possess IRES activity. *A)* Reporter mRNAs containing a synthetic, stable hairpin (*h*) preventing read-through of ribosomes into the second cistron. First cistron, firefly luciferase (*FLuc*); second cistron, *renilla* luciferase (*RLuc*). HPV-18 E6 fragment in both sense and antisense orientations were cloned downstream of the hairpin. *Drosophila reaper* (*rpr*) IRES (15) was used as a positive control. *B)* *In vitro* translation of ApppG-capped and polyadenylated transcripts in a HeLa cell-free translation system. Translation efficiency of the second cistron is calculated as RLuc/FLuc values and normalized to RLuc/h/FLuc. Two potassium acetate concentrations, reported for efficient activity of different IRES, were tested. E6 fragment did not display any IRES activity. Standard deviations are shown.



Supplemental Fig. 3 García et al. 2021

Fig. S3. 5'-UTRs of HPV-18 E6/E7 mRNAs promote translation in a cap-, and poly(A)-dependent manner. *A*) Monocistronic firefly luciferase (*FLuc*) reporter mRNAs used for *in vitro* translation. For all constructs, 5'-UTR length is indicated. 5'-UTR of 50nt—Control is a 50-nucleotides-long arbitrary sequence from the pBluescript vector. *HPV18* constructs harbor 5'-UTRs of HPV-18 E6/E7 mRNAs. Amino acids 1—15 of HPV-18 E6 in-frame with the *FLuc* cistron are indicated. The *AUG* codon that initiates translation is indicated with an *arrow*. In the fusion proteins (top three), the *FLuc* *AUG* initiation codon has been eliminated so that the translation initiates at the indicated *AUG* start codon. *B*) *In vitro* translation of the monocistronic reporter mRNAs using a HeLa cell-free translation system. mRNAs were either capped with the functional cap m^7GpppG and a poly(A) tail, capped with the nonfunctional cap *ApppG* and a poly(A) tail or capped with m^7GpppG without a poly(A) tail (negative control). Standard deviations are shown.

Table S1. Characterization of E6/E7 5'-UTR of different HPV types in tumors.

Viral type	5'-UTR length	5'-UTR sequence	Independent clones analysed	Tumors analysed
16	9 7	AGAACUGCA <u>AUG</u> AACUGCA <u>AUG</u>	88 16	4
18	5 4 3 1 0	AUACC <u>AUG</u> UACC <u>AUG</u> ACC <u>AUG</u> C <u>AUG</u> <u>AUG</u>	57 2 135 1 106	11
31	9	ACAGACGCC <u>AUG</u>	15	1
39	3 1	CCG <u>AUG</u> G <u>AUG</u>	35 9	1
45	3	AGG <u>AUG</u>	70	2
58	217	...CAGGACT <u>AUG</u>	44	1

References:

1. Hernández G, Vázquez-Pianzola P, Sierra JM, & Rivera-Pomar R (2004) Internal ribosome entry site drives cap-independent translation of reaper and heat shock protein 70 mRNAs in *Drosophila* embryos. *RNA* 10:1783-1797.
2. Yanagiya A, *et al.* (2012) Translational homeostasis via the mRNA cap-binding protein, eIF4E. *Mol. Cell* 46:847-858.
3. Svitkin Y & Sonenberg N (2004) An Efficient System for Cap- and Poly(A)-Dependent Translation *in vitro*. *Methods Mol. Biol.* 257:155-170.

RESEARCH ARTICLE

Interplay between SERCA, 4E-BP, and eIF4E in the *Drosophila* heart

Manuela Santalla^{1,2}, Alejandra García³, Alicia Mattiazzi², Carlos A. Valverde^{1,2}, Ronja Schiemann⁴, Achim Paululat⁴, Greco Hernández³, Heiko Meyer^{4*}, Paola Ferrero^{1,2*}

1 Departamento de Ciencias Básicas y Experimentales, UNNOBA, Pergamino, Buenos Aires, Argentina, **2** Centro de Investigaciones Cardiovasculares 'Dr. Horacio E. Cingolani', CONICET-UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina, **3** Translation and Cancer Laboratory, Unit of Biomedical Research on Cancer, National Institute of Cancer (Instituto Nacional de Cancerología, INCAN), Mexico City, Mexico, **4** Department of Zoology & Developmental Biology, Osnabrück University, Osnabrück, Germany

* pvferrero@comunidad.unnoba.edu.ar (PF); Meyer@biologie.uni-osnabrueck.de (HM)



OPEN ACCESS

Citation: Santalla M, García A, Mattiazzi A, Valverde CA, Schiemann R, Paululat A, et al. (2022) Interplay between SERCA, 4E-BP, and eIF4E in the *Drosophila* heart. PLoS ONE 17(5): e0267156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267156>

Editor: Thomas Preiss, John Curtin School of Medical Research, AUSTRALIA

Received: September 10, 2021

Accepted: April 3, 2022

Published: May 19, 2022

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267156>

Copyright: © 2022 Santalla et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Funding: This work was supported by PICT 2014-2549 ANPCyT and SIB 2015 to P.F., by PICT 2014-

Abstract

Appropriate cardiac performance depends on a tightly controlled handling of Ca^{2+} in a broad range of species, from invertebrates to mammals. The role of the Ca^{2+} ATPase, SERCA, in Ca^{2+} handling is pivotal, and its activity is regulated, inter alia, by interacting with distinct proteins. Herein, we give evidence that 4E binding protein (4E-BP) is a novel regulator of SERCA activity in *Drosophila melanogaster* during cardiac function. Flies over-expressing 4E-BP showed improved cardiac performance in young individuals associated with incremented SERCA activity. Moreover, we demonstrate that SERCA interacts with translation initiation factors eIF4E-1, eIF4E-2 and eIF4E-4 in a yeast two-hybrid assay. The specific identification of eIF4E-4 in cardiac tissue leads us to propose that the interaction of eIF4E-4 with SERCA may be the basis of the cardiac effects observed in 4E-BP over-expressing flies associated with incremented SERCA activity.

Introduction

Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) and eIF4E-binding proteins (4E-BPs) play crucial roles in mRNA cap-dependent translation. This mechanism begins with the recognition of the cap structure (m^7GpppN , where N is any nucleotide) located at the 5' end of the mRNA by eIF4E, which forms a complex with eIF4G. Formation of the eIF4E-eIF4G complex is one of the most critical events regulating the global process of cap-dependent translation. Therefore, eIF4E represents a major target for gene expression regulation [1]. eIF4E is regulated in mammals by three 4E-BP paralogs (1, 2 and 3) that share the eIF4E-binding motif YXXXXL ϕ with eIF4G (where X is any amino acid, and ϕ is a hydrophobic residue); the latter interacts with the dorsal surface of eIF4E [2]. Thus, binding of 4E-BPs to eIF4E blocks its association with eIF4G, thereby repressing cap-dependent translation. 4E-BPs are phosphorylated by the TOR kinase downstream of the PI3K signalling pathway [3]. Activity of 4E-BPs is modulated by the phosphorylation status; whereas hypo-phosphorylated 4E-BPs show high affinity for eIF4E, inhibiting translation, hyper-phosphorylated species dissociate from eIF4E, thus



Unorthodox Mechanisms to Initiate Translation Open Novel Paths for Gene Expression

Greco Hernández^{1*}, Alejandra García¹, Nahum Sonenberg² and Paul Lasko^{3,4}

1 - Translation and Cancer Laboratory, Unit of Biomedical Research on Cancer, National Institute of Cancer (Instituto Nacional de Cancerología, INCan), 22 San Fernando Ave., Tlalpan, 14080 Mexico City, Mexico

2 - Department of Biochemistry and Goodman Cancer Centre, McGill University, Montreal, Quebec H3A 1A3, Canada

3 - Department of Biology, McGill University, Montreal, Québec, Canada

4 - Department of Human Genetics, Radboud University Medical Center, Nijmegen, Netherlands

Correspondence to Greco Hernández:

ghernandezr@incan.edu.mx (G. Hernández)

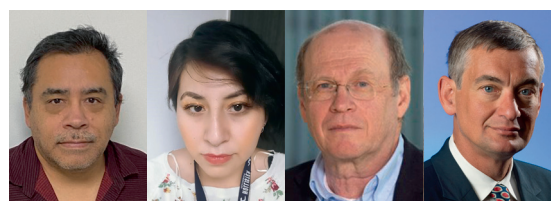
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.10.035>

Edited by Ruben L. Gonzalez

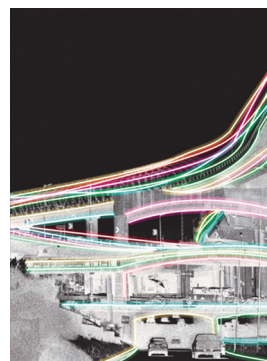
Abstract

Translation in eukaryotes is dependent on the activity of translation initiation factor (eIF) 4G family of proteins, a scaffold protein that, during the initiation step, coordinates the activity of other eIFs to recruit the 40S ribosomal subunit to the mRNA. Three decades of research on protein synthesis and its regulation has provided a wealth of evidence supporting the crucial role of cap-dependent translation initiation, which involves eIF4G. However, the recent discovery of a surprising variety of alternative mechanisms to initiate translation in the absence of eIF4G has stirred the orthodox view of how protein synthesis is performed. These mechanisms involve novel interactions among known eIFs, or between known eIFs and other proteins not previously linked to translation. Thus, a new picture is emerging in which the unorthodox translation initiation complexes contribute to the diversity of mechanisms that regulate gene expression in eukaryotes.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Greco Hernández, Alejandra García, Nahum Sonenberg, Paul Lasko



Legend: Decades of research on translation in eukaryotes have established the crucial role of the scaffold protein eIF4G as a center-stage player during the initiation step. The recent discovery of various alternative mechanisms that use scaffold proteins phylogenetically unrelated to eIF4G or translation initiation complexes lacking an eIF4G-like central multipurpose ribosome adaptor has stirred the orthodox view of how eukaryotes perform protein synthesis. Thus, a new picture is emerging in which the unorthodox translation initiation complexes open novel paths for gene expression in eukaryotes. The cover refers to the Featured Perspective article by G. Hernández et al. "Unorthodox mechanisms to initiate translation open novel paths for gene expression" published in this JMB issue. The illustration depicts an artistic representation of the novel, different avenues of gene expression.

The multipurpose ribosome adapter

Translation is a fundamental process for all organisms and is mostly regulated at the initiation

step.^{1,2} In eukaryotes, this step consists of recruitment of the 40S ribosome subunit to the 5'-untranslated region (UTR) of an mRNA through the action of translation initiation factors (eIFs). At

Aflatoxins, Carcinogens in Food, as Etiological Factors in Human Malignant Neoplasias of the Lung

Magda Carvajal-Moreno*, Erika Alejandra García-Hernández, María Del Carmen González-Villaseñor, Areli E González-Mendoza and Valentín A Rojas-Marín

Department of Botany, Institute of Biology, National Autonomous University of Mexico, Avenida Universidad, University City, Delegación Coyoacán, CdMx, Mexico

*Corresponding author: Magda Carvajal-Moreno, Department of Botany, Institute of Biology, National Autonomous University of Mexico, Avenida Universidad 3000, University City, Delegación Coyoacán 04510 CdMx, Mexico, Tel: +5255-2523 8197; E-mail: magdac@ib.unam.mx

Rec date: August 13, 2018; Acc date: October 09, 2018; Pub date: October 11, 2018

Copyright: © 2018 Carvajal-Moreno M, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the creative common's attribution license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Lung cancer is a malignant neoplasm of the lung or bronchial cells and is one of the primary causes of mortality in men and is the third leading cause of death in women worldwide. Active and passive tobacco smoking are considered the main risk factors for the development of lung cancer, but aflatoxins have also been considered important etiological factors. Aflatoxins, which are fungal secondary metabolites produced primarily by *Aspergillus spp.*, are chemically bis or tetra-hydrodifuran coumarins that contaminate foods (cereals, oilseeds, spices, dry fruits and dairy products). Aflatoxins are better recognized as hepatocarcinogens, but they can cause lung cancer via the formation of links to DNA and by the formation of AFB₁-DNA adducts, which can remain in the DNA for years and cause mutations and eventually cancers. The ingestion of aflatoxin-contaminated foods is the most common way in which individuals are exposed to these carcinogens, but other routes of exposure include nasal aerosol inhalation of AFB₁, which damages the lung. Alveolar macrophages possess specific oxidase activity for the epoxidation of AFB₁. In the biotransformation of the lung by AFB₁, AFB₁ requires a catalyzed metabolic activation of cytochrome P450 (CYP), the levels of which are low in the lung, to exert its carcinogenic activity. AFB₁ activation in the lung is achieved by prostaglandin H-synthetize, lipoxygenases, and CYP2A13 enzymes, the last of which catalyzes metabolic activation. CYP2A13 also plays a critical role in human lung carcinogenesis associated with inhalation exposure to AFB₁ and is highly efficient in the activation of AFB₁ *in situ*. Aflatoxins (AFB₁ and AFG₁) cause point mutations in K-Ras and H-Ras as well as in the p53 tumor suppressor gene, which can cause lung cancer. This article summarizes the known etiology of lung cancer with respect to the human food carcinogens AFB₁ and AFG₁, the molecular mechanisms of aflatoxins, and the known point mutations in the K-Ras, H-ras and p53 genes. This article also discusses a possible biocontrol (creosote bush or *Larrea tridentata*), the use of which is limited by its toxicity.

Keywords: Aflatoxins; Lung cancer; Carcinogens; Mycotoxins; Point mutations; p53 genes; Bronchial cells

Introduction

Currently, cancer is the most important group of diseases that affect human society worldwide. The incidence of cancer has increased in the last several years, primarily in underdeveloped countries, due to population growth and to different risk factors such as tobacco smoking, fatness, physical inactivity, genetics and mycotoxins, among others. In 2012, 14.1 million of new cases of cancer were reported, and 8.2 million cancer-related deaths were reported worldwide [1,2].

Lung Cancer (LC) is one of the most common causes of cancer mortality in men and is the third cause of death in women worldwide. It has been suggested that there will be 1.8 new cases worldwide, with the highest incidence seen in underdeveloped countries [1,2]. Aflatoxins can cause different types of cancers in different organs such as the lungs [3], liver [4], colon [5], rectum [5], pancreas [6], kidney [7], and cervix [8]. In the lung, malignant neoplasia may develop from either the lung parenchyma or bronchial cells. Recently, the frequency of lung cancer has increased substantially, and it is now considered one of the most frequently detected malignant tumors. The World Health Organization (2015) classified the origins of LC as epithelial, mesenchymal, lymph histiocytic, ectopic or metastatic [9].

The symptomatology varies depending on the development of the disease. Symptoms include cough, dyspnea, recurrent pneumonia, and paraneoplastic syndrome, among others. Since the symptoms are diverse and may overlap with those of other diseases, the prognosis depends on the early or late detection of the disease.

Active and passive tobacco smoking are considered the main risk factors for the development of LC [10,11], but in recent years, aflatoxins have also been considered important etiological factors [12]. Other risk factors include obesity, physical inactivity, improper nutrition, genetic load and exposure to different substances such as arsenic, asbestos and radon.

Literature Review

Aflatoxins

Aflatoxins (AF) are secondary metabolites produced mainly by the fungi *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius* [13]. More than 20 known AFs have been identified, but the basic four are aflatoxin B1 (AFB₁), aflatoxin B2 (AFB₂), aflatoxin G1 (AFG₁) and aflatoxin G2 (AFG₂) [14]. To detoxify the body from AFB₁, which is the most toxic AF, the liver adds the chemical group OH- to these compounds to form hydroxylated metabolites. These metabolites are water-soluble and can be present in urine, lymph, and milk, among other body fluids. The primary hydroxylated metabolites are aflatoxin M1 (AFM₁), aflatoxin

Presence of Aflatoxin Carcinogens in Fresh and Mature Cheeses

Rojas-Marín V, Carvajal-Moreno M*, González-Villaseñor MC, García-Hernández EA and González-Mendoza A

Institute of Biology, National Autonomous University of Mexico (UNAM), University City, Delegación Coyoacán, 04510, CdMx, México

Abstract

Cheese has a high nutritional value so it is considered an essential food in the human diet. This review considered 27 countries with 59 different kinds of cheeses highly consumed per person, with France and the USA as the largest consumers with 26 kg and 15 kg per inhabitant per year, respectively. Mexico has a consumption of 2.1 kg per capita in a year. The presence of aflatoxins in cheeses represents a risk for human health because the International Agency for the Research of Cancer (IARC) classified them as Grade I, meaning that they are proven carcinogens to humans. Almost all of the countries reported aflatoxin M₁ in cheese, and only Mexico analyzed eight different aflatoxins and hydroxylates in this dairy product. It is also important to analyze the hydroxylate metabolites of aflatoxins because they are also carcinogenic and they increase the amount of ingested carcinogens in cheese samples, allowing us to obtain the real ingested dose.

Keywords: Aflatoxins; Cheeses; Food carcinogens; Human cancer

Introduction

Aflatoxins are undesirable mycotoxins that contaminate cheese directly through rennet or contaminate milk indirectly from oilseeds or cereals with the fungi *Aspergillus flavus* or *A. parasiticus* in animal feed. Cheese is produced by the addition of rennet or other enzymes to curdle the milk of certain mammals, such as cattle, sheep and goats, in the presence of lactic acid produced by spiked or natural microorganisms in milk; part of the humidity is eliminated when the curd is cut [1]. An accepted definition of cheese is “A fresh or refined product, solid or semisolid obtained by the coagulation of the entire milk, skimmed or partially skimmed due to the action of rennet...” [2]. Milk can be raw or pasteurized, and for the formation of cheese, two processes are required: curdling and acidification of the milk. Rennet is an aspartic protease enzyme extracted from the abomasum that is in the fourth stomach of bovines, and it acts by separating casein from its liquid phase, water, milk serum and carbohydrates. It is also produced in human babies to curdle the mother’s milk [3]. Acidification to pH 4.5 precipitates the insoluble protein via the action of bacteria or the addition of vinegar or lemon juice [4]. Bacteria convert milk carbohydrates into lactic acid, which plays an important role in the texture and organoleptic properties of cheeses [5]. The different flavors and textures of the cheeses depend on the kind of milk employed, the additives, the curdle time and the modification of proteins and fats by the different microorganisms employed, such as the lactic acid and propionic bacteria [6]. Additionally, some fungal strains are utilized, such as *Penicillium roqueforti* for making blue cheese or Roquefort and *Penicillium camemberti* for making Camembert and Brie cheeses [7]. Cheese is one of the most nutritive foods for humans as a source of calories; proteins; carbohydrates; saturated (AGS), unsaturated (AGM) and poly-unsaturated (AGP) fats; cholesterol, vitamin D; calcium; and sodium [3].

Production of Milk and Cheese in Mexico and Worldwide

The bovine milk production worldwide in 2016 was 488,812,000 tons, of which 189,080,000 tons (39%) was produced in the European Union and East Europe. The American continent was ranked in second place with 155,637,000 tons (32%). Asia produced 113,340,000 tons (23%), and Oceania registered a production of 30,755,000 tons (6%) [8]. In 2013, the European Union cheese production was 645,776,815 tons, Saudi Arabia produced 231,341,350 tons, New Zealand produced 269,306,317 tons, the United States of America produced 170,262,254

tons, Egypt produced 160,111,100 tons, and Australia produced 163,163,170 tons [8].

The USA was ranked first in bovine milk production in 2016, with 62%, followed by Brazil, which produced 17% and Mexico was in third place with 8%. Argentina and Canada produced 6% and 7% of bovine milk, respectively [8]. The total cheese production in the world is 18 million tons, with the USA generating 30% of the world’s production, followed by Germany with 13%, France with 12% and Italy with 7.5%. The remaining production is generated by The Netherlands, Poland, Brazil, Egypt and Argentina, among others. Mexico produced 282,000 tons of cheese in 2015, and it exported 4,112 tons and imported 116,117 tons [9].

Aflatoxins

Aflatoxins (AF) are a group of toxic secondary metabolites produced mainly by the fungi *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius* [10]. These species are ubiquitous in nature, and they can contaminate dry fruits, oilseeds, cereals and spices. These contaminants can affect plants in the field, crops, transportation or warehouses [11].

The main entrance of AFs in mammals is through the ingestion of contaminated foods and feeds, with the liver as the main affected target [12]. AFs damage animals and humans and are considered the most potent natural mutagens and carcinogens that can link to DNA and be stored for years [13]. Aflatoxin B₁ (AFB₁) is classified as a proven Group I carcinogen for humans [14]. Aflatoxin M₁ is possibly carcinogenic to humans and was classified as a Group 2B carcinogen by the IARC (1997) [15]. The acute symptoms related to AF consumption are vomiting, hemorrhaging, diarrhea and death. The chronic symptoms

***Corresponding author:** Dr. Magda Carvajal-Moreno, Department of Botany, Institute of Biology, National Autonomous University of Mexico (UNAM), University City, Delegación Coyoacán, 04510, CdMx, Mexico, Tel: +5255 2523 8297; Fax: +5255 5550 1760; E-mail: magdac@ib.unam.mx

Received March 13, 2018; **Accepted** March 23, 2018; **Published** March 30, 2018

Citation: Rojas-Marín V, Carvajal-Moreno M, González-Villaseñor MC, García-Hernández EA, González-Mendoza A (2018) Presence of Aflatoxin Carcinogens in Fresh and Mature Cheeses. Pharm Anal Acta 9: 581. doi: [10.4172/2153-2435.1000581](https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000581)

Copyright: © 2018 Rojas-Marín V, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.