



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

“Efecto de la proteína E1 del Virus del Papiloma Humano (VPH) tipo 16 en la regulación de la vía de los genes inducidos por Interferón”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Biól. KATIA ALHELÍ MONROY MORA

TUTOR PRINCIPAL:  
DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.  
DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

Ciudad de México, Febrero, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**MONROY MORA KATIA ALHELÍ**  
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas  
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **12 de septiembre de 2022**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestra en Ciencias**, con la réplica de la tesis **“Efecto de la proteína E1 del Virus del Papiloma Humano (VPH) tipo 16 en la regulación de la vía de los genes inducidos por Interferón”**, dirigida por el/la Dr(a). **LIZANO SOBERÓN MARCELA**.

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

GONZÁLEZ ESPINOSA CLAUDIA	PMDCBQ	PRESIDENTE
MONTESINOS MONTESINOS JUAN JOSÉ	PMDCBQ	SECRETARIO
CERBÓN CERVANTES MARCO ANTONIO	PMDCBQ	VOCAL
GONZÁLEZ GARCÍA CONDE RAMÓN ANTONIO	PMDCBQ	VOCAL
SOTO REYES SOLIS ERNESTO	PMDCBQ	VOCAL

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

**Atentamente**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 19 de septiembre de 2022



**Coordinadora**  
**Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz**

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos en la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología y el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Este proyecto fue financiado parcialmente por el CONACYT Ref: PRONAI-7-Virus y Cáncer. Agradezco el apoyo económico a través de una beca nacional CONACYT durante la realización del proyecto de maestría con No. CVU: 1086341.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM por enriquecer mi formación académica y personal. Así como al Instituto Nacional de Cancerología en donde realicé este trabajo y viví gratas experiencias durante mi formación.

A la Dra. Marcela Lizano Soberón, titular del laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos, por aceptarme para formar parte de su grupo de trabajo, por el gran apoyo brindado y por todo el aprendizaje, así como su dirección en el desarrollo de este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial conformado por la Dra. Leticia Rocha Zavaleta y el Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés por sus valiosas y oportunas observaciones a lo largo del desarrollo del proyecto.

A mi comité de sinodales conformado por la Dra. Claudia González Espinosa, el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, el Dr. Ramón Antonio González García Conde, el Dr. Juan José Montesinos Montesinos y el Dr. Ernesto Soto Reyes Solís, por sus valiosas observaciones para mejorar el escrito de la tesis y las atenciones recibidas de su parte.

Al Dr. Jesús Omar Muñoz Bello y al Dr. Leonardo Josué Castro Muñoz, por el apoyo y conocimiento brindado durante mi estancia en el laboratorio.

A la Mtra. Adela Carrillo, a la Dra. Imelda Martínez, a la Dra. Adriana Contreras y a la Dra. Alma Chávez por su apoyo y atenciones durante la realización del proyecto.

A Joel Ruiz, por su apoyo incondicional en el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio: Alicia, Iris, Yunuen, Ximena, Eduardo, Joaquín, Joel, Josué, Omar y Víctor por los buenos momentos compartidos durante mi estancia en el laboratorio.

## DEDICATORIAS

A mis padres Lourdes y Alberto por su enorme amor, comprensión y apoyo incondicional. Por ser mi inspiración y mi ejemplo para superarme en todos los ámbitos de la vida. Estaré siempre agradecida y orgullosa de tenerlos como padres. Los amo con todo mi corazón.

A mi hermano Alberto, por ser mi mejor amigo y apoyarme siempre en las buenas y en las malas. Estaré siempre para ti.

A mi abuelita Julia, por ser una segunda madre para mí desde pequeña, gracias por todo el cariño y esfuerzo que haces todos los días para apoyarnos y procurarnos. Te amo abuelita.

A mi tía Eloísa, por todo el apoyo que siempre me has brindado en muchos aspectos, agradezco mucho todo lo que has hecho por mí y estaré eternamente agradecida contigo.

A Melissa por todo el apoyo que siempre me has dado y más allá por ser la hermana que nunca tuve. Así como a mis primos y toda mi familia por estar en las buenas y en las malas para apoyarnos. Siempre estaré para ustedes.

A Joel Zoocinio, por ser mi mejor amigo y compañero de vida, gracias por todas las risas, pláticas, aventuras, por tu escucha y por acompañarme en este tiempo y espacio en donde comienzo a descubrir mi camino espiritual, por apoyarme incondicionalmente durante esta etapa y compartir conmigo hermosos momentos que siempre atesoraré con mucho amor.

A mis amigos: Diana Ortiz, por ser mi mejor amiga, por tu apoyo incondicional y por todos los buenos momentos y pláticas compartidas desde que nos conocemos, te admiro y te agradezco mucho por todo. A mis amigos Alejandro Gamboa, Alejandro Partida, Cristian Domínguez, y Gerson Mendo, por todos los buenos momentos compartidos y por estar incondicionalmente, por sus consejos, su escucha y por ser un ejemplo para mí en muchos aspectos, gracias por todo.

A Yopi y Tuti, gracias por todos los años de felicidad.

## ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	9
2. RESUMEN.....	11
3. INTRODUCCIÓN .....	12
4. MARCO TEÓRICO .....	14
4.1. Virus del Papiloma Humano .....	14
4.2. Genoma y ciclo replicativo de los VPH.....	14
4.3. Proteína E1 del VPH.....	16
4.4. Historia natural de la infección por VPH .....	18
4.5. El papel de la repuesta inmune innata en el inicio de la repuesta antiviral.....	19
4.6. Los IRFs como reguladores de la expresión de Interferón.....	21
4.7. Interferones en la respuesta antiviral.....	23
4.8. Vía del Interferón Tipo I y de genes inducidos por Interferón (ISGs) .....	25
4.9. Mecanismos de regulación de la vía de los ISGs .....	25
4.10. La respuesta inmune innata contra la infección por el Virus del Papiloma Humano desencadena la producción de Interferones de Tipo I .....	27
5. ANTECEDENTES .....	29
5.1. Alteración de la vía del Interferón Tipo I y de genes inducidos por Interferón por virus oncogénicos .....	29
5.2. Regulación de la vía de Interferón y de genes inducidos por Interferón por la proteína E1 del VPH.....	30
6. JUSTIFICACIÓN.....	31
7. HIPÓTESIS.....	32
8. OBJETIVO GENERAL.....	32
9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
10. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	32
11. MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
11.1. Cultivo celular.....	33
11.2. Plásmidos.....	33
11.3. Transformación bacteriana.....	34
11.3.1. Generación de bacterias competentes.....	34
11.3.2. Transformación.....	34
11.3.3. Aislamiento y purificación de DNA de plásmidos de expresión .....	34
11.3.4. Transfección .....	35

11.4.	Obtención de RNA y síntesis de cDNA .....	36
11.5.	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).....	37
11.6.	Western Blot .....	37
11.6.1.	Extracción de proteínas .....	37
11.6.2.	Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE).....	37
11.6.3.	Transferencia.....	38
11.6.4.	Bloqueo de membrana e incubación de anticuerpos primarios y secundarios .....	38
11.6.5.	Anticuerpos .....	38
11.6.6.	Revelado de la presencia de proteínas.....	38
11.7.	Análisis Estadístico.....	39
12.	RESULTADOS .....	40
12.1.	Expresión y niveles de E1 del VPH en la línea celular HaCaT.....	40
12.2.	La proteína E1 del VPH-16 disminuye los niveles de expresión del mRNA de STAT1 en células HaCaT cultivadas en presencia o ausencia de Poli I:C .....	41
12.3.	La proteína E1 del VPH-16 disminuye los niveles de expresión de mRNA de STAT2 en células HaCaT .....	42
12.4.	La proteína E1 del VPH-16 disminuye los niveles de expresión del mRNA de IRF-9 en las células HaCaT .....	44
12.5.	E1 del VPH-16 disminuyó los niveles proteicos de STAT1 y p-STAT1, mientras que E1 del VPH-11 aumentó p-STAT1 en células HaCaT.....	45
12.6.	E1 del VPH-16 disminuye los niveles de p-STAT2 en células HaCaT, mientras que E1 del VPH-11 los aumenta .....	46
12.7.	E1 del VPH-16 disminuye los niveles de IRF-9 en células HaCaT, mientras que E1 del VPH-11 los aumenta .....	47
12.8.	Las proteínas E1 del VPH-16 y VPH-11 disminuyen la expresión del mRNA de IFN $\beta$ 1 en células HaCaT no estimuladas y estimuladas con Poli I:C .....	48
13.	DISCUSIÓN .....	49
14.	CONCLUSIONES .....	57
14.1.	CONCLUSIONES PUNTUALES.....	57
15.	PERSPECTIVAS .....	58
16.	ANEXO .....	59
17.	REFERENCIAS.....	60



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa del genoma del VPH: Representación esquemática de un genoma de Alphapapillomavirus.....	166
<b>Figura 2.</b> Papel de la proteína E1 del VPH en la replicación del DNA viral. ....	188
<b>Figura 3.</b> Historia natural de la infección por el Virus del Papiloma Humano oncogénico. ....	199
<b>Figura 4.</b> Principales diferencias entre los sistemas IFN tipo I, II y III.....	24
<b>Figura 5.</b> Modelo del cambio molecular del reposo a la expresión génica inducida por IFN-I.....	276
<b>Figura 6.</b> La respuesta inmune innata desencadenada por el Virus del Papiloma Humano induce la producción de Interferón de Tipo I y la activación de la vía de los ISGs.....	298
<b>Figura 7.</b> Expresión de E1 del VPH-11 y -16 en células HaCaT. ....	409
<b>Figura 8.</b> La proteína E1 del VPH-16 disminuyó la expresión de STAT1 en células HaCaT. ....	41
<b>Figura 9.</b> La proteína E1 del VPH-16 disminuyó la expresión de STAT2. ....	42
<b>Figura 10.</b> La proteína E1 del VPH-16 disminuyó la expresión de IRF9.....	43
<b>Figura 11.</b> E1 del VPH-16 disminuye los niveles de pSTAT1 en células HaCaT.....	45
<b>Figura 12.</b> E1 del VPH-16 disminuye los niveles de p-STAT2 en células HaCaT.....	465
<b>Figura 13.</b> E1 del VPH-16 disminuye los niveles de IRF9 en células HaCaT. ....	476
<b>Figura 14.</b> La proteína E1 del VPH-16 reguló negativamente la expresión de IFN $\beta$ 1 en células HaCaT no estimuladas y estimuladas con Poly I: C.....	498
<b>Figura 15.</b> Modelo propuesto del efecto de las proteínas E1 del VPH 11 y 16 sobre la regulación de la vía de los ISGs ante la infección viral. ....	53

## 1. ABREVIATURAS

<b>AIM2-</b>	Proteína inducible por Interferón AIM2
<b>DBD</b>	Dominio de unión al ADN
<b>DMEM-F12</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco (Formulación 12)
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dsDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
<b>E1</b>	Proteína E1 del Virus del Papiloma Humano
<b>EV</b>	Epidermodisplasia Verruciforme
<b>HA</b>	Etiqueta de Hemaglutinina
<b>HaCaT</b>	Línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados
<b>HD-E1</b>	Dominio de Helicasa C-Terminal de E1
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IFN I</b>	Interferón Tipo I
<b>IFN<math>\beta</math>1</b>	Interferón Beta 1
<b>IFN<math>\lambda</math>1</b>	Interferón Lambda 1
<b>IFNAR</b>	Receptor para Interferón alfa y beta
<b>IFNGR</b>	Receptor para Interferón gamma
<b>IFNLR</b>	Receptor para Interferón lambda
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IRFs</b>	Factores de respuesta de Interferón
<b>IRF9</b>	Factor regulador de Interferón 9
<b>ISGF3</b>	Complejo Factor génico inducido por Interferón 3
<b>ISGs</b>	Genes Inducidos por Interferón
<b>ISRE</b>	Elementos de respuesta estimulados por Interferón
<b>JAK</b>	Cinasas Jano
<b>LB</b>	Medio Luria Bertani
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>NLR</b>	Dominio de oligomerización de nucleótidos
<b>NLS</b>	Señal de localización nuclear
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto
<b>Ori</b>	Origen de replicación
<b>p-adj</b>	Valor de p ajustada
<b>pAE</b>	Sitio de poliadenilación temprana del VPH
<b>pAL</b>	Sitio de poliadenilación tardía del VPH
<b>pCA</b>	Vector que no expresa alguna proteína (vacío)
<b>PCNA</b>	Antígeno celular de proliferación nuclear
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PE</b>	Promotor temprano del VPH
<b>PL</b>	Promotor tardío del VPH
<b>Poly I:C</b>	Polyinosinic: polycytidylic acid
<b>PRR</b>	Receptores de reconocimiento asociados a patógenos
<b>qPCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
<b>RFC</b>	Factor de Replicación C
<b>RII</b>	Respuesta Inmune Innata
<b>RIPA</b>	Buffer de radioinmunoprecipitación para lisis celular
<b>RLRs</b>	Receptores tipo RIG

<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA-seq</b>	Secuenciación del Transcriptoma Entero para Clonación al Azar
<b>RPA</b>	Proteínas de replicación A
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>RRP</b>	Papilomatosis respiratoria recurrente
<b>RT-PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcriptasa inversa
<b>ssDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico de una cadena
<b>STAT1</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción 1
<b>STAT2</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción 2
<b>STING</b>	Proteína estimuladora de genes de Interferón
<b>TLRs</b>	Receptores tipo Toll
<b>Tyk2</b>	Proteína Tirosina cinasa 2
<b>U-ISGF3</b>	Factor génico inducido por Interferón no fosforilado
<b>U-STAT</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción no fosforilado
<b>VPH</b>	Virus del Papiloma Humano
<b>VPH-AR</b>	Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo
<b>VPH-BR</b>	Virus del Papiloma Humano de Bajo Riesgo
<b>WB</b>	Western Blot

## 2. RESUMEN

La infección por la mayoría de los virus activa una serie de mecanismos de defensa inmunológica en las células, uno de estos mecanismos es la producción de Interferones de Tipo I cuya señalización paracrina activa la transcripción de genes inducidos por interferón (ISGs) a través de la vía JAK/STAT. Esta vía requiere la formación de un complejo de transcripción llamado factor génico inducido por interferón 3 (ISGF3), formado por STAT1 y STAT2 fosforilados, junto con el factor de transcripción IRF9. El ISGF3 se traslada al núcleo para unirse a secuencias de ADN específicas para activar la transcripción de más de 300 genes antivirales. A pesar de que la respuesta inmune ante infecciones virales es eficiente, los virus han desarrollado diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune antiviral, tal es el caso del Virus del Papiloma Humano (VPH) el cual es un virus pequeño de ADN causante de alrededor del 5% de los cánceres humanos. Estudios previos han demostrado que las oncoproteínas E5, E6 y E7 de los VPH-AR son capaces de modular la señalización de la vía de los IFNs; sin embargo, recientemente se ha propuesto que la proteína de expresión temprana E1 de los VPH de alto y bajo riesgo puede participar en la regulación de esta vía (James D et al., 2020). La principal función atribuida a E1 es la regulación de la replicación del DNA viral, además es la proteína viral más conservada dentro de los diferentes tipos del VPH y la única con actividad enzimática helicasa/ATPasa. Nuestro grupo de investigación demostró que las proteínas E1 de VPH de alto y bajo riesgo fueron capaces de modular la expresión de genes asociados con la respuesta inmune antiviral, así como la disminución de la expresión de IFN $\beta$ 1 e IFN $\lambda$ 1, en un contexto independiente de VPH en queratinocitos humanos. Lo cual sugiere que la proteína E1, además de ser necesaria en la replicación del genoma viral, podría estar implicada en la regulación de la vía de señalización de los ISGs. En el presente estudio evaluamos el efecto de la presencia de las proteínas E1 del VPH-16 y E1 del VPH-11 sobre la regulación de la vía de señalización de los ISGs, específicamente, sobre los componentes del complejo ISGF3. Se transfectaron células HaCaT con el vector control pCA y con los plásmidos que expresan E1 de HPV-11 o E1 de HPV-16. Como control de activación de la vía de los ISGs, las células se estimularon Poli I:C. Una vez que se confirmó la expresión de E1 a través del mRNA o proteína, se evaluaron los niveles de transcrito o proteína de los componentes del complejo ISGF3 (STAT1, STAT2, p-STAT1, p-STAT2 e IRF9). La proteína E1 de VPH-16 a diferencia de E1 de VPH-11, disminuyó significativamente los niveles de expresión de los mRNAs y proteínas STAT1, STAT2 e IRF-9, así como de mRNA de IFN $\beta$ 1 en las células HaCaT (queratinocitos), en ausencia y presencia de estímulo con Poli I:C. El presente estudio aporta evidencia de que la proteína E1 de VPH-16 participa en la desregulación de los componentes clave de la vía de los ISGs, con lo que probablemente podría favorecer el establecimiento de la infección, la persistencia viral y la inhibición de la activación de la respuesta inmune en las primeras etapas de la infección.

### 3. INTRODUCCIÓN

Los virus del papiloma humano (VPH) son pequeños virus de DNA que causan alrededor del 5% de todos los cánceres en humanos, incluidos casi todos los casos de cáncer de cuello uterino y una proporción significativa de cánceres anogenitales, de cavidad oral y de orofaringe (Morgan & McDonald, 2020).

Hasta la fecha, se han identificado más de 240 genotipos de VPH, los cuales se han clasificado en VPH de bajo y alto riesgo oncogénico (de Villiers *et al.*, 2004). Los tipos de VPH de bajo riesgo (VPH-BR) forman verrugas, pero rara vez se encuentran en tumores malignos. Sin embargo, entre las poblaciones susceptibles, los tipos de bajo riesgo pueden ser refractarios al tratamiento y mostrar patologías problemáticas, incluidas infecciones respiratorias como la papilomatosis respiratoria recurrente (RRP) y epidermodisplasia verruciforme (EV). En estas situaciones, a veces la presencia del virus se puede asociar con el desarrollo de cáncer (Egawa & Doorbar, 2017). Por su parte, los VPH de alto riesgo (VPH-AR) como los tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 70 se asocian con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer de la región anogenital, como el cáncer cérvico uterino, vagina, vulva, pene, ano, así como de cavidad oral y orofaringe, siendo los tipos de VPH-16 y -18 los más prevalentes (Doorbar *et al.*, 2015).

La mayoría de las infecciones por VPH son asintomáticas y se resuelven solas en ausencia de intervenciones médicas. Para ello, la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, así como barreras físicas, juegan un papel importante en el control de las infecciones tempranas por VPH. Sin embargo, el VPH ha desarrollado múltiples mecanismos para superar las defensas inmunitarias del huésped a través de la acción de las proteínas que los constituyen, lo que favorece su persistencia en los queratinocitos basales y conduce al desarrollo del cáncer (Westrich *et al.*, 2017).

Un componente clave de la respuesta inmune innata (RII) contra la infección por VPH, es la vía de señalización del Interferón (IFN) de tipo I (IFN-I) (Platanias, 2005), la cual se activa cuando los receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRRs), tales como los TLRs, RLRs y proteínas censoras de DNA citoplásmico, detectan la infección viral y activan los factores de respuesta de IFN (IRFs) que impulsan la expresión de IFN de tipo I (incluidos IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , entre otros) (Fensterl *et al.*, 2015). Los IFN-I secretados activan a sus receptores específicos (IFNAR1 e IFNAR2) tanto de manera autocrina como paracrina y promueven la fosforilación de las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT1 y STAT2). Estas junto con el factor de transcripción IRF9 conforman al complejo denominado factor génico inducido por IFN (ISGF3) el

cual se traslada al núcleo para promover la transcripción de una amplia gama de genes inducidos por IFN (ISGs) (Gutiérrez-Hoya & Soto-Cruz, 2020). Los productos de estos ISGs ejercen numerosas funciones efectoras antivirales. Entre esos productos se pueden encontrar: componentes de la vía de procesamiento y presentación de antígenos, factores que limitan intrínsecamente la replicación viral y los propios IFNs para propagar la respuesta (Fensterl *et al.*, 2015). Por lo tanto, los IFN- $\lambda$  inducen un estado antiviral intrínseco, tanto en las células infectadas como en las células vecinas (Wang *et al.*, 2021).

Estudios previos han demostrado que las oncoproteínas E5, E6 y E7 de los VPH-AR son capaces de modular la señalización de la vía de los IFNs, sin embargo, recientemente se ha propuesto que la proteína E1 de los VPH-BR y VPH-AR puede participar en la regulación de esta vía (James D *et al.*, 2020). Esa proteína está altamente conservada entre los diferentes tipos de VPH y es la única con actividad enzimática, se localiza en fracciones nucleares y citoplasmáticas, y su principal función descrita es su participación en la replicación del genoma viral dentro de la célula huésped (Bergvall *et al.*, 2013). En un estudio de Castillo *et al.* realizado en el 2014, se demostró que al silenciar el mRNA de E1 VPH-18 en células HeLa utilizando siRNAs, genes involucrados en la respuesta inmune del huésped fueron regulados a la baja, incluyendo algunos ISGs y genes implicados en la regulación del ciclo celular y apoptosis, lo cual sugirió que E1 tiene algún papel en la evasión de algunos mecanismos de respuesta inmune antiviral. Además, Castro Muñoz y colaboradores en 2019, demostraron el papel específico de la proteína E1 de VPH-16, -18 y -11, en un contexto independiente del VPH, mediante la transfección transitoria de E1 en células HaCaT. Al evaluar el efecto de la expresión de la proteína E1 en la regulación de perfiles de expresión génica celular a través de RNA-seq, se demostró que E1 indujo la regulación a la baja de genes de respuesta inmune, incluyendo IFN $\beta$ 1 e IFN $\lambda$ 1 y algunos ISGs, que son componentes importantes involucrados en la respuesta inmune innata antiviral. Estos resultados surgieron que E1 participa en la regulación de la vía de los ISGs durante la respuesta inmune antiviral en las etapas iniciales de la infección.

Tomando en consideración estos hallazgos, el objetivo del presente estudio fue determinar si los componentes del complejo ISGF3 (STAT1, STAT2 e IRF9) son regulados por la proteína E1 de VPH-11 y VPH-16. El conocer la intervención de las proteínas de VPH de expresión temprana, como E1, en la regulación de la respuesta inmune, ayudará a explicar por qué ciertas infecciones desaparecen mientras que otras se vuelven crónicas o latentes, además de impulsar el desarrollo de tratamientos novedosos para la reactivación de la inmunidad contra estos virus.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. Virus del Papiloma Humano

El Virus de Papiloma Humano (VPH) pertenece a la familia *Papillomaviridae*. Actualmente se han identificado más de 240 tipos distintos de VPH los cuales han evolucionado y gracias a ello han podido persistir en la población humana (Egawa & Doorbar, 2017). Los VPH se clasifican filogenéticamente de acuerdo con la homología de la secuencia de DNA del gen L1 (que codifica la proteína estructural de la cápside L1) en cinco géneros: *Alfa*, *Beta*, *Gamma*, *Mu* y *Nu* (De Villiers *et al.*, 2004). Los virus que componen cada género se han adaptado a distintos nichos ecológicos dentro de su huésped. Específicamente, los virus dentro de los géneros *Beta*, *Gamma*, *Mu* y *Nu* infectan el epitelio cutáneo, mientras que los virus dentro del género *Alfa* infectan tanto el epitelio cutáneo como el mucoso. Además de este tropismo tisular distinto, los virus dentro de estos géneros difieren en sus asociaciones con la enfermedad clínica (Doorbar *et al.*, 2015).

Los tipos de VPH del género *alfa* se clasifican, además, de acuerdo a su potencial oncogénico en VPH de bajo riesgo (VPH-BR) los cuales se asocian al desarrollo de verrugas genitales, papilomatosis respiratoria y lesiones cervicales de bajo grado, siendo los VPH-6 y -11 los tipos más prevalentes (Egawa & Doorbar, 2017) y en VPH de alto riesgo (VPH-AR) que se han asociado con el desarrollo de distintos tipos de cáncer como el cáncer de cérvix, vagina, vulva, pene, ano y cavidad oral, encontrando a VPH-16 y -18 como los más prevalentes en estos tipos de cáncer (Ma & Yang, 2021).

### 4.2. Genoma y ciclo replicativo de los VPH

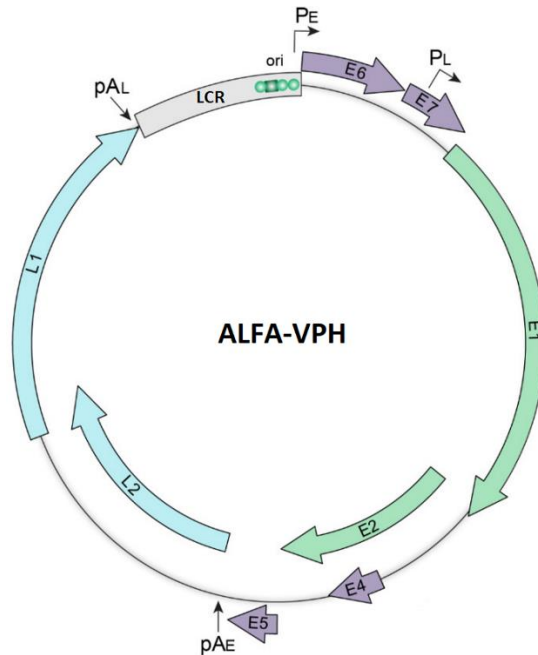
Los VPH son virus relativamente pequeños, sin envoltura, de aproximadamente 55 nm de diámetro. Poseen un genoma de DNA circular de doble cadena (de aproximadamente 8 kb de tamaño), el cual está organizado en tres regiones: la región de expresión temprana (E), la cual contiene los marcos de lectura abiertos (ORFs) de los genes E1, E2, E1<sup>^</sup>E4, E8<sup>^</sup>E2, E5, E6 y E7, necesarios para regular replicación viral y la regulación transcripcional durante las diferentes etapas del ciclo replicativo del virus; una región de expresión tardía (L) que codifica para las proteínas estructurales de la cápside (L1 y L2); y una región larga de control (LCR) no codificante que contiene sitios de unión para factores de transcripción celular, así como para la unión de las proteínas virales E1 y E2 que controlan la replicación viral y la expresión génica (Doorbar *et al.*, 2015).

La transcripción del genoma viral ocurre en tres fases (temprana, intermedia y tardía) y está íntimamente ligada al programa de diferenciación epitelial del huésped. La transcripción génica viral temprana se inicia a partir del promotor temprano (PE) en queratinocitos basales indiferenciados y termina en el sitio de poliadenilación temprana (pAE). En las células suprabasales, la transcripción intermedia se inicia desde el promotor tardío (PL) y termina en el sitio de poliadenilación temprano (pAE) (Graham, 2017). Esto da como resultado un aumento de los niveles de las proteínas de replicación E1 y E2 necesarias para la replicación del ADN viral durante la fase inicial y la fase intermedia (Della Fera *et al.*, 2021). Finalmente, la transcripción viral tardía se inicia desde el promotor tardío (PL) y termina en el sitio de poliadenilación tardía (pAL), lo que resulta en la expresión de las proteínas estructurales de la cápside L1 y L2 (Figura 1) (Graham, 2017).

Una de las principales diferencias que marcan los tipos de VPH de bajo riesgo (VPH-BR) de los de alto riesgo (VPH-AR) se centra en las distintas interacciones de las proteínas virales E6 y E7 con proteínas celulares (Egawa & Doorbar, 2017; Roman & Munger, 2013). Por ejemplo, una amplia gama de actividades biológicas y bioquímicas importantes están asociadas con las proteínas E6 y E7 de VPH-AR, incluida la modulación de las funciones de la proteína PDZ involucradas en la comunicación célula-célula (Vande Pol & Klingelutz, 2013). Además, en lugar de unirse a la ubiquitina ligasa E6AP, que es necesaria para la degradación de p53, las proteínas Beta HPV E6 reconocen un motivo similar pero sutilmente diferente en la proteína MAML, la cual es un componente de la vía de señalización de Notch. La pérdida progresiva de p53 mediada por E6 y la activación de hTERT, acompañadas de un grado comparable de inhibición de pRb mediada por E7, subyace a muchas de las propiedades oncogénicas y de transformación del VPH-AR. Una consecuencia importante de esto se refleja en la escasa capacidad de los tipos de VPH de bajo riesgo para impulsar la neoplasia y la progresión del cáncer (Tummers & Burg, 2015).

Por otra parte, la regulación de la expresión de los genes E6 y E7 se regula de manera muy diferente entre los tipos del VPH, por ejemplo; AR-VPH regula las proporciones E6/E7 mediante corte y empalme diferencial, llamado también splicing alternativo; mientras que los tipos de BR-VPH como el VPH-11, si bien sufren splicing alternativo en distintas regiones del genoma viral, el splicing no ocurre en los genes E6 y E7 y usan promotores separados para controlar la expresión de estos genes (Egawa & Doorbar, 2017).





**Figura 1. Mapa del genoma del VPH: Representación esquemática de un genoma de Alphapapillomavirus.** Las flechas en color verde, violeta y azul representan los marcos de lectura abiertos para los genes virales tempranos, genes virales accesorio y genes virales tardíos, respectivamente. La región reguladora no codificante (LCR) que se muestra en gris contiene elementos reguladores que incluyen el origen de la replicación (ori) que contiene sitios de unión para las proteínas de replicación E1 y E2 (indicadas por un cuadrado verde y círculos, respectivamente). Se indican los promotores temprano (PE), tardío (PL) y E8 (PE8), y los sitios de poliadenilación temprano (pAE) y tardío (pAL) (Modificado de Della Fera *et al.*, 2021).

### 4.3. Proteína E1 del VPH

La proteína E1 está codificada dentro de la región de expresión temprana por el marco de lectura abierto (ORF) más grande y conservado del genoma del VPH, además, está localizada en fracciones nucleares y citoplasmáticas y es la única proteína del VPH con actividad enzimática (Bergvall *et al.*, 2013).

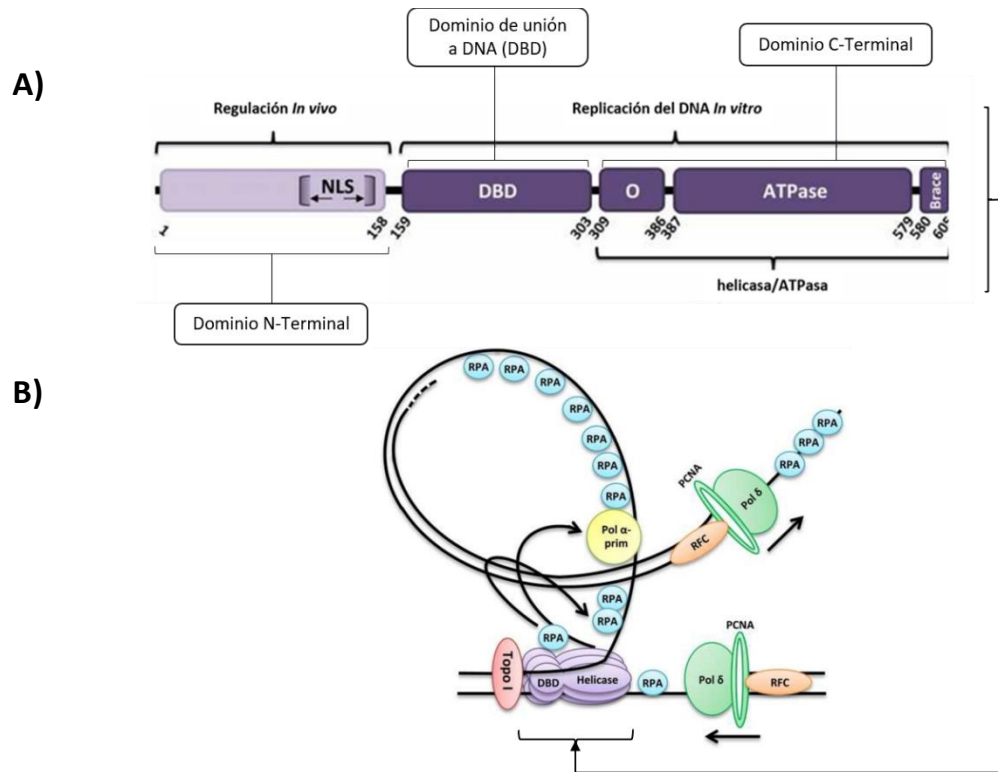
La proteína varía en tamaño de 600 a 650 aminoácidos, según el tipo de VPH. Esta proteína se puede dividir en tres segmentos funcionales: una región reguladora N-terminal que es esencial para una replicación óptima *in vivo* pero prescindible *in vitro* (Morin *et al.*, 2011), un dominio de unión al origen central (conocido como dominio de unión al DNA viral, DBD) que reconoce sitios específicos en el Ori (Auster & Joshua-Tor, 2004), y un dominio enzimático C-terminal suficiente para autoensamblarse en hexámeros que muestran actividad ATPasa y son capaces de desenrollar dúplex de DNA cortos (Figura 2) (Enemark & Joshua-Tor, 2006). El DBD y el dominio de helicasa C-terminal

(HD) son suficientes para la replicación de DNA viral dependiente de Ori in vitro y forman el núcleo del motor molecular que impulsa la replicación de DNA viral (Amin *et al.*, 2000).

La principal función atribuida a la proteína E1 está asociada a la replicación del DNA viral. E1 es una proteína iniciadora clásica y, como tal, desempeña varias funciones en la iniciación y catálisis de la síntesis del DNA viral. La replicación del genoma viral depende de la capacidad de E1 para interactuar con varias proteínas celulares de la maquinaria de replicación de la célula huésped como la  $\alpha$ -DNA polimerasa, las proteínas de replicación A (RPA), las topoisomerasas I y II, el antígeno celular de proliferación nuclear (PCNA) y el factor de replicación C (RFC) (Bergvall *et al.*, 2013).

En la Figura 2, se esquematiza el proceso mediante el cual se forma la horquilla de replicación del DNA del VPH, el cual comienza cuando la helicasa E1 rodea la plantilla de ssDNA para la síntesis de DNA de cadena principal, bombeando la plantilla de ssDNA a través del complejo E1 desde el lado E1-DBD hacia el lado E1 HD. La interacción de la topoisomerasa I (Topo I) (en rosa) con DBD ayuda tanto en la unión/especificidad del Ori de E1 como en los objetivos de Topo I al dsDNA entrante, donde su acción es necesaria para la progresión de la horquilla de replicación. La interacción de la RPA (en azul) con el DBD está involucrada en la carga de RPA en la plantilla de ssDNA de la hebra rezagada recién abierta por la acción de la helicasa E1. La interacción de la HD con la polimerasa  $\alpha$ -primasa (Pol  $\alpha$ -prim) (en amarillo) puede estimular la síntesis de cebadores. Como cada cebador corto de RNA-DNA es sintetizado por Pol  $\alpha$ -prim, el RFC (en naranja), en coordinación con RPA, evita la re-asociación de Pol  $\alpha$ -prim y carga PCNA (en verde) y DNA polimerasa  $\delta$  (en verde) en el extremo 3' del DNA empotrado, ensamblando un complejo polimerasa de DNA procesivo. Las diversas interacciones de E1 con Topo I, RPA y Pol  $\alpha$ -prim, así como las interacciones entre los propios factores celulares, se coordinan física y temporalmente de una manera secuencial altamente organizada necesaria para el ensamblaje y la función de la horquilla de replicación (Bergvall *et al.*, 2013).

Recientemente se ha demostrado que la proteína E1 también puede interactuar con otros elementos celulares que regulan algunos procesos epigenéticos, como la histona H1 y la Ini1 / hSNF5 que es una subunidad del complejo remodelador de cromatina SWI / SNF (Bergvall *et al.*, 2013). Por lo que, debido a esta capacidad de E1 para interactuar con diversas proteínas de la célula huésped, se sugirió que esta proteína también podría regular otros procesos celulares en el genoma del huésped, como la expresión génica.



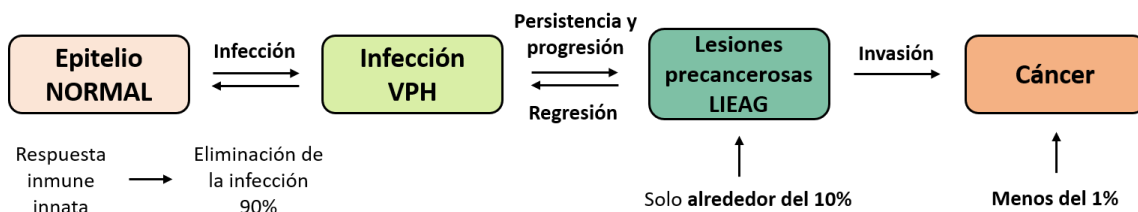
**Figura 2. Papel de la proteína E1 del VPH en la replicación del DNA viral.** A) Esquema representativo del dominio estructural de la proteína E1. La región reguladora N-terminal se muestra en violeta claro, mientras que los dominios necesarios para la replicación del DNA viral *in vitro* están coloreados en violeta intenso. El diagrama muestra las ubicaciones de la señal de localización nuclear bipartita (NLS), el dominio de unión al origen de replicación (DBD), el dominio de oligomerización mínima (O), el dominio de unión a ATP AAA+ y la llave C-terminal. Las últimas tres regiones comprenden el dominio helicasa (HD), como se indica. B) Modelo propuesto para la horquilla de replicación del DNA del virus del papiloma. La proteína E1 (en púrpura) se muestra orientada con su dominio de unión de origen N-terminal (DBD) mirando hacia el dsDNA desenrollado. Para simplificar, solo se muestra uno de los dos hexámeros (Bergvall *et al.*, 2013).

#### 4.4. Historia natural de la infección por VPH

La infección por el VPH es una enfermedad de transmisión sexual frecuente en la población sexualmente activa en todo el mundo. La infección por los diversos tipos de VPH da lugar a un espectro de manifestaciones clínicas y subclínicas, que van desde una infección asintomática hasta verrugas benignas o papilomas en la piel y los genitales (Colón-López *et al.*, 2012). Si bien, muchos VPH pueden considerarse comensales y parte del microbiota del tejido sano, la infección persistente a largo plazo por VPH-AR aumenta el riesgo de progresión oncogénica y puede conducir a un cáncer invasivo (Schiffman *et al.*, 2016).

Utilizando como ejemplo al curso habitual de la infección cervical por VPH, este consiste en la adquisición inicial, la persistencia de la infección y, con menor frecuencia, la progresión neoplásica (Figura 3) (Doorbar & Griffin, 2019). La infección natural por VPH rara vez persiste por más de 12 a 18 meses, por lo que, más del 90 % de las infecciones detectables se resuelven en etapas tempranas debido al sistema inmunitario, el cual elimina las infecciones y de esta manera las neoplasias pueden retroceder. Sin embargo, en un 10% de los casos puede ocurrir una persistencia de las infecciones, principalmente en aquellas infectadas por VPH-AR, conduciendo la progresión hacia la aparición de lesiones cervicales de bajo y alto grado, a estas últimas se les conoce también como lesiones precancerosas. Finalmente, se estima que una pequeña fracción de lesiones cervicales de alto grado (menos del 1%), evolucionará hacia un carcinoma invasivo (Maglennon *et al.*, 2011).

A pesar de que las respuestas inmunitarias innatas suelen ser capaces de eliminar infecciones incidentes en etapas iniciales, la propensión a la regresión de una lesión de VPH establecida depende de una respuesta sólida mediada por células (Schiffman *et al.*, 2016). Por lo que, la infección persistente por VPH ocurre en aquellas personas que no pueden generar las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas apropiadas (Della Fera *et al.*, 2021) y, a su vez, debido a que los VPH han desarrollado múltiples mecanismos para suprimir la respuesta inmune innata (James *et al.*, 2020).



**Figura 3. Historia natural de la infección por el Virus del Papiloma Humano oncogénico.** Modelo que muestra la progresión de la infección por VPH a cáncer invasivo. El sistema inmunitario innato contribuye al reconocimiento y la eliminación de las infecciones por VPH en etapas iniciales de la infección. Las células persistentemente infectadas pueden retroceder, pero con el tiempo pueden progresar a cáncer invasivo (Tomado y modificado de: Schiffman *et al.*, 2016; Moody & Laimonis, 2010).

#### 4.5. El papel de la repuesta inmune innata en el inicio de la repuesta antiviral

La inmunidad innata es una forma de inmunidad semi específica y ampliamente distribuida que representa la primera línea de defensa contra los patógenos (Kim & Ewbank, 2018). Este tipo de inmunidad es fundamental para mantener la homeostasis y prevenir la invasión de

microorganismos, eliminando una gran variedad de patógenos y contribuyendo con la activación de la respuesta inmune adaptativa. Los componentes de la inmunidad innata incluyen barreras físicas y químicas, componentes humorales y mediados por células, que están presentes en todos los vertebrados con mandíbula (Riera Romo *et al.*, 2016).

La inmunidad innata mediada por células, abarca prácticamente todos los tejidos e involucra células tanto de origen hematopoyético como no hematopoyético (Kaur & Secord, 2021). Las células de origen hematopoyético que participan en la inmunidad innata son macrófagos, mastocitos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y células asesinas naturales. Estas células portan receptores de reconocimiento codificados por la línea germinal (PRRs), se activan durante una respuesta inflamatoria y se diferencian en células efectoras de vida corta para eliminar la infección (Newton & Dixit, 2012).

El sistema de respuesta inmunitaria innata utiliza 3 estrategias primarias de reconocimiento ante patógenos. La primera estrategia es la activación de los receptores codificados en la línea germinal del sistema inmune innato, que son capaces de reconocer polisacáridos complejos, glicolípidos, lipoproteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos provenientes de patógenos, también conocidos como receptores de reconocimiento de patrones asociados a patógenos (PRRs) (Kim & Ewbank, 2018). Estos incluyen los receptores tipo Toll (TLRs), los receptores tipo NOD, los receptores de lectina tipo C, los receptores tipo RIG-I (RLRs) y los receptores tipo AIM2. Los TLRs y los receptores de lectina de tipo C se encuentran en la superficie celular o en los compartimentos de endocitosis. Los receptores similares a RIG-I, los receptores similares al dominio de oligomerización de nucleótidos (NLR) y los receptores similares a AIM2 están ubicados en el citoplasma y sensan los patógenos intracelulares (Iwasaki & Medzhitov, 2015).

Por otra parte, la segunda estrategia incluye a los componentes no hematopoyéticos o barreras físicas como la piel y las células epiteliales que recubren los tractos gastrointestinal, genitourinario y respiratorio (Riera Romo *et al.*, 2016). Estas defensas celulares se complementan además con la tercera estrategia, conformada por componentes humorales. Las secreciones mucosas y el plasma de todos los vertebrados están enriquecidos con proteínas circulantes con actividad antimicrobiana, que incluyen proteínas del complemento, proteína C reactiva, proteína de unión a lipopolisacáridos (LPS), otras pentraxinas, colectinas, péptidos antimicrobianos y citocinas (Kim & Ewbank, 2018).

Las citocinas son proteínas que median la comunicación entre las células y son esenciales para la respuesta inmune (Sokol & Luster, 2015). Estos factores solubles son uno de los elementos más

conservados de la inmunidad innata de los vertebrados. Las citocinas se subdividen en diferentes clases según sus regiones de codificación genómica, receptores diana, vías de señalización asociadas y funciones biológicas; estas clases incluyen interferones (IFNs), interleucinas (ILs), factores de necrosis tumoral (TNFs) y factores de crecimiento transformante (TGFs) (O'Shea *et al.*, 2002). Finalmente, la capacidad de un huésped para frenar una infección viral depende en gran medida de la eficacia de una respuesta inmunitaria innata antiviral inicial, lo que da como resultado la regulación positiva del interferón (IFN) regulada por los factores reguladores de Interferón (IRFs) y, posteriormente, los genes estimulados por IFN (ISG) (Jefferies, 2019).

#### **4.6. Los IRFs como reguladores de la expresión de Interferón**

Los factores reguladores de Interferón (IRFs) son una familia de factores de transcripción que regulan muchos aspectos de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, incluida la activación de respuestas antivirales, la respuesta a patógenos para impulsar respuestas proinflamatorias y la regulación de la diferenciación de células inmunitarias (Tamura *et al.*, 2008). Compuestos por 9 miembros de la familia, los IRFs comparten una homología significativa dentro de su dominio de unión a ADN (DBD) N-terminal de ~120 aminoácidos que forma un motivo hélice-bucle-hélice que reconoce secuencias de ADN específicas similares al elemento de respuesta estimulado por interferón (ISRE) (Jefferies, 2019). El dominio C terminal es más diverso entre los miembros de la familia y confiere su función única mediante la regulación de su capacidad para interactuar entre sí y con proteínas fuera de la familia IRF (Yanai *et al.*, 2012). En general, el dominio C terminal de cada miembro de IRFs contiene una secuencia de exportación nuclear, una secuencia autoinhibidora y un dominio de asociación de IRFs que para la mayoría de los miembros de la familia contiene residuos de serina que se fosforilan para regular la actividad. Los miembros de la familia IRF pueden homodimerizarse y heterodimerizarse (Tamura *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que IRF3, IRF5, IRF7 e IRF8 son reguladores positivos de la inducción del gen de Interferón tipo I en la señalización río bajo de los receptores de reconocimiento de patrones (Jefferies, 2019). Si bien IRF1 fue el primer IRF que se identificó como inductor de IFN de tipo I, análisis posteriores sugirieron que IRF1 no era esencial para la inducción de IFN en respuesta a virus citosólicos (Miyamoto *et al.*, 1988). IRF3 e IRF7, los dos miembros de la familia con mayor homología estructural, ahora se sabe que son los principales mediadores de la inducción de IFN, actuando río

abajo de los receptores de ARN y ADN citosólicos y los TLR (TLR3, TLR4, TLR7 y TLR9) (Wu & Chen, 2014). IRF3 se expresa de manera ubicua, mientras que IRF7 se expresa solo en niveles muy bajos, excepto en las células dendríticas plasmocitoides (pDC), donde es relativamente abundante (Fitzgerald *et al.*, 2003). Sin embargo, la expresión de IRF7 es inducida por IFN de tipo I, lo que da como resultado un bucle de retroalimentación que impulsa al máximo la expresión de IFN de tipo I (Jefferies, 2019). IRF3 se activa por fosforilación (por las quinasas TBK1 e IKKε), promoviendo la dimerización, la translocación nuclear, la asociación con el coactivador CREB-binding protein (CBP) y la unión a la secuencia canónica del elemento de respuesta al interferón (ISRE) en el promotor de IFN-β e IFN-α (Qin *et al.*, 2003). De manera similar, IRF7 es activado por TBK1/IKKε río abajo de los sensores de ARN/ADN citosólicos y las vías dependientes de TRIF (Fitzgerald *et al.*, 2003). Aquí, IRF7 puede homodimerizarse o heterodimerizarse con IRF3 para inducir la expresión de IFN-α/β (Takahasi *et al.*, 2003). Junto con IRF3 e IRF7, IRF5 es otro miembro importante de la familia involucrada en impulsar la producción de IFN. De hecho, un haplotipo de riesgo de IRF5 está asociado con SLE y da como resultado una mayor producción de IFN tipo I (Jefferies, 2019). Por lo cual, la actividad coordinada de IRF3, 5 y 7 río abajo de los diversos PRR determina el grado de inducción de IFN tipo I y el patrón de citocinas inducidas (Jefferies, 2019). En cuanto a qué IRF se activa en una situación dada, depende tanto de la señal de inicio como del tipo de célula involucrada. Por ejemplo, en células infectadas con el virus de Newcastle (NDV), el heterodímero IRF5/IRF7 tiene un efecto inhibitorio sobre el promotor *IFNA1*, mientras que IRF3 e IRF5 activan de manera cooperativa este promotor (Cheng *et al.*, 2006). Además, la sobreexpresión de IRF5 o IRF7 da como resultado la expresión de un conjunto diferente de subtipos de IFN-α, donde las células que sobreexpresan IRF5 impulsan principalmente la expresión de IFN-α8, mientras que las células que sobreexpresan IRF7 producen principalmente IFN-α1 (Barnes *et al.*, 2001). También se ha informado un papel para IRF8 en la estabilización de la maquinaria de transcripción basal en los promotores de IFN tipo I para mejorar la expresión de IFN en células dendríticas (DC) y monocitos (Tailor *et al.*, 2008).

Por lo tanto, existe la posibilidad de que los diferentes niveles de expresión de los miembros de la familia IRF en diferentes entornos de infección y enfermedad determinen el nivel y el subtipo de IFN de tipo I que se produce (Jefferies, 2019).

#### 4.7. Interferones en la respuesta antiviral

Los interferones (IFNs) son citocinas que actúan sobre las células para impartir resistencia a la replicación del virus. En general, la infección por virus desencadena la síntesis y secreción transitorias de IFN para promover la protección de las células aún no infectadas. Los IFNs inducen la transcripción de cientos de genes inducidos por IFN (ISGs), cuyos productos proteicos inhiben una variedad de pasos de la replicación del virus (Schneider *et al.*, 2014). Las proteínas ISG específicas son particularmente eficaces contra familias específicas de virus, y la protección óptima se logra mediante la inhibición de múltiples niveles de la replicación del virus por parte de diferentes proteínas ISG (Fensterl *et al.*, 2015).

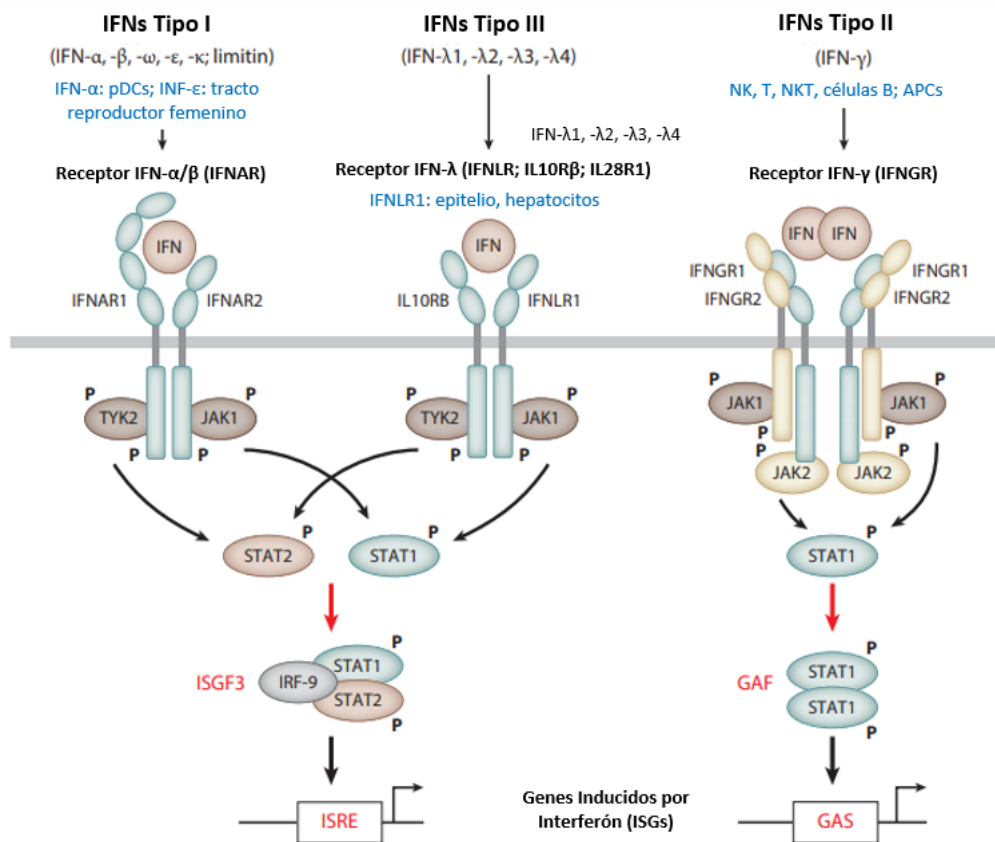
Los virus han desarrollado muchos mecanismos para evadir las acciones antivirales de los IFNs al bloquear su síntesis y sus acciones. Por tanto, in vivo, el sistema del IFN es el principal mediador del mantenimiento de la homeostasis del virus-huésped (Versteeg & García-Sastre, 2010). Además de sus efectos antivirales, los IFN afectan otras propiedades funcionales de las células, especialmente del sistema inmunitario (Platanias L., 2005). Por ejemplo, los IFN tipo I ejercen un efecto complejo sobre la diferenciación de células T CD4+, inhiben el desarrollo de células Th2 por la disminución de la expresión del factor de transcripción GATA3 y suprimen la diferenciación de células Th17 en ratones y seres humanos (González-Navajas *et al.*, 2012).

La clasificación de los IFNs se basa en los receptores de la superficie celular a los que se unen para activar las vías de señalización intracelular. Los IFNs tipo I, II y III se distinguen por sus distintos complejos de receptores de IFN (Figura 4) (Fensterl *et al.*, 2015). Los IFNs de tipo I (IFN-I) emiten señales a través del receptor heterodimérico IFN- $\alpha/\beta$  (IFNAR), que consta de IFNAR1 e IFNAR2; los IFNs de tipo I comprenden más de 10 subtipos de IFN- $\alpha$ , denominados IFN- $\alpha$ 1, - $\alpha$ 2, etc.; IFN- $\beta$ , - $\kappa$ , - $\omega$ , - $\epsilon$ ; y limitina. Los IFNs de tipo II (IFN-II) se unen al receptor tetramérico de IFN- $\gamma$  (IFNGR), que consta de dos subunidades, cada una de IFNGR1 e IFNGR2; El IFN- $\gamma$  es el único IFN-II conocido. Los IFN de tipo III (IFN-III), que comprenden IFN- $\lambda$ 1, - $\lambda$ 2, - $\lambda$ 3 y - $\lambda$ 4, desencadenan el receptor de IFN- $\lambda$  (IFNLR), un heterodímero de IFNLR1 e IL10RB (de Weerd & Nguyen, 2012).

Las respuestas biológicas a los tres tipos de IFN se superponen en algunos aspectos, como su capacidad para inhibir la replicación del virus en las células infectadas, pero muchos efectos de la señalización de IFN-I, -II y -III son distintos, especialmente in vivo. Estas diferencias se basan en gran medida en dos propiedades (Figura 4). En primer lugar, la expresión de un IFN o su receptor afín es



específica del tipo de célula o del tejido; no todos los IFN y todos los receptores son producidos por todas las células (Fensterl *et al.*, 2015). En segundo lugar, diferentes tipos de IFN activan diferentes factores de transcripción para inducir diferentes grupos de ISGs (Der *et al.*, 1998). Estos grandes conjuntos de genes solo se superponen parcialmente entre IFNAR, IFNLR e IFNGR. Los receptores IFNAR e IFNLR, aunque no están relacionados, usan la misma vía de señalización intracelular para activar el complejo denominado factor génico inducido por interferón 3 (ISGF3), que se une a la región de respuesta estimulada por IFN (ISRE) y, por lo tanto, inducen conjuntos similares de genes (Doyle *et al.*, 2006). El IFNGR, por su parte, activa el factor de transcripción activado por gamma (GAF), que induce diferentes genes. Según el tipo de célula, la señalización de IFNAR desencadena la activación de factores de transcripción adicionales, lo que conduce a una mayor diferenciación de las respuestas de IFN a través de la inducción diferencial de ISGs específicos (Platanias, 2005).



**Figura 4. Principales diferencias entre los sistemas IFN tipo I, II y III.** Cada tipo de IFN actúa a través de su propio receptor de superficie celular afín. Las cinasas JAK1, TYK2 y JAK2 fosforilan las proteínas STAT y desencadenan su actividad transcripcional. Los tres sistemas de señalización se distinguen por su expresión específica de tipo celular de IFN o su receptor (azul), así como por los diferentes factores de transcripción que activan (rojo). Abreviaturas: APC, célula presentadora de antígeno; GAS, sitio gamma activado; IFN, interferón; ISG, gen estimulado por interferón; ISRE, elemento de respuesta estimulado por IFN; NK, asesino natural; NKT, asesino natural T; pDC, célula dendrítica plasmacitoide (Tomado y modificado de: Fensterl *et al.*, 2015).

#### **4.8. Vía del Interferón Tipo I y de genes inducidos por Interferón (ISGs)**

Una vez que el IFN-I es secretado de manera autocrina y paracrina, se desencadena la vía de señalización de los ISGs que señala a través de la vía JAK/STAT (Fensterl *et al.*, 2015). Los IFN-I (tales como IFN $\alpha$  y  $\beta$ ) señalan a través de un complejo de receptor heterodimérico que comprende de IFNAR1 e IFNAR2 (Borden *et al.*, 2005). Después de la unión del IFN-I con su receptor, los factores de transcripción STAT1 y STAT2 se fosforilan por las cinasas asociadas al receptor, como JAK1 y TYK2 (Abbas *et al.*, 2015), dentro de esta vía STAT1 y STAT2 son mediadores críticos de la señalización del interferón (Fink & Grandvaux, 2013). Tras su fosforilación forman heterodímeros que a su vez reclutan al factor regulador de interferón-9 (IRF9) para formar al complejo ISGF3. El complejo ISGF3 se transloca al núcleo para unirse a ISRE, ubicada en regiones promotoras de más de 300 genes antivirales (ISGs) para inducir su expresión (Lazear *et al.*, 2019). Finalmente, los productos de estos ISGs ejercen numerosas funciones efectoras antivirales, los cuales incluyen: componentes de la vía de procesamiento y presentación de antígenos, factores que limitan intrínsecamente la replicación viral y los propios IFNs para propagar la respuesta (Fensterl *et al.*, 2015).

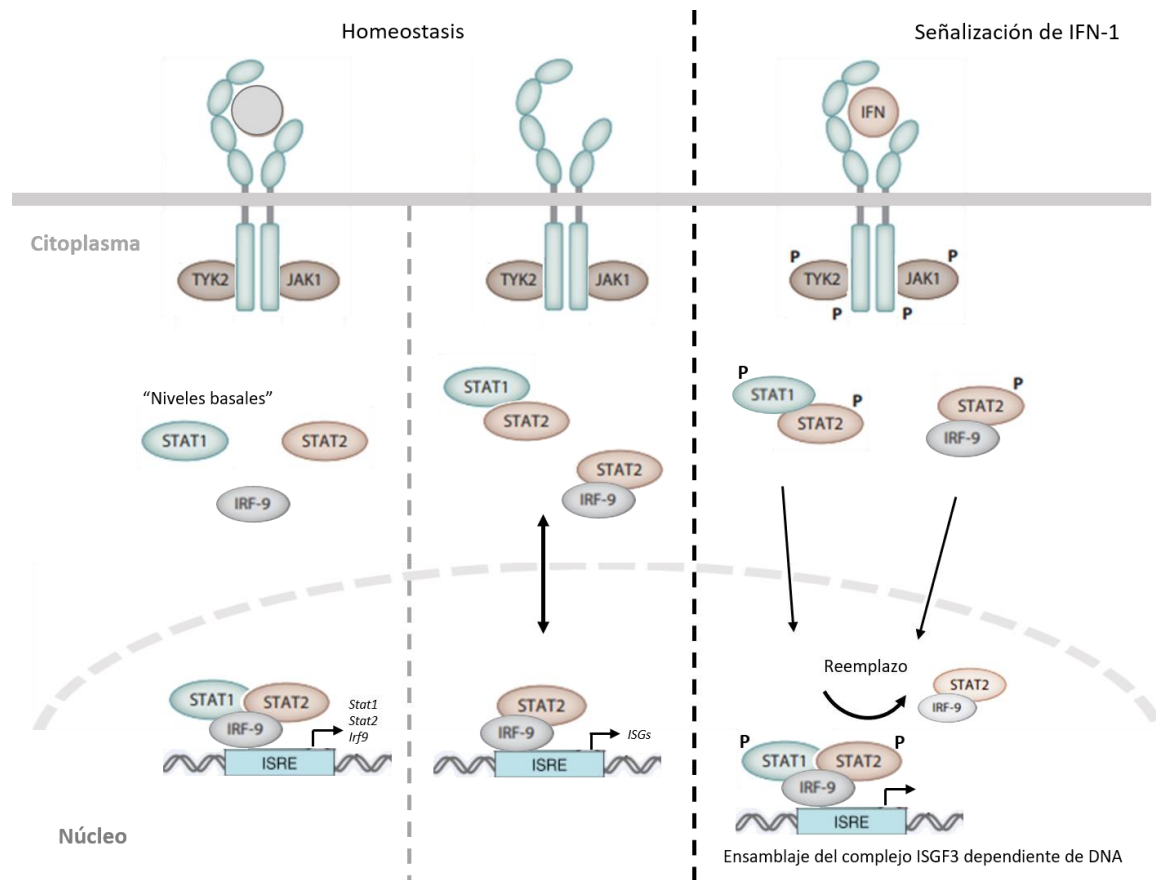
#### **4.9. Mecanismos de regulación de la vía de los ISGs**

Dado que el surgimiento de la inmunidad celular autónoma es una carrera entre la replicación del patógeno y los mecanismos restrictivos del huésped, la velocidad es un atributo crucial de la respuesta celular al IFN. Para ello, la expresión génica antimicrobiana debe cambiar rápidamente entre el estado de reposo y la transcripción en estado activo (Gutiérrez-Hoya & Soto-Cruz, 2020). Por lo tanto, existe una regulación tanto positiva como negativa de la señalización mediada por IFN-I y puede ocurrir en múltiples niveles; ya sea dentro de las vías de transducción de señales por internalización del receptor en endosomas después de la unión de IFN, lo que reduce temporalmente la capacidad de respuesta de la célula al IFN (Cheon *et al.*, 2013), o mediante la regulación de la activación de las cinasas JAK o de la fosforilación de las proteínas STAT, activando vías de señalización independientes de la vía JAK/STAT, a través de la regulación de elementos promotores de los ISGs mediante los IRFs y mediante la expresión de proteínas supresoras de la señalización de citocinas (SOCS) (Stanifer *et al.*, 2019).

Además de los mecanismos previamente mencionados, estudios recientes respaldan el concepto de que las células producen permanentemente una pequeña cantidad de IFN-I que estimula una señal

tónica baja del receptor de IFN-I. Se demostró que esto genera una respuesta transcripcional de referencia de ISGs (Michalska *et al.*, 2018). El aumento de la transcripción de ISGs por un estímulo de IFN desde los niveles basales hasta los inducidos, se ha comparado con la aceleración de un motor en marcha. En este sentido, según el paradigma general, la fosforilación de STAT1 y STAT2 en respuesta a IFN-I muestra un carácter robusto y transitorio. A esto le sigue un patrón de expresión ISGs similar que disminuye con el tiempo (Cheon *et al.*, 2013).

En base a esto, una gran variedad de estudios ha demostrado que el factor IRF1 participa en la regulación de la expresión de ISGs en respuesta a IFN-I al unirse directamente al elemento sensible a ISRE o IRF. Además, se está acumulando evidencia de un papel dependiente e independiente de IFN-I sobre los heterodímeros de STAT1-STAT2 no fosforilados (U-STAT1 y U-STAT2), con o sin IRF9, en la expresión de ISGs tanto basal como a largo plazo. Esta respuesta sostenida se basa en la expresión prolongada de los componentes STAT1, STAT2 e IRF9, así como del complejo ISGF3 como parte de un ciclo de retroalimentación positiva posterior al estímulo del receptor por IFN-I, por lo tanto, la fosforilación de estos complejos o factores de transcripción inducirá a una mayor respuesta antiviral (Figura 5) (Platanitis *et al.*, 2019).



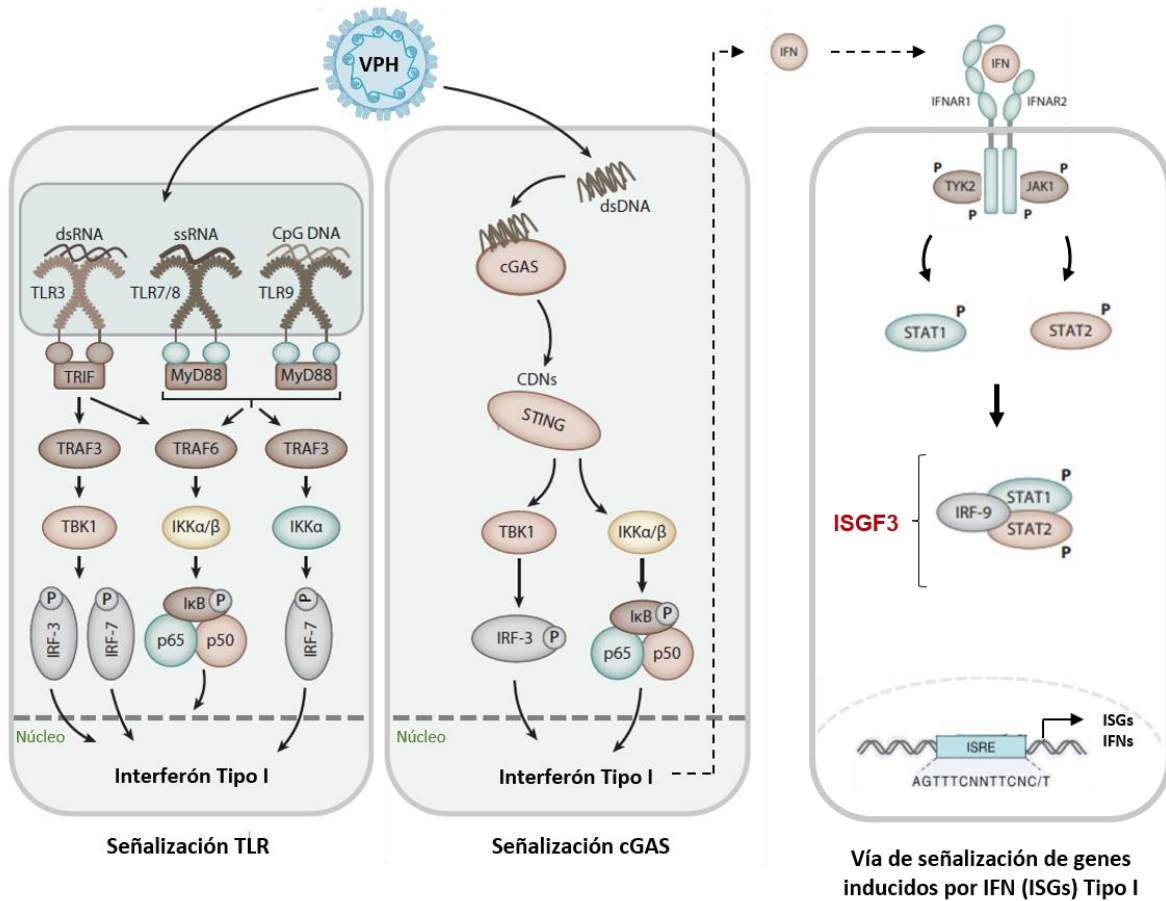
**Figura 5. Modelo del cambio molecular del reposo a la expresión génica inducida por IFN-I.** En condiciones homeostáticas, una señal tónica del receptor de IFN-I activa pequeñas cantidades de U-ISGF3, que aumenta la expresión basal de los genes que codifican las subunidades STAT1, STAT2 e IRF9, componentes de ISGF3. Esto provoca la formación constitutiva de los complejos U-STAT1 e U-STAT2, U-STAT2 e IRF9 o U-ISGF3 presentes tanto en el núcleo como en citoplasma. Además, la expresión basal de una gran fracción ISGs es estimulada por complejos U-STAT2-IRF9 que aparecen en el núcleo sin un requisito de señalización. Por otra parte, la señalización por el receptor de IFN-I al unirse con su ligando, provoca la formación de heterodímeros STAT1-STAT2 fosforilados en tirosina que se translocan al núcleo y forman al complejo ISGF3 fosforilado, el cual al asociarse a ISRE induce la expresión de una mayor cantidad de ISGs, además de aumentar la fosforilación de estos complejos para una respuesta más sostenida (Tomado y modificado de: Platanitis *et al.*, 2019; Fensterl *et al.*, 2015).

#### 4.10. La respuesta inmune innata contra la infección por el Virus del Papiloma Humano desencadena la producción de Interferones de Tipo I

Posterior a la infección por el VPH en los queratinocitos basales, éstos son capaces de controlar el proceso infeccioso por mecanismos de la respuesta inmune innata (Hebner & Laimins, 2006). En este contexto, un componente clave contra la infección viral es la vía de señalización del IFN-I y en consecuencia la expresión de ISGs, los cuales inhiben a diferentes niveles la replicación viral, ayudando al control del proceso infeccioso (Platanias, 2005). Los queratinocitos expresan receptores que son codificados por la línea germinal del sistema inmune innato conocidos como

receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como los TLRs lo cuales reconocen fragmentos de ácidos nucleicos virales (Hong & Laimins, 2017).

Ante la entrada del VPH a la célula, se sabe que diferentes sensores de ADN citoplasmático; como el receptor tipo Toll9 (TLR-9) y la proteína GMP-AMP sintasa cíclica (cGAS) principalmente, son capaces de reconocer al virus y desencadenar la vía del IFN-I (Motwani et al., 2019). Los receptores activados se unen a proteínas adaptadoras específicas para cada receptor como MyD88 y la proteína estimuladora de genes de interferón (STING) respectivamente, posteriormente las proteínas adaptadoras reclutan a las cinasas (TBK1) y la cinasa IκB (IKK) que fosforilan al factor regulador de interferón 3 (IRF3) y el inhibidor de NF-κB IκBα, respectivamente. Finalmente, estos factores de transcripción se translocan al núcleo y estimulan la transcripción de genes antivirales, promoviendo la expresión de IFNs, principalmente del tipo I y estos a su vez, son liberados para propagar la respuesta y activas la vía de los ISGs (Fensterl *et al.*, 2015). Por lo tanto, los IFN-I inducen un estado antiviral intrínseco, tanto en las células infectadas como en las células vecinas (Figura 6) (James *et al.*, 2020).



**Figura 6.** La respuesta inmune innata desencadenada por el Virus del Papiloma Humano induce la producción de Interferón de Tipo I y la activación de la vía de los ISGs. Posterior a la infección del VPH en los queratinocitos, las células controlan el proceso infeccioso gracias a que expresan receptores codificados por la línea germinal del sistema inmune innato como TLRs y proteínas censorsas de DNA citoplasmático como cGAS, los cuales desencadenarán una cascada de señalización que finalmente inducirá la expresión y liberación de IFN-I. Una vez que el IFN es secretado de manera autocrina y paracrina, se une a receptores específicos de IFN-I presentes en células adyacentes desencadenando la activación de la vía de señalización de los ISGs, cuya principal señalización es a través de la vía JAK/STAT (Tomado y modificado de: Fensterl *et al.*, 2015).

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1. Alteración de la vía del Interferón Tipo I y de genes inducidos por Interferón por virus oncogénicos

A pesar de que la respuesta inmune ante infecciones virales es eficiente, los virus han desarrollado diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune antiviral, como la inhibición de la expresión y secreción de IFN, de receptores de IFN y de componentes la vía de los ISGs (Fensterl *et al.*, 2015). Tal es el caso de algunos virus oncogénicos, por ejemplo, el virus de la Hepatitis C, donde se demostró que la proteína Core altera la vía de Jak-STAT al inducir la degradación de STAT1

dependiente del proteosoma (Lin *et al.*, 2005). Por su parte, también se ha demostrado que el virus del sarcoma de Kaposi a través de la proteína LANA-1 interfiere con la formación del complejo promotor de IFN $\beta$  compitiendo con la fijación de IRF-3 evitando su dimerización y posterior translocación al núcleo (Cloutier & Flamand, 2010). Así como la proteína Zta del virus del Epstein Barr, la cual activa a la proteína SOCS3 suprimiendo la secreción óptima de IFN $\alpha$  por los monocitos humanos (Michaud *et al.*, 2010).

Por otra parte, estudios previos han demostrado que el VPH puede modular la señalización de STAT1 y STAT2 mediante la interacción con proteínas como E5, E6 y E7 (Morgan *et al.*, 2020; Westrich & Joseph *et al.*, 2017). Por ejemplo, se ha demostrado que E7 del VPH-16 inhibe la expresión de IFN $\beta$  a través de la interacción de E7 con IRF-1 y del reclutamiento de la desacetilasa de histona 1 (HDAC1), favoreciendo la represión transcripcional (Park *et al.*, 2000). E7 del VPH-16 se une a IRF9, bloqueando la formación del complejo ISGF3 (Barnard & McMillan., 1999). Por su parte, E6 del VPH-16 puede interactuar con IRF-3 e inhibir su capacidad de transactivación a través de la interacción con el residuo Gal4 de IRF-3 (Ronco *et al.*, 1998), además E6 del VPH-18 interactúa con TYK2 resultando en una fosforilación alterada de IFNAR1 en la tirosina466 y, secuencialmente, en la inhibición de las fosforilaciones de STAT1 y STAT2 (Li S *et al.*, 1999). A su vez, la sobreexpresión E6 y E7 del VPH-16 en células de queratinocitos inmortalizados con telomerasa (N/Tert-1) reprimieron la expresión de algunos ISGs como IFN $\kappa$  e IFIT1 (James *et al.*, 2020). Como consecuencia de estas y otras interacciones las oncoproteínas del VPH desregulan a componentes claves de la vía de IFN-I y de ISGs favoreciendo el establecimiento de la infección y la persistencia viral (Chang & Laimins, 2000).

## **5.2. Regulación de la vía de Interferón y de genes inducidos por Interferón por la proteína E1 del VPH**

Recientemente se ha propuesto que la proteína de expresión temprana E1, de los VPH-BR y VPH-AR, también puede jugar un papel importante en la mitigación de la capacidad del huésped para defenderse contra la infección viral (Castro-Muñoz *et al.*, 2019).

En un estudio realizado por Castillo y colaboradores en 2014, se reportaron cambios en la expresión génica producidos después del silenciamiento de la expresión de E1 del VPH-18 en células HeLa. En particular 4 conjuntos de genes fueron desregulados, principalmente los que están involucrados en

mecanismos de defensa contra infecciones virales, tales como genes de señalización de TLR, genes relacionados con la señalización del IFN, señalización de apoptosis, así como un conjunto de ISGs, indicando que, además de su conocido papel en la replicación viral, la proteína E1 también puede alterar la vía de los IFNs en diferentes niveles.

De manera interesante, un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo demostró que la presencia de la proteína E1 del VPH tipo -16, -18 y -11 en células HaCaT, desreguló genes asociados a procesos de respuesta inmune antiviral, entre ellos IRF9, STAT2 y algunos ISGs. De manera interesante, los niveles de mRNA de IFN $\beta$ 1 e IFN $\lambda$ 1 disminuyeron en presencia E1, incluso después de la estimulación con Poli I:C el cual simula una infección viral, lo que nos indica que la regulación a la baja de estos interferones inducida por las proteínas E1 a nivel transcripcional, podría tener un impacto durante un desafío de infección por el VPH en queratinocitos inmortalizados. Además, la infección con cada uno de los tres tipos virales disminuyeron la expresión de algunos ISGs tales como IFIT2, CCL5 (RANTES), y RSAD2 (Viperin) (Castro-Muñoz *et al.*, 2019) estos resultados sugieren que las proteínas E1 del VPH-BR y VPH-AR participan en la evasión de la respuesta inmune innata durante las etapas tempranas de infección, conduciendo de esta manera hacia la persistencia; sin embargo, los mecanismos por los cuales las proteínas E1 modulan este proceso aún son desconocidos.

## 6. JUSTIFICACIÓN

Los virus han desarrollado diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune antiviral, como la inhibición de la expresión y producción de IFNs y de componentes de la vía de los ISGs. Se ha demostrado que la proteína E1 de los VPH de bajo y alto riesgo disminuyen la expresión de IFN $\beta$ 1, IFN $\lambda$ 1 y de algunos ISGs (RANTES, Viperin, IFIT2). Sin embargo, los mecanismos por los cuales las proteínas E1 modulan este proceso aún son desconocidos. Por lo que, en este estudio, resulta de interés determinar si la proteína E1 de VPH-11 y VPH-16 regula la expresión y activación de los componentes del complejo ISGF3 (STAT1, STAT2 e IRF9) de la vía de los ISGs, lo cual ayudaría a comprender los mecanismos utilizados por la proteína E1 para favorecer la evasión de la vía de los ISGs en la respuesta inmune innata antiviral y de esta manera contribuir en el establecimiento de la infección en etapas iniciales de la infección.



## **7. HIPÓTESIS**

Las proteínas E1 del VPH-11 y VPH-16 disminuyen la expresión de los componentes de la vía de señalización de los ISGs (STAT1-STAT2 e IRF9), inhibiendo la expresión de genes inducidos por interferón.

## **8. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la expresión de las proteínas E1 del VPH-11 y VPH-16 sobre la expresión y función de los componentes del complejo ISGF3 (STAT1, STAT2 e IRF9) en la línea celular HaCaT.

## **9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Determinar la expresión de E1 del VPH-11 y -16 en la línea celular HaCaT 24h post-transfección en células estimuladas y no estimuladas con Poli I: C.
- 2) Evaluar el efecto de E1 del VPH-11 y -16 sobre los niveles de transcrito de los componentes del complejo ISGF3 (STAT1, STAT2 e IRF9) en células estimuladas y no estimuladas con Poli I: C.
- 3) Determinar el efecto de E1 del VPH-11 y -16 sobre los niveles de proteína y el estado de fosforilación de los componentes del complejo ISGF3 (STAT1, STAT2 e IRF9) en células estimuladas y no estimuladas con Poli I: C.
- 4) Evaluar el efecto de E1 del VPH-11 y -16 sobre los niveles de transcrito de IFN $\beta$ 1 en células estimuladas y no estimuladas con Poli I: C.

## **10. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

Como modelo se utilizó a la línea celular HaCaT que corresponde a queratinocitos humanos inmortalizados negativos a la presencia del virus del VPH. Se realizaron transfecciones transitorias utilizando plásmidos que codifican para la proteína E1 del VPH-11 o E1 del VPH-16 marcadas con un tag de HA para su detección y como control de transfección se utilizó el plásmido vacío pCA. Para

evaluar el efecto de E1 sobre la regulación de los componentes del complejo ISGF3, estas células fueron cultivadas bajo las siguientes condiciones: Sin estímulo de Poli I:C o con estímulo de Poli I:C utilizando la concentración final de 0.02µg/µl. Previamente se seleccionó esta concentración mediante una curva, debido a que fue en esta concentración que se detectó una activación de la vía y aumento en los niveles de los componentes del complejo y, a su vez, se comenzó a detectar el efecto de la proteína E1 sobre los componentes del complejo.

Después de 24h de la transfección y/o estímulo se procedió a la extracción de RNA y proteína para corroborar la expresión de E1 mediante RT-PCR y Western Blot (WB), respectivamente. Para evaluar la expresión de los componentes del factor ISGF3 (STAT1, STAT2 e IRF9) se realizaron ensayos de qPCR y para evaluar niveles proteicos y de fosforilación se realizaron ensayos de Western blot (WB).

## **11. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **11.1. Cultivo celular**

Se empleó la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT, negativa a la presencia del VPH. La línea celular HaCaT fue mantenida en medio Eagle de Dulbecco modificado F12 (DMEM-F12) enriquecido con suero bovino fetal al 10% a 37°C en ambiente húmedo y CO<sub>2</sub> al 5%.

### **11.2. Plásmidos**

Se usaron dos plásmidos para expresar la proteína E1 de los VPH-11 y 16 y un plásmido vacío como control de transfección. El plásmido pMHPV11 E1HA que expresa la proteína E1 de VPH 11 (VPH-BR) y el plásmido pMHPV16 E1HA que expresa la proteína E1 del VPH16 (VPH-AR), los cuales contienen un Flag de hemaglutinina (HA), ambos plásmidos fueron donados amablemente por el Dr. Mart Ustav, Institute of Molecular and Cell Biology, Institute of Technology, University of Tartu, Estonia (Anexo 1). El plásmido pCA se usó como plásmido control al carecer de secuencias codificantes de E1.

## 11.3. Transformación bacteriana

### 11.3.1. Generación de bacterias competentes

Para amplificar los plásmidos estos fueron clonados en bacterias competentes de la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*, para ello se realizó el método de CaCl<sub>2</sub>. Brevemente, se utilizaron 50mL de medio Luria Berth (LB) para cultivar las bacterias hasta alcanzar una DO 600=0.4, estas se incubaron en hielo durante 15 min, posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm / 4°C por 10 min. El botón celular se re suspendió en una solución fría de CaCl<sub>2</sub>-Tris pH 7.5 y se incubó 30 min en hielo, las bacterias se centrifugaron nuevamente a 2500 rpm / 4°C / 10 min para finalmente re suspender el botón celular en 3.3 mL del mismo buffer.

### 11.3.2. Transformación

Se colocaron tubos en hielo a los cuales se les agregaron por separado 100 ng de cada plásmido. Posteriormente a cada tubo se le añadieron 200 $\mu$ L de las bacterias competentes y se incubaron por 30 min en hielo. Tras la incubación, los tubos con las bacterias se incubaron a 42°C por 2 min y nuevamente se colocaron en hielo por 5 min para generar un choque térmico. A continuación, se añadieron 800 $\mu$ L de LB estéril a los tubos y se incubaron por 1h a 37°C en agitación constante a 300 rpm. Al finalizar el tiempo de incubación, alícuotas de las bacterias se sembraron por separado mediante estría masiva en placas LB suplementadas con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina como medio de selección y se incubaron a 37°C durante toda la noche para la obtención de colonias transformantes.

### 11.3.3. Aislamiento y purificación de DNA de plásmidos de expresión

Los diferentes plásmidos fueron aislados y purificados utilizando el kit PureLink™ Hi Pure Plasmid Filter Maxiprep Kit® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se seleccionó una colonia de las placas de selección positiva de transformación para ser inoculada en agar LB con ampicilina mediante la técnica de estría aislada. Las placas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se seleccionó una colonia aislada de cada cultivo para ser inoculada en 5mL de LB con ampicilina en agitación constante durante 6-8h. El cultivo inicial se diluyó en 300mL de LB estéril y nuevamente se incubó a 37°C en agitación constante toda la noche. Al día siguiente, las bacterias fueron centrifugadas a 6000xg durante 10 min a 4°C, el botón celular se re suspendió en 10mL del buffer de re suspensión R3 con RNasa A, posteriormente

se añadieron 10mL del buffer de lisis L7, mezclando cuidadosamente por inversión y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, se añadieron 10mL de buffer de precipitación (N3) mezclando por inversión. El lisado celular resultante se centrifugó a 12500xg durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se vertió cuidadosamente en una columna previamente equilibrada con buffer EQ1, permitiendo que la solución se drenara por gravedad. A continuación, se añadieron 60mL de buffer de lavado W8 a la columna, cuando todo el fluido se descartó, se añadieron a la columna 15mL del buffer de elusión E4, permitiendo un flujo por gravedad en un tubo estéril. La solución eluída contenía el DNA purificado que fue precipitado con 10.5mL de isopropanol y se centrifugó a 12500xg por 5 min a 4°C descartando el sobrenadante. El DNA se lavó una vez con 5mL de etanol al 70%, descartando el sobrenadante. El botón de DNA purificado se re suspendió en buffer TE y se determinó la concentración e índice de pureza mediante el equipo NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™). Los plásmidos fueron almacenados a -20°C. Finalmente, los plásmidos fueron secuenciados y alineados con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment sequence Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S, [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) verificando su identidad.

#### *11.3.4. Transfección*

Para transferir el material genético a las células HaCaT en cultivo, se empleó el método químico de dendrímeros activados utilizando el reactivo Polyfectamine (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante en condiciones de esterilidad. Se sembraron 350,000 células HaCaT en placas de 60mm y se incubaron durante 24h para permitir la adherencia y una confluencia del 70 al 80%. Posteriormente, se aspiró el medio y se añadió 1mL de medio de cultivo nuevo, tras lo cual se transfectaron los plásmidos correspondientes. Previamente en tubos eppendorf se realizó la formación de los dendrímeros activados que contenían los plásmidos correspondientes, para ello se añadieron 100µL de medio OPTIMEM sin suero y en seguida se añadieron 4.5µg del plásmido pCA como control de transfección, 4.5µg del plásmido pMHPV11 E1HA y 4.5µg pMHPV16 E1HA, respetivamente por cada 700 000 células. Para estimular la activación de la vía de los ISGs, se trataron los cultivos respectivos utilizando el reactivo ácido poliinosínico-policitidílico (Poli I:C) (Merck) el cual es un análogo sintético de RNA viral de doble cadena e induce a la producción de IFNβ1 a través de la activación del receptor 3 tipo Toll (TLR3), imitando la entrada de un ácido nucléico de origen viral a la célula. Para ello, en tubos eppendorf se añadieron las mismas cantidades

de los plásmidos correspondientes y 10µl de una dilución previa de Poli I:C en medio OPTIMEM sin suero, para una concentración final de 0.02 µg/µl por cada 700 000 células. Todas las mezclas se incubaron durante 5 min y posteriormente se les añadió 8µl del reactivo Polyfectamine (Qiagen, Hilden Alemania) y se re suspendió lentamente. Las mezclas se incubaron por 35 min a temperatura ambiente, finalizado este tiempo, se les agregó 800 µl de medio DMEMF-12 con suero fetal bovino al 10%. Posteriormente, las mezclas finales se agregaron sobre la monocapa celular y se incubaron durante 24h a 37°C en ambiente húmedo y CO2 al 5%. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo fue retirado y las células transfectadas se usaron para realizar los diferentes ensayos

#### 11.4. Obtención de RNA y síntesis de cDNA

Células HaCaT fueron sembradas en placas de 60mm por triplicado, posteriormente las células fueron transfectadas con las diferentes condiciones siguiendo el protocolo previamente mencionado. Después de 24h post-transfección, se obtuvo el RNA total de cada condición utilizando el RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las especificaciones del fabricante. El RNA obtenido se re suspendió en 30uL de H<sub>2</sub>O libre de RNasas, posteriormente fue tratado para asegurar la eliminación del DNA con el kit DNase Free DNA removal kit (Thermo Fisher Scientific, Wlatham, MA USA). Se utilizaron 500ng de RNA para la reverso-transcripción (RT) utilizando el Kit High-Capacity RNA-to-cDNA (ThermoFisher Scientific). La expresión de E1 de los diferentes tipos de VPH fue verificado mediante PCR punto final utilizando primers específicos enlistados en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Secuencias de los primers utilizados para amplificar los genes E1 de VPH-11, -16 y a los componentes del complejo ISGF3 (STAT1, STAT2 e IRF9).

<i>Gene</i>	<i>Forward 5'</i>	<i>Reverse 3'</i>	<i>Fragmento (bp)</i>
E1 VPH-11	GTGTACAGGATGGTTTATGG	TGTCATCAATAAAGTCCACC	150
E1 VPH-16	GGTTACAACCATTAGCAGAT	ACCAATGGTCTATGCTTTAC	200
18s	AACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	140
IFNβ1	GCCAAGGAGTACAGTCACTG	TGAAGCAATTGTCCAGTCCC	100
STAT1	GAGGGTCTCTCATCGTTACT	AGGTCGTCTCGAGGTCAATTA	94
STAT2	CAGGCTCATTGTGGTCTCTAA	GCCCTAGTTCAGCTCTAATG	101
IRF9	CTGAGCCCTACAAGGTGTATC	GAAGTGTGCTGTGCGCTTTG	94

## 11.5. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Las células HaCaT fueron transfectadas con los plásmidos que expresan a E1 del VPH de cada tipo viral, así como con el plásmido pCA en presencia o ausencia de estímulo con 0.02µg Poli I:C. A continuación, 500µg de RNA de cada condición fue reverso-transcrito, utilizando el Kit High-Capacity RNA-to-cDNA (ThermoFisher Scientific). Se evaluó la expresión de los genes IFNβ1, STAT1, STAT2 e IRF9 mediante qPCR utilizando primers específicos para cada gen, los cuales se enlistan en la tabla 1. Como control de expresión constitutiva se utilizó el gen 18S. Los resultados fueron presentados como una cuantificación relativa utilizando el método de  $\Delta\Delta C_t$  (Schmittgen y Livak, 2008).

## 11.6. Western Blot

Para detectar los niveles de proteína de E1 del VPH-11 y -16, así como los niveles proteicos de los componentes del complejo ISGF3, se realizaron ensayos de Western Blot utilizando proteínas totales obtenidas de las células HaCaT 24h post-transfección.

### 11.6.1. Extracción de proteínas

De las células HaCaT transfectadas se obtuvieron extractos proteicos totales a las 24h post-transfección de los cultivos con las diferentes condiciones, para lo cual se les retiró el medio de cultivo y se lavaron tres veces con 2mL de PBS estéril. Posteriormente, las cajas con los cultivos se colocaron sobre hielo y se añadieron 100µL del buffer RIPA con inhibidores de fosfatasa. Las células fueron recolectadas utilizando un gendarme. El raspado se pasó de 10-15 veces con una jeringa de 1mL, el lisado resultante se conservó a -80°C.

### 11.6.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE)

Se realizó una electroforesis en medio desnaturizante con el fin de separar de acuerdo al peso molecular, las proteínas presentes en las muestras. Previamente se realizó una cuantificación de proteína total a las muestras, utilizando el método de ácido bicinonínico. A cada muestra se le adicionó el volumen necesario de buffer de carga (Laemmli Sample Buffer, Bio Rad) con una relación 1:1 (v: v), a continuación, se colocaron en un baño de agua en ebullición durante 15 minutos. Las muestras fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 8% y 10 %. La electroforesis se llevó a cabo usando buffer de corrida 1X a 80 V hasta que el frente de migración salió del gel.

### *11.6.3. Transferencia*

Una vez que la electroforesis se completó, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de nitrocelulosa con poros de 0.2  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad®) en una cámara con buffer de transferencia 1X a 100V durante 2h en frío. Para corroborar la transferencia de proteínas, la membrana se tiñó con una solución de Rojo Ponceau, el cual se une al extremo amino de las proteínas, posteriormente la membrana se lavó con solución salina-Tris y Tween (TBS-T)1X hasta eliminar el colorante.

### *11.6.4. Bloqueo de membrana e incubación de anticuerpos primarios y secundarios*

La membrana se bloqueó con una solución de BSA al 7.5 % en TBS-T 1X durante 1h a 37°C en agitación. Al finalizar el bloqueo se realizó 1 lavado de 5 minutos con TBS-T 1X. Posteriormente, la membrana fue incubada con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C en agitación. Des pues de la incubación, se realizaron tres lavados con TBS-T 1X en agitación durante 10 min. Finalmente, la membrana fue incubada con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 h a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-T 1X.

### *11.6.5. Anticuerpos*

Los anticuerpos primarios empleados fueron: anti-HA (1:1000, Cell Signaling), anti-STAT1 (1:1000, BD Bioscience), anti-Phospho-Stat1 (Tyr701) (1:1000, Cell Signaling), anti-STAT2 (1:5000, Abcam), anti-Phospho-STAT2 (Tyr689) (1:500, Merk Millipore), anti- IRF-9 (1:1500, Cell Signaling), los cuales fueron diluídos en TBS-T 1X con BSA al 2.5%. Como control de carga se emplearon los anticuerpos anti- Alpha-Actinina (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA) y anti-GAPDH (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA). Los anticuerpos secundarios empleados en este trabajo fueron anti-rabbit y anti-mouse (1:10000, Santa Cruz Biotechnology, USA), acoplados a peroxidasa de rábano (HRP), los cuales se diluyeron en TBS-T 1X.

### *11.6.6. Revelado de la presencia de proteínas*

La detección de las proteínas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia de alta sensibilidad, en este método el peróxido del luminol y un activador son sustratos de la peroxidasa acoplada al

anticuerpo secundario las cuales reaccionan y producen luminiscencia permitiendo la detección mediante placas radiográficas usando el reactivo ECL (Amersham).

### **11.7. Análisis Estadístico**

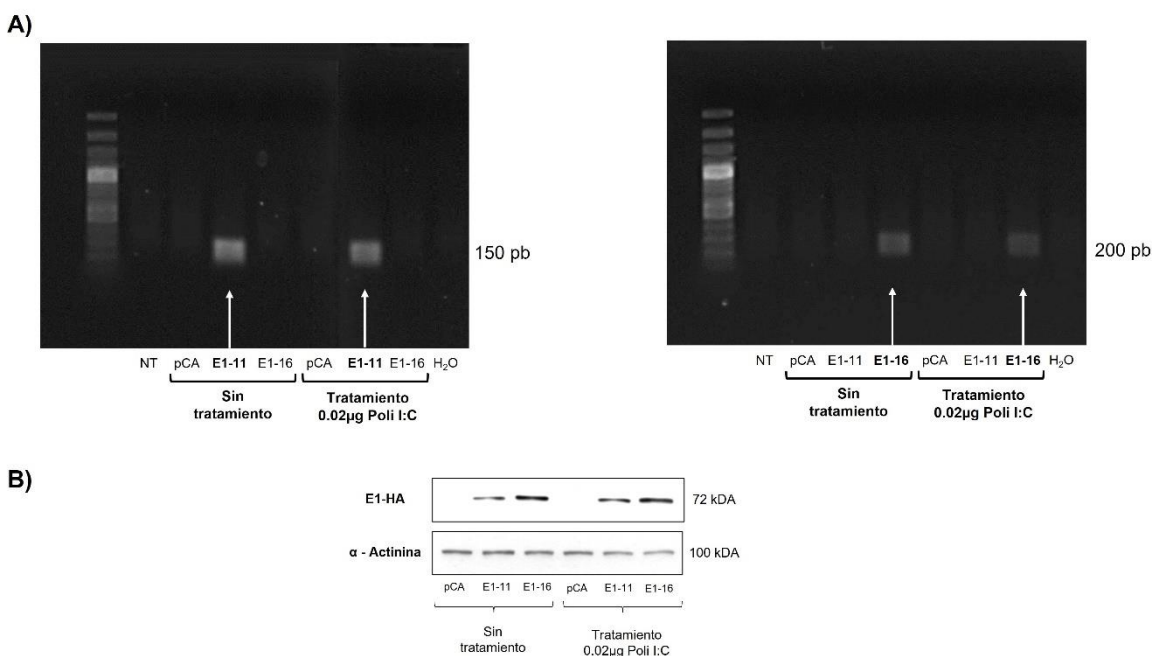
Los datos que muestran los efectos de E1 VPH-11 y -16 fueron comparados contra el control pCA de los diferentes ensayos, ya sea en ausencia o presencia del estímulo de Poli I:C y fueron presentados como promedios  $\pm$  SD. El valor de p se calculó mediante la prueba Mann-Whitney U para datos no paramétricos. Las diferencias fueron consideradas significativas con un valor de  $p \leq 0.05$ .



## 12. RESULTADOS

### 12.1. Expresión y niveles de E1 del VPH en la línea celular HaCaT

Para evaluar el efecto de la proteína E1 de los VPH-11 y -16 en la línea celular HaCaT, se realizaron transfecciones transitorias utilizando plásmidos que contienen las secuencias correspondientes para E1 de los diferentes tipos virales. Una vez realizadas las transfecciones, se verificó la expresión de E1 a nivel de mRNA mediante RT-PCR. La Figura 7A muestra un gel de agarosa al 1% en donde se observan los productos de PCR de aproximadamente 200 pb que corresponden a la amplificación de un fragmento de E1 de cada tipo viral, en las células transfectadas tanto en ausencia como en presencia del estímulo con 0.02µg de Poli I:C, demostrando que en ambas condiciones las células expresan E1 a nivel de mRNA. Posteriormente, se determinaron los niveles de la proteína E1 en las células HaCaT 24 h post-transfección (Anexo 2). En la Figura 7B se muestra el resultado del Western Blot en donde se observó una banda de aproximadamente 72 kDa, que corresponde al peso molecular de E1, esta banda no se observó en el control de transfección pCA. En la Figura 7B se muestra el resultado del Western Blot en donde se observó una banda de aproximadamente 72 kDa, que corresponde al peso molecular de E1, esta banda no se observó en el control de transfección pCA.

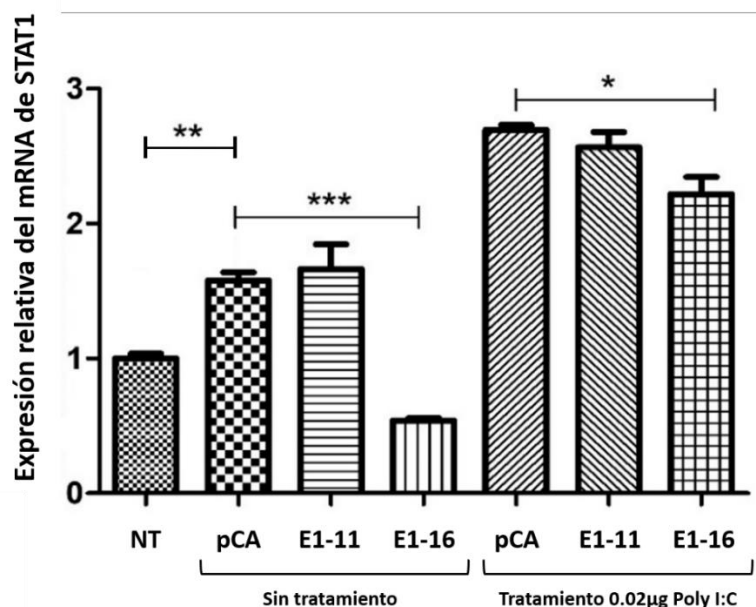


**Figura 7. Expresión de E1 del VPH-11 y -16 en células HaCaT. A)** Células HaCaT fueron transfectadas con el gen de E1 del VPH-11 o VPH-16. La expresión del mRNA de E1 se verificó mediante RT-PCR. Se muestran los productos de amplificación de 200pb del gen de E1 de VPH-11 y VPH-16 en un gel de agarosa al 1%. **B)** Ensayo de Western Blot que muestra la presencia de la proteína E1 del VPH-11 y -16 24 h post-transfección. Se observa una banda de aproximadamente 72kDa que corresponde al peso de E1, la cual no se observa en el control (pCA). La proteína  $\alpha$ - Actinina fue empleada como control de carga. HA-E1, proteína E1 unida a hemaglutinina.

## **12.2. La proteína E1 del VPH-16 disminuye los niveles de expresión del mRNA de STAT1 en células HaCaT cultivadas en presencia o ausencia de Poli I:C**

STAT1 tiene un papel clave en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa al inducir cambios transcripcionales en respuesta a citocinas, como todos los tipos de interferones (IFN) (Parrini *et al.*, 2018). STAT1 existe como dos isoformas de empalme, STAT1 $\alpha$  y STAT1 $\beta$ , que difieren en lo que respecta al dominio de transactivación C-terminal (TAD). STAT1 $\beta$  carece del TAD C-terminal y se ha informado previamente que es un activador transcripcional más débil que STAT1 $\alpha$ , aunque esto depende en gran medida del gen diana (Meissl *et al.*, 2020). El mecanismo de estos efectos dependientes del contexto sigue sin estar claro; sin embargo, se sabe que STAT1 es un componente indispensable del complejo (ISGF3) que funciona como regulador de la transcripción en la señalización del interferón tipo 1 (Begitt *et al.*, 2014).

Con la finalidad de determinar el efecto de E1 de VPH-11 y -16 sobre los niveles de expresión del gen STAT1 en las células HaCaT transfectadas bajo las diferentes condiciones, se realizó el ensayo de qPCR utilizando primers contra este gen. En la Figura 8, se observa que la sola transfección con el vector pCA, aumenta los niveles de STAT1 en comparación con el control de células HaCaT sin transfección (NT), lo cual es esperado debido a que se trata de un ácido nucleico que es reconocido por los receptores TLR. Resulta muy interesante que las células transfectadas con E1 del VPH-16, mostraron una disminución significativa en los niveles de expresión de STAT1 respecto al control pCA, mientras que las transfectadas con E1 de HPV-11 mostraron niveles similares de STAT1 respecto al control pCA. Por otro lado, las células tratadas con el estímulo de Poli I:C además de los plásmidos de E1 y pCA, incrementaron significativamente la expresión de STAT1 en relación a las células no estimuladas, lo cual corrobora el efecto de este inductor en la activación de la vía de los ISGs. De manera interesante, en las células estimuladas y transfectadas con E1 del VPH-11 no se observó un cambio significativo en los niveles de expresión de STAT1 respecto al control pCA, sin embargo, en aquellas transfectadas con E1 del VPH-16 se observó una disminución significativa de STAT1 respecto al control pCA.

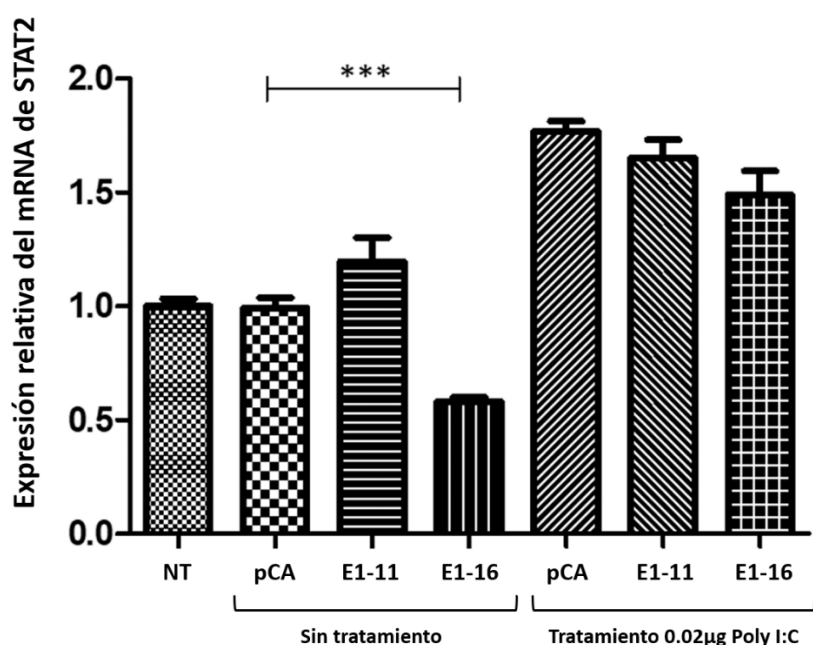


**Figura 8. La proteína E1 del VPH-16 disminuye la expresión de STAT1 en células HaCaT.** Se muestran los niveles relativos de mRNA del gen STAT1 en las células HaCaT transfectadas con el gen E1 del VPH-11 y E1 del VPH-16 en presencia o ausencia del estímulo con 0.02µg de Poli I: C. Los valores de STAT1 se obtuvieron como la diferencia del  $\Delta\Delta Ct$  en comparación con las células HaCaT sin transfectar (NT) y se muestran como la expresión relativa al control pCA. La expresión del gen constitutivo 18S se utilizó para normalizar. Las barras representan la media  $\pm$  DE. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Imagen representativa de tres experimentos.

### 12.3. La proteína E1 del VPH-16 disminuye los niveles de expresión de mRNA de STAT2 en células HaCaT

La formación del complejo de ISGF3 heterotrimérico es mecánicamente única entre las rutas dependientes de STAT, debido a la presencia de STAT2. El cual permite la fosforilación de tirosina de STAT1 por el receptor de IFN-I, además, no sólo proporciona el dominio de activación transcripcional (TAD), esencial para la inducción de la transcripción del gen diana, sino que se conecta a STAT1 a través de su dominio de homología Src 2 (SH2) y a IRF9 a través de su dominio en espiral (CC) (Fink & Grandvaux, 2013). De esta manera, el componente de unión al ADN de ISGF3 proporciona la especificidad para unirse al elemento de respuesta estimulado por IFN de consenso (ISRE), 5'-AGTTTCNNTT TCNC / T-3', presente en el promotor de los ISGs cuyos productos proteicos efectuarán acciones antivirales (Platanitis *et al.*, 2019).

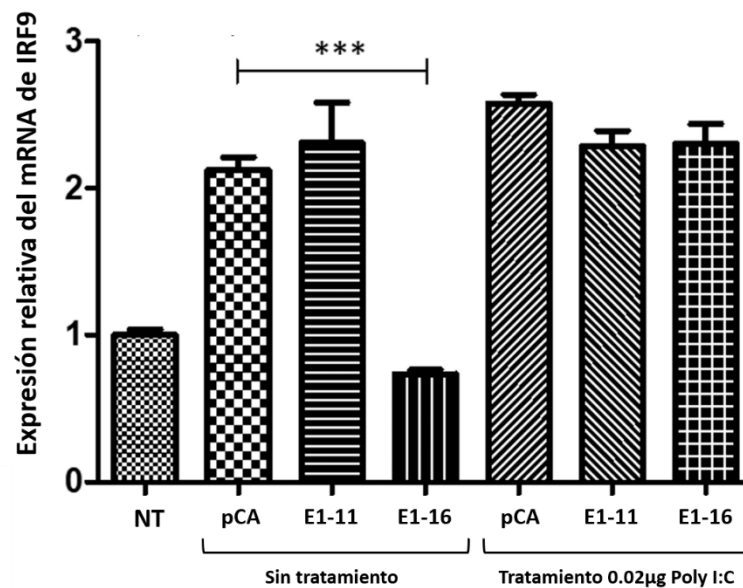
Para determinar los niveles de transcrito del factor STAT2 en células HaCaT transfectadas con el gen E1 del VPH-11 o -16, se realizó el ensayo de qPCR utilizando primers contra el gen de STAT2. Como se observa en la Figura 9, las células estimuladas con 0.02µg de Poli I:C incrementaron significativamente la expresión de STAT2 en relación a las células no estimuladas. En ausencia de estímulo, solo las células transfectadas con el gen E1 del VPH-16 mostraron disminución en los niveles de expresión de mRNA de STAT2 en comparación con las células transfectadas con el vector control pCA. Mientras que en las células transfectadas con E1 del VPH-16 y estimuladas con Poli I:C se observó una tendencia a la disminución en la expresión de STAT2.



**Figura 9. La proteína E1 del VPH-16 disminuye la expresión de STAT2.** Se muestran los niveles relativos de mRNA del gen STAT2 en las células HaCaT transfectadas con el gen E1 del VPH-11 y E1 del VPH-16 en presencia o ausencia del estímulo con 0.02µg de Poli I: C. Los valores de STAT2 se obtuvieron como la diferencia del  $\Delta\Delta Ct$  en comparación con las células HaCaT sin transfectar (NT) y se muestran como la expresión relativa al control pCA. La expresión del gen constitutivo 18S se utilizó para normalizar. Las barras representan la media  $\pm$  DE. \*\*\*  $p < 0.001$ . Imagen representativa de tres experimentos.

#### 12.4. La proteína E1 del VPH-16 disminuye los niveles de expresión del mRNA de IRF-9 en las células HaCaT

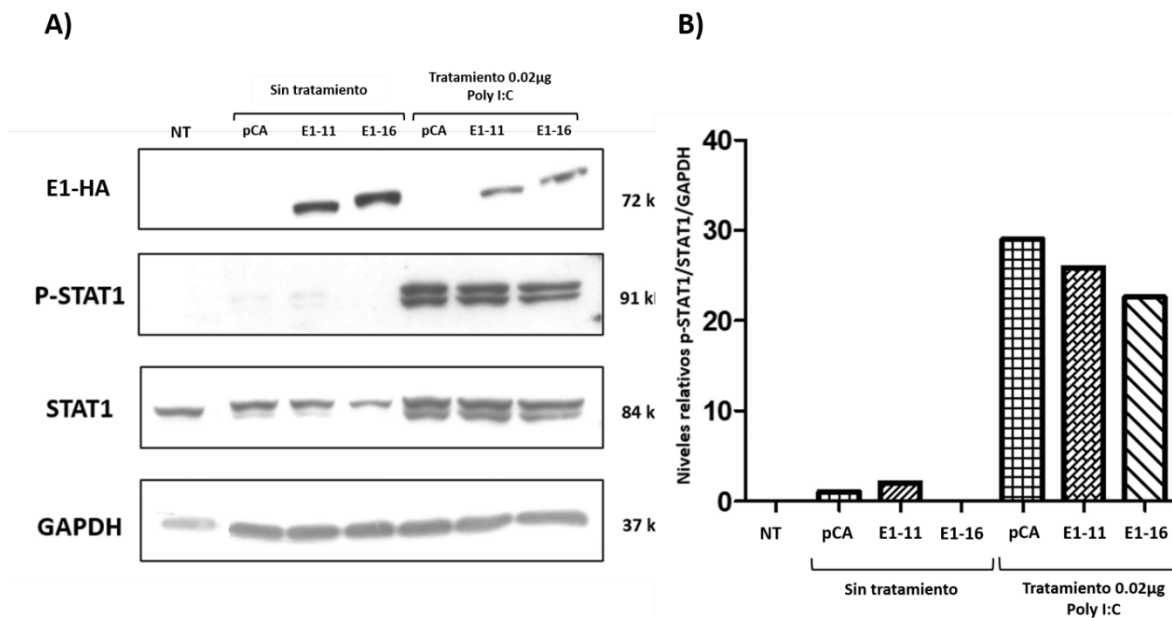
IRF9 es el principal responsable de la unión de ISGF3 a ISRE. La interacción con el núcleo del consenso de ISRE está mediada por IRF9, pero se requieren contactos de ADN de STAT1 y STAT2 para proporcionar estabilidad a la interacción (Jefferies, 2019). Por lo que para determinar si la presencia de E1 del VPH-11 y -16 afectaba los niveles de expresión de IRF9, se realizó el ensayo de qPCR utilizando primers contra el gen de IRF9. Al evaluar los niveles de transcrito del factor IRF9, se observó que en células transfectadas con E1 del VPH-16 y no estimuladas con Poli I:C, los niveles de expresión de IRF-9 fueron reducidos de manera significativa en comparación con las células transfectadas con el vector control pCA. Cabe señalar que en las células estimuladas con Poli I:C se observó una tendencia en la disminución de la expresión de IRF9 en las células transfectadas con E1 del VPH-11 y -16 (Figura 10).



**Figura 10. La proteína E1 del VPH-16 disminuye la expresión de IRF9.** Se muestran los niveles relativos de mRNA del gen IRF9 en las células HaCaT transfectadas con el gen E1 del VPH-11 y E1 del VPH-16 en presencia o ausencia del estímulo con 0.02µg de Poli I: C. Los valores de IRF9 se obtuvieron como la diferencia del  $\Delta\Delta Ct$  en comparación con las células HaCaT sin transfectar (NT) y se muestran como la expresión relativa al control pCA. La expresión del gen constitutivo 18S se utilizó para normalizar. Las barras representan la media  $\pm$  DE. \*\*\*  $p < 0.001$ . Imagen representativa de tres experimentos.

## 12.5. E1 del VPH-16 disminuyó los niveles proteicos de STAT1 y p-STAT1, mientras que E1 del VPH-11 aumentó p-STAT1 en células HaCaT

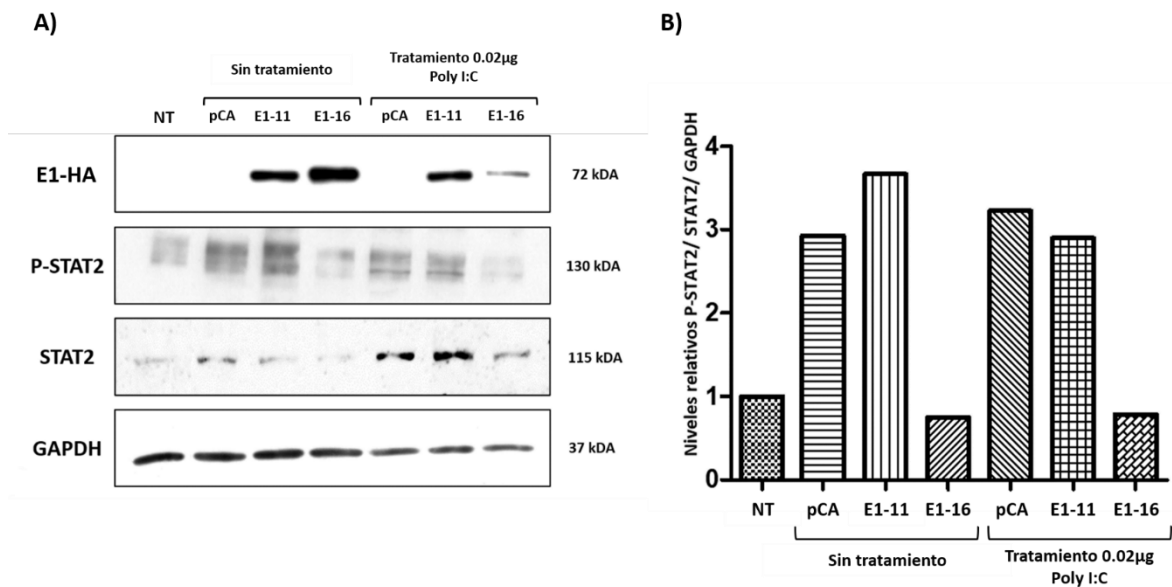
El complejo ISGF3 está compuesto de STAT1 fosforilado en Tyr701 y de STAT2 en Tyr689. Las proteínas STAT son fosforiladas por las cinasas Janus (JAK) unidas al receptor, e inducen su heterodimerización y asociación con IRF9 para formar el complejo ISGF3 que se transloca al núcleo. Para determinar si el efecto de E1 del VPH-16, afecta los niveles proteicos de STAT1 en su forma activa, se realizaron ensayos de Western Blot utilizando proteínas totales obtenidas de las células HaCaT después de 24 h de haber sido transfectadas. Para ello, se utilizaron los anticuerpos anti-STAT1 y anti-phosphoSTAT1. Las células HaCaT estimuladas con 0.02µg de Poli I:C incrementaron fuertemente los niveles de STAT1 en relación a las células no estimuladas. No obstante, las células transfectadas con E1 del VPH-16 en ausencia de estímulo con Poli I:C, disminuyeron los niveles de STAT1 total y p-STAT1; mientras que las células HaCaT transfectadas con E1 del VPH-11, aumentaron la fosforilación de STAT1 cuando fueron cultivadas bajo la misma condición. Por otra parte, las células HaCaT transfectadas con E1 del VPH-11 o E1 del VPH-16 y estimuladas con Poli I:C, mostraron una tendencia en la disminución de p-STAT (Figura 11).



**Figura 11. La proteína E1 del VPH-16 disminuye los niveles de fosforilación de STAT1 en células HaCaT. A)** Extractos proteicos totales de células HaCaT transfectadas con E1 del VPH-11, E1 del VPH-16 o con el vector pCA (control), en ausencia o presencia de 0.02 µg de Poli I: C. Los niveles de STAT1 y p-STAT1 fueron analizadas mediante Western Blot. La detección de las proteínas E1 se realizó con el anticuerpo anti-HA. GAPDH se utilizó como control de carga. **B)** Se muestra la expresión relativa de pSTAT1/ STAT1/ GAPDH de las células transfectadas con E1 del VPH-11, E1 del VPH-16 o con el vector pCA de un solo experimento. El análisis densitométrico de las bandas se realizó con ayuda del programa ImageJ.

## 12.6. E1 del VPH-16 disminuye los niveles de p-STAT2 en células HaCaT, mientras que E1 del VPH-11 los aumenta

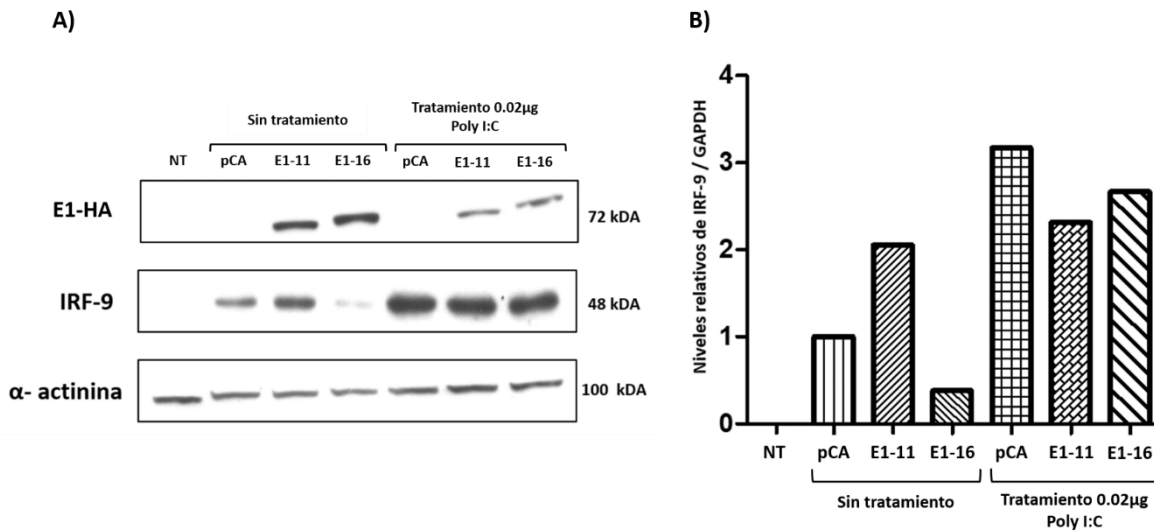
Para evaluar los niveles totales de STAT2 y p-STAT2 (Tyr689) se realizaron ensayos de Western Blot utilizando proteínas totales obtenidas de las células HaCaT después de 24 h de haber sido transfectadas en presencia o ausencia de Poli I:C, utilizando los anticuerpos anti-STAT2 y anti-p-STAT2. Como se observa en la Figura 11, las células HaCaT que expresaron E1 del VPH-16 y que fueron estimuladas o no con Poli I:C, mostraron disminución de los niveles de p-STAT2. De manera interesante, en las células que expresaron E1 del VPH-11 y no estimuladas, se observó aumento de los niveles de p-STAT2, lo cual nos sugiere que E1 del VPH-11 podría estar aumentando la señalización de esta vía. Es importante mencionar que en el control HaCaT se detectaron niveles de p-STAT2 de manera constitutiva, a diferencia de p-STAT1 que no fue detectado en estas células (Figura 12).



**Figura 12. La proteína E1 del VPH-16 disminuye los niveles de p-STAT2 en células HaCaT. A)** Extractos proteicos totales de células HaCaT transfectadas con E1 del VPH-11, E1 del VPH-16 o con el vector pCA (control), en ausencia o presencia de 0.02 µg de Poli I: C. Los niveles de STAT2 y p-STAT2 fueron analizadas mediante Western Blot. La detección de las proteínas E1 se realizó con el anticuerpo anti-HA. GAPDH se utilizó como control de carga. **B)** Se muestra la expresión relativa de p-STAT2/ STAT2/ GAPDH de las células transfectadas con E1 del VPH-11, E1 del VPH-16 o con el vector pCA de un solo experimento. El análisis densitométrico de las bandas se realizó con ayuda del programa ImageJ.

## 12.7. E1 del VPH-16 disminuye los niveles de IRF-9 en células HaCaT, mientras que E1 del VPH-11 los aumenta

Para evaluar los niveles del factor IRF9 se realizaron ensayos de Western Blot utilizando proteínas totales obtenidas de las células HaCaT después de 24 h de haber sido transfectadas en presencia o ausencia de Poli I:C, utilizando el anticuerpo anti-IRF9. Como se observa en la Figura 13, las células HaCaT estimuladas con 0.02 $\mu$ g de Poli I:C incrementaron fuertemente los niveles de IRF-9 en relación a las células no estimuladas. Las células no estimuladas que expresaron E1 del VPH-16 disminuyeron fuertemente los niveles de IRF-9 en comparación con las células transfectadas con el vector control pCA. En contraste, las células que expresaron E1 del VPH-11 aumentaron los niveles de IRF9 en relación a las transfectadas con el vector control pCA, sugiriendo que E1 del VPH11 podría estar aumentando la señalización de esta vía.



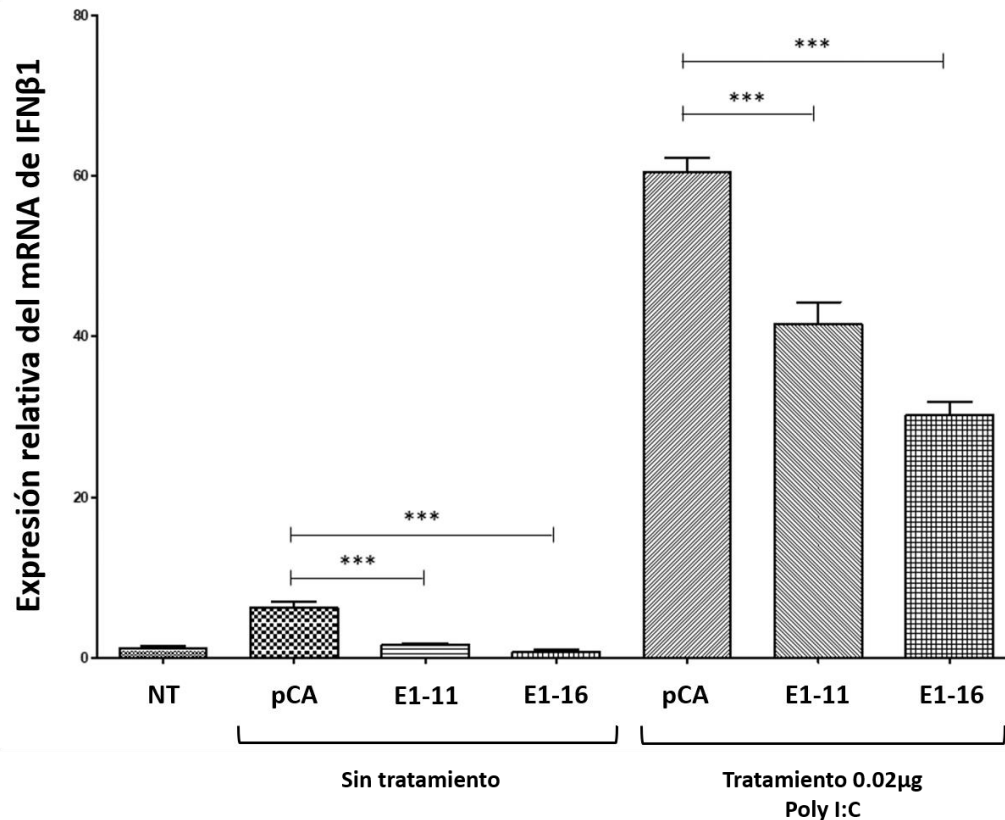
**Figura 13. La proteína E1 del VPH-16 disminuye los niveles de IRF9 en células HaCaT. A)** Extractos proteicos totales de células HaCaT transfectadas con E1 del VPH-11, E1 del VPH-16 o con el vector pCA (control), en ausencia o presencia de 0.02  $\mu$ g de Poli I: C. Los niveles de IRF9 fueron analizados mediante Western Blot. La detección de las proteínas E1 se realizó con el anticuerpo anti-HA.  $\alpha$ - actinina se utilizó como control de carga. **B)** Se muestra la expresión relativa de IRF9 /  $\alpha$ - actinina de las células transfectadas con E1 del VPH-11, E1 del VPH-16 o con el vector pCA de un solo experimento (cuyos valores fueron normalizados a 1). El análisis densitométrico de las bandas se realizó con ayuda del programa ImageJ.



## **12.8. Las proteínas E1 del VPH-16 y VPH-11 disminuyen la expresión del mRNA de IFN $\beta$ 1 en células HaCaT no estimuladas y estimuladas con Poli I:C**

El IFN $\beta$ 1 es una citocina pleiotrópica con potentes funciones reguladoras inmunitarias adaptativas y antiproliferativas, antivirales e innatas del huésped (Trinchieri G, 2010). La unión de IFN $\beta$  a su receptor (IFNAR) está bien caracterizada para involucrar una cascada de eventos de señalización iniciados por la activación rápida de los miembros Tyk2 y JAK1 de las quinasas JAK, que fosforilan la estructura intracelular dominio de IFNAR en tirosina (Tyr), proporcionando así un sitio de acoplamiento para los dominios SH2 de STAT1 y STAT2 latentes. La fosforilación posterior de STAT1 y STAT2 induce su hetero dimerización y asociación con IRF9 para formar el complejo ISGF3 que se transloca al núcleo (Fink & Grandvaux, 2013). Debido a que se sabe que la señalización paracrina de IFN $\beta$ 1 a través de esta vía induce a la expresión de ISGs y a su vez de IFNs como una manera de expandir la respuesta antiviral, nos preguntamos si la disminución de los componentes del complejo transcripcional ISGF3 por E1 del VPH-16 pudieran estar afectando la expresión de IFN $\beta$ 1 y de esta manera la expansión de la respuesta antiviral.

Para determinar los niveles de transcrito de IFN $\beta$ 1 en las células HaCaT que expresaron E1 del VPH-11 o E1 del VPH -16, se realizó el ensayo de qPCR utilizando primers contra el gen de IFN $\beta$ 1. Como se observa en la Figura 14, E1 del VPH-16 disminuyó la expresión del mRNA de IFN $\beta$ 1 en células no estimuladas y estimuladas con 0.02  $\mu$ g de Poly I:C en comparación con las células transfectadas con el vector control pCA cultivadas en ambas condiciones, respectivamente. De manera interesante, observamos que las células transfectadas con E1 de VPH-11 y estimuladas con Poli I:C, expresaron niveles más altos de IFN $\beta$ 1 que los observados en las células transfectadas con E1 del VPH-16 bajo las mismas condiciones de cultivo, lo cual nos permite sugerir que el incremento en la expresión de mRNA de IFN $\beta$ 1, inducido por E1 de VPH-11, esté relacionado con el aumento en la expresión de los componentes del complejo ISGF3 inducido por esta misma proteína. Por otro lado, la presencia de E1 del VPH-11 o E1 del VPH-16 disminuyó significativamente la expresión de IFN $\beta$ 1 en las células HaCaT no estimulados en comparación con las células transfectadas con el vector control pCA cultivadas bajo estas mismas condiciones, lo cual concordó con los resultados previamente reportados por Castro Muñoz y colaboradores en 2019.



**Figura 14.** La proteína E1 del VPH-16 disminuye la expresión de IFNβ1 en células HaCaT no estimuladas y estimuladas con Poli I: C. Se muestran los niveles relativos del mRNA del gen IFNβ1 en células HaCaT transfectadas con el gen E1 del VPH-11 y E1 del VPH-16 en presencia o ausencia del estímulo con 0.02μg de Poli I: C. Los valores de mRNA de IFNβ1 se obtuvieron como la diferencia del  $\Delta\Delta Ct$  en comparación con las células HaCaT sin transfectar (NT) y se muestran como la expresión relativa al control pCA. La expresión del gen constitutivo 18S se utilizó para normalizar. Las barras representan la media  $\pm$  DE. \*\*\* $p < 0.001$ . Imagen representativa de tres experimentos.

### 13. DISCUSIÓN

La proteína E1 del VPH es la única proteína del virus con actividad enzimática, presenta un dominio de helicasa dependiente de ATP, y se encuentra presente durante todo el ciclo replicativo del virus (Bervgal *et al.*, 2013). La principal función conocida de esta proteína es la regulación de la replicación del ADN viral, para ello la proteína E1 tiene la capacidad de interactuar con varias proteínas celulares de la maquinaria de replicación de la célula huésped (Egawa *et al.*, 2012). Interesantemente, se ha demostrado que E1 puede interactuar con otros elementos celulares que regulan algunos procesos epigenéticos y la expresión génica (Swindle *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999). En este contexto, Castillo y colaboradores en el 2014 demostraron que al abatir la expresión del gen E1 de VPH-18 en la línea celular HeLa, los niveles de genes asociados a procesos celulares de

respuesta inmune, genes relacionados con la señalización del interferón y un conjunto de ISGs, se encontraron sobre expresados. Asimismo, Castro Muñoz y colaboradores en 2019 demostraron que la presencia de la proteína E1 de VPHs de bajo y alto riesgo en células HaCaT disminuyó la expresión genes relacionados con respuesta inmune innata antiviral, específicamente la expresión de IFN $\beta$ 1, STAT2 e IRF9, y a su vez, de algunos ISGs. Lo que sugiere que E1 de ambos tipos de VPH regula negativamente a la vía de los genes inducidos por IFN.

Tomando en cuenta estos antecedentes, en este estudio se evaluó el efecto de E1 del VPH-11 y E1 del VPH-16 sobre la regulación de los componentes de la vía de señalización de los ISGs, tanto a nivel de transcrito como a nivel proteico, específicamente del complejo ISGF3 (STAT1, STAT2 e IRF9), el cual se transloca al núcleo para unirse a secuencias de ADN específicas (ISRE) para activar la transcripción de más de 300 genes antivirales, entre ellos IFN $\beta$ 1 (Platanias, 2005). Para ello, células HaCaT fueron transfectadas de manera transitoria con los plásmidos pMHPV11 E1HA y pMHPV16 E1HA que contienen los genes E1 de VPH-11 y E1 del VPH-16, respectivamente. Como control de activación de la vía de los ISGs, las células fueron estimuladas con Poli I: C. El Poli I:C, que es un análogo de RNA viral, es capaz de activar la vía de Interferón al ser reconocido por el receptor tipo Toll 3. Este efecto puede explicar el incremento de los niveles de expresión de los factores del complejo ISGF3 (STAT1, STAT2 e IRF9) en células estimuladas lo cual corrobora el efecto como un buen inductor de la vía de los ISGs (Imaizumi *et al.*, 2016).

El presente estudio demostró que la presencia de E1 del VPH-16 en las células HaCaT no estimuladas, disminuyó significativamente los niveles de mRNA y proteína de STAT1, STAT2 e IRF9, y del mRNA de IFN $\beta$ 1, incluso a niveles inferiores a los mostrados en las células sin transfectar (NT). Resultaría de gran relevancia estudiar el mecanismo por el cual E1 del VPH-16 pudiera estar desregulando a nivel transcripcional a estos genes. Una posibilidad podría ser a través de la desregulación de los factores reguladores de Interferón IRF1, IRF7 e IRF9 en las células HaCaT transfectadas transitoriamente con las proteínas E1 de los VPH-16, -18, u -11, lo cual fue reportado por Castro Muñoz y colaboradores en el 2019. Estos factores son fundamentales para la producción de interferones de tipo I posterior a la activación de los receptores de reconocimiento de patógenos que detectan el ARN y el ADN virales (Jefferies, 2019). Sin embargo, surge la pregunta: ¿Cómo es que E1 del VPH-16 modula a estos elementos reguladores de la vía del interferón? y, en consecuencia, ¿cómo esto puede afectar a los componentes de la vía de los ISGs?, lo cual es algo que merece continuar su estudio. Diversos reportes indican que la proteína E1 del VPH- 16 es capaz

de interactuar con modificadores de la cromatina, lo cual sugiere que E1 pudiera regular a nivel epigenético la transcripción de genes del hospedero (Zhou *et al.*, 2010). Un ejemplo de esto es lo reportado Dipon Das y colaboradores en el 2019, donde demostraron que E1 del VPH-16 interactúa con SIRT1, una desacetilasa de histonas capaz de actuar sobre residuos específicos como H3K9, H3K14, H4K16 y H1K26 y de esta manera regula la fidelidad de E1-E2 durante la replicación del genoma viral además de que permite el reclutamiento de proteínas de respuesta a daño al DNA durante el ciclo viral.

Además, de manera interesante la disminución de la expresión del STAT2 por E1 del VPH-16 coincide con los datos del transcriptoma publicados por Castro Muñoz en el 2019 en donde la presencia de E1 del VPH-16 en células HaCaT disminuyó la expresión de STAT2. En datos de la tesis de maestría de Pérez-Aquino, 2021, se sugiere que esta disminución podría deberse a que E1 del VPH-16 es capaz de regular los niveles de modificadores de la cromatina, los cuales impactan en las modificaciones postraduccionales de histonas como fue el caso de la marca H3K9Ac. De manera interesante se encontró en un análisis *in silico* que 30 genes fueron desregulados en común por la marca H3K9Ac y E1 del VPH-16, entre ellos STAT2.

Asimismo, la presencia de E1 del VPH-16 en las células transfectadas indujo disminución en los niveles proteicos de p-STAT1 y p-STAT2, lo cual coincidió con la disminución de los niveles de proteína total de STAT1 y STAT2 y a su vez con la disminución del mRNA de estos factores de transcripción. Además, las células transfectadas con E1 de VPH-16 aún en presencia del estímulo Poli I:C también presentaron una tendencia a disminuir los niveles de estas proteínas fosforiladas. Por lo cual, resultará de interés evaluar si E1 de VPH-16 interactúa con proteínas cinasas o fosfatasas que pudieran estar regulando los niveles de los factores del complejo ISGF3 fosforilados.

Por otra parte, es importante mencionar que incluso la propia transfección con el vector vacío pCA, estimuló la vía de los ISGs en relación a los niveles presentes en las células no transfectadas (NT) de los elementos analizados, tal como se observó en cada uno de los experimentos. Esto podría deberse a que el vector pCA es una molécula constituida por pDNA el cual fue amplificado y purificado a partir de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. Coli* y, de esta manera, es posible que como producto final de una serie de cascadas de señalización active la vía de los ISGs al ser censado por receptores de tipo Toll 9 (Abbas A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S., 2014), de modo que pCA resultó ser un control adecuado para determinar el efecto de E1 aún en ausencia del estímulo con Poli I:C. Esto resulta acorde con lo que menciona Mairhofer & Lara en el 2014, quienes postulan que la composición de

la secuencia y la inmunogenicidad de los plásmidos están interconectados y, por lo tanto, son relevantes para la estabilidad y la eficacia del DNA plasmídico (pDNA) en la célula diana animal o humana. El ADN invasor es reconocido por el sistema inmunitario y está sujeto a interacciones con componentes celulares específicos. El pDNA derivado de *E. coli* contiene secuencias cortas de dinucleótidos CpG no metilados en un determinado contexto base (Suzuki & Bird, 2008). En este sentido, el sistema inmunitario de los vertebrados ha evolucionado de manera que es capaz de reconocer el ADN bacteriano que es rico en CpG no metilados y este reconocimiento está mediado por el receptor tipo Toll 9 (TLR9) en las células del sistema inmunitario innato y desencadena una reacción inflamatoria que, a su vez impulsa la respuesta inmunitaria adaptativa desencadenada por el vector en sí mismo (Hemmi *et al.*, 2000).

En este trabajo demostramos que curiosamente, a diferencia de E1 de VPH-16, la presencia de E1 de VPH-11 indujo un ligero incremento en los niveles de mRNA de STAT1, STAT2 e IRF9, así como de las proteínas p-STAT1, p-STAT2 e IRF9 en las células HaCaT no estimuladas. Sin embargo, de manera interesante, al analizar la expresión de IFN $\beta$ 1, como uno de los productos de la señalización de esta vía inducidos para propagar la respuesta antiviral, se encontró que tanto E1 de VPH-11 como E1 de VPH-16 disminuyeron significativamente los niveles de mRNA de IFN $\beta$ 1 en las células HaCaT cultivadas en presencia y ausencia del estímulo con Poli I: C. Lo cual, para el caso de E1 del VPH-11 podría ser explicado con la disminución de la expresión del factor IRF1 reportado en los datos del transcriptoma de las células HaCaT transfectadas con E1 del VPH-11, publicados por Castro Muñoz y colaboradores en el 2019. IRF1 es un factor nuclear que se une y activa los promotores de los genes del interferón tipo I (Feng *et al.*, 2021). Expresado de manera ubicua en células humanas a niveles basales bajos (Taniguchi *et al.*, 2001), el gen IRF1 es altamente sensible a una variedad de estímulos, incluidos los IFN y el factor nuclear proinflamatorio kappa-B (NF- $\kappa$ B) (Forero *et al.*, 2019). Por lo tanto, IRF1 se ajusta al perfil típico de un “gen estimulado por IFN” (ISG) y a su vez como el de un gen regulador de la respuesta de IFN $\beta$ 1, como se reportó previamente en células mieloides humanas y fue dependiente del receptor TLR9 (Negishi *et al.*, 2006). A su vez, una hipótesis que explique la desregulación de IRF1 podría ser debido a la capacidad de E1 de interactuar y/o afectar la actividad de proteínas involucradas en la regulación de la cromatina, como lo reportado por Scott Swindle y Jeffrey Engler en 1998, donde demostraron la interacción de E1 del VPH-11 con la histona H1 y a su vez demostraron que esta interacción provoca el desplazamiento de H1 de regiones en el genoma viral, de esta manera los autores concluyeron que E1 del VPH-11 es capaz de remover a la histona H1 del genoma del VPH, pudiendo regular diversos procesos en el

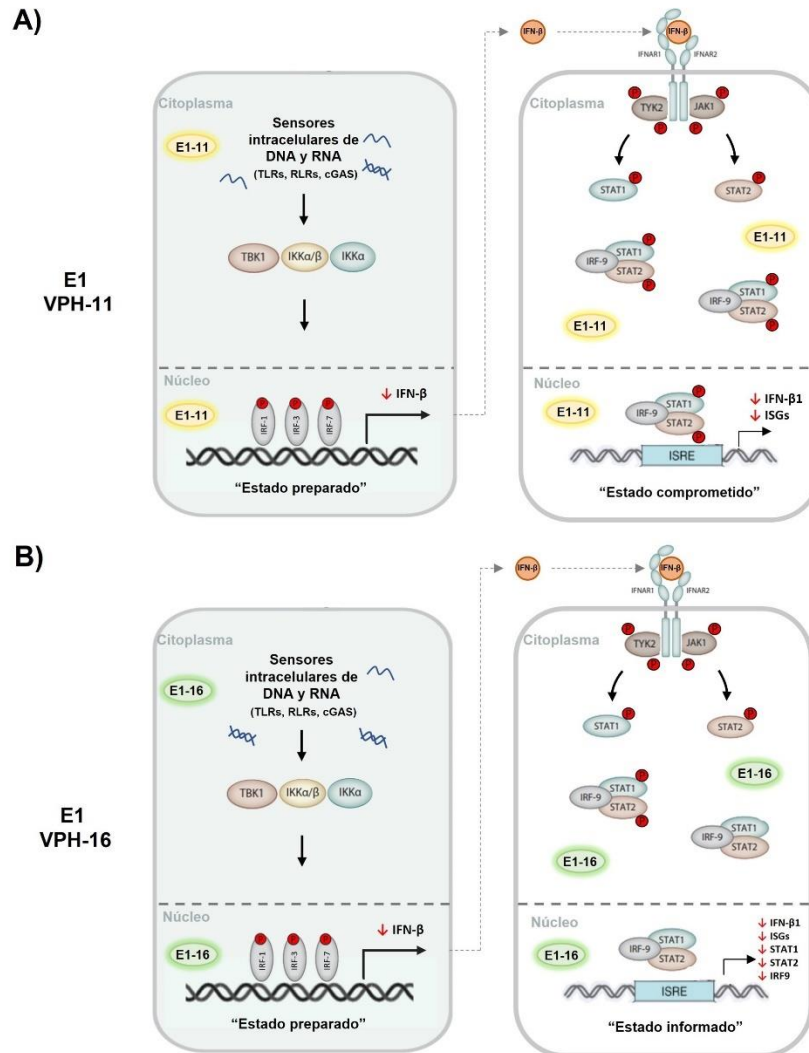
genoma viral como la replicación del genoma viral o la transcripción del genoma viral. Estos mecanismos podrían explicar en parte como es que E1 tanto de VPH-11, como de VPH-16 podrían regular la expresión génica del hospedero.

Estos resultados proporcionan una evidencia de que las proteínas E1 de los VPH, principalmente de alto riesgo como lo es VPH-16, ejercen un efecto importante en la desregulación de los componentes de la vía de señalización de los ISGs, como son STAT1, STAT2 e IRF9, que a su vez regulan la transcripción de genes implicados en la respuesta inmune antiviral, como lo es IFN $\beta$ 1. Esta citocina ejerce un efecto de retroalimentación positivo al unirse a su receptor específico para promover la expresión de genes estimulados por interferón (ISG), ayudando a controlar la infección viral (Schoggins *et al.*, 2011).

Wang y Song en 2021 reportaron que durante el inicio de la respuesta inmune antiviral sistémica, las células infectadas por virus producen y liberan de manera autocrina (activado por factores de transcripción del factor regulador de IFN (IRF) como IRF1, IRF3 e IRF7) y paracrina (inducidos a través de la vía Jak-STAT) IFNs de tipo I, a lo cual le denominaron células en “Estado preparado”. Posteriormente, el IFN producido interacciona con los receptores específicos en las células adyacentes para activar de manera eficiente a la vía de los ISGs y elevar los niveles celulares del complejo ISGF3, a lo cual le denominaron células en “Estado comprometido”. A diferencia de las células infectadas, el IFN de tipo I se unirá a su receptor en células adyacentes o distantes no infectadas preparándolas contra una posible infección por el virus, sin desencadenar una respuesta excesiva de expresión de ISGs, ya que los niveles del complejo transcripcional ISGF3 se encuentran disminuidos, donde los factores STAT1/2 e IRF9 están en estado no fosforilado, a lo cual denominaron “Estado informado” (Figura 15).

Tomando como ejemplo el modelo propuesto por Wang y Song en 2021 para explicar el efecto observado de las proteínas E1 de los VPH. De acuerdo a nuestros resultados, la activación de la vía de los ISGs observada durante la expresión de E1 del VPH-11 en las células HaCaT, sugiere que este ligero aumento en la señalización pudiera ser similar a lo que sucede en un estado celular comprometido (Figura 15A), al menos en las primeras 24 h, induciendo una respuesta inflamatoria en las etapas iniciales de la infección, sin embargo, sería interesante analizar este efecto en un mayor lapso, ya que también se sabe que los VPHs de bajo riesgo pueden conducir a la persistencia de la infección, además de considerar la participación conjunta de otras proteínas virales de expresión temprana como E2, E6 y E7 (Egawa & Doorbar, 2017). En contraste, la disminución de los

niveles de los componentes del complejo ISGF3 observada por la presencia de E1 de VPH-16 en las células HaCaT, incluso en presencia de estímulo, podría conducir a una señalización disminuida de la vía, asemejándose a un “estado informado” en el cual existe una expresión y activación disminuida de los componentes del factor ISGF3 (Figura 15B), este estado evitaría la respuesta inmune inflamatoria y en consecuencia conduciría a una disminución de la respuesta inmune activada por IFN de Tipo I.



**Figura 15. Esquema representativo del efecto de las proteínas E1 del VPH-11 y VPH-16 sobre la regulación de la vía de los ISGs en células HaCaT.** La detección de PAMPs virales por PRRs conducen a la activación de cascadas de señalización que finalizan con la producción de IFN de Tipo I. La inducción autocrina de IFN-β1 requiere la unión promotora de homodímeros o heterodímeros de los factores: IRF1, IRF3 o IRF7, sin embargo, aún no se ha dilucidado el posible efecto de la proteína E1 del VPH-11 y -16 en esta vía. La señalización de IFN de Tipo I al unirse con su receptor específico en células adyacentes activará la vía de los ISGs. A) La proteína E1 del VPH-11 en la célula tuvo un efecto en la vía de los ISGs al disminuir la expresión del mRNA de IFN-β1, así como al aumentar la fosforilación de los componentes del factor ISGF3 dando como resultado la disminución reportada de la expresión del mRNA de algunos ISGs. B) La proteína E1 del VPH-16 en la célula disminuye la expresión del mRNA de IFN-β1 así como la expresión del mRNA y la fosforilación de los

componentes del factor ISGF3, dando como resultado la disminución reportada de la expresión del mRNA algunos ISGs. Tomado y modificado de: Wang Y, Song Q, Huang W, et al., 2021.

De igual manera, resulta de interés analizar los efectos de E1 de VPH-16 sobre los componentes del complejo ISGF3, en un mayor lapso en las células HaCaT, para determinar si la presencia de esta proteína mantiene este estado de inhibición, lo cual es característico durante la persistencia de la infección por los VPH de alto riesgo. Al respecto, Baedyananda y colaboradores en 2017, encontraron una correlación en el aumento significativo en la expresión de E1 de VPH-16 en biopsias de pacientes con diferentes grados de progresión de la enfermedad, desde lesión intraepitelial de bajo grado, alto grado y cáncer cérvico uterino. Estos datos sugieren que E1 además de tener una participación importante en el establecimiento de una infección persistente, al abatir al sistema inmune, podría tener alguna otra contribución en la carcinogénesis y el mantenimiento del cáncer (Chang & Laimins, 2000).

Por otra parte, es bien conocido que las proteínas E5, E6 y E7 de los VPH pueden modular la señalización de STAT1 y STAT2 a través de su interacción directa con estos factores de transcripción (Morgan *et al.*, 2020; Westrich *et al.*, 2017). Por ejemplo, se ha demostrado que E7 del VPH-16 inhibe la expresión de IFN $\beta$  a través de la interacción de E7 con IRF-1 y del reclutamiento de la desacetilasa de histona 1 (HDAC1), favoreciendo la represión transcripcional (Park *et al.*, 2000). Asimismo, E7 del VPH-16 al unirse a IRF9, bloquea la formación del complejo ISGF3 (Barnard & McMillan, 1999). Mientras que E6 del VPH-16, al interactuar con IRF-3, inhibe su capacidad de transactivación a través de la interacción con el residuo Gal4 de IRF-3 (Ronco *et al.*, 1998). Además, E6 del VPH-18 interactúa con TYK2 resultando en una fosforilación alterada de IFNAR1 en la tirosina466 y, secuencialmente, en la inhibición de las fosforilaciones de STAT1 y STAT2 (Li *et al.*, 1999). A su vez, la sobreexpresión E6 y E7 del VPH-16 en células N/Tert-1 reprimen la expresión de algunos ISGs como IFN $\kappa$  e IFIT1 (James *et al.*, 2020). Estos hallazgos concuerdan en que las interacciones que ejercen las oncoproteínas de los VPH de alto riesgo, desregulan a componentes claves de la vía de IFN de Tipo I y de ISGs para favorecer el establecimiento de la infección y la persistencia viral (Chang & Laimins, 2000). En este contexto, nuestros resultados aportan la novedad de que la proteína E1 de VPH de alto riesgo (VPH-16), a diferencia de la proteína E1 de VPH de bajo riesgo (VPH-11), puede actuar como regulador transcripcional con un papel relevante en la inhibición de la respuesta inmune innata, pudiendo favorecer la persistencia de la infección viral y la carcinogénesis, junto con los oncogenes virales E5, E6 y E7 (Westrich *et al.*, 2017). Dilucidar estos



mecanismos moleculares efectuados por las proteínas del VPH podría ayudar a explicar por qué ciertas infecciones desaparecen en corto tiempo, mientras que otras permanecen como infecciones persistentes.

Nuestros resultados muestran que E1 de VPH-11, en contraste con E1 de VPH-16, tiene una tendencia al incremento de los niveles proteicos y fosforilados de los componentes del complejo ISGF3, lo que podría resultar en una activación más eficiente de la vía de los ISGs. Esto resulta interesante si se considera que los VPH de bajo riesgo también establecen infecciones persistentes (Egawa & Doorbar, 2017). Este efecto habría que comprobarlo con un mayor número de experimentos y de ser real, podría implicar interacciones proteína-proteína que estabilizaran a los elementos del complejo ISGF3, lo cual también es un campo interesante de seguir estudiando. Sin embargo, no se descarta que VPH-11 promueva persistencia de la infección a través de la participación de las proteínas E6 y E7, que se sabe, entre otros efectos, suprimen la respuesta inmune mediada por Th1 (Ivancic *et al.*, 2020) e interfieren en la presentación de péptidos virales a través de la interacción con TAP-1 (Vambutas *et al.*, 2001), respectivamente. De hecho, se ha reportado que las proteínas E6 y E7 de VPH de bajo riesgo alteran las respuestas proinflamatorias innatas promovidas por las células NK, las cuales no fueron capaces de detectar y/o lisar las células deficientes en moléculas HLA clase I, y que los macrófagos y las células de Langerhans no iniciaron una respuesta inmune adaptativa adecuada (Ivancic *et al.*, 2020).

En este trabajo demostramos que E1 de VPH-16 disminuye a nivel de mRNA y proteína los elementos de la vía de genes inducidos por interferón. Si bien la disminución a nivel de las proteínas analizadas podría estar determinada por la expresión del gen, sería interesante analizar otros niveles de regulación como la estabilidad proteica de estos elementos y su localización subcelular, lo que finalmente impactaría en sus funciones.

Considerando que diversos estudios han demostrado la capacidad de E1 del VPH-16 y -11 para interactuar con modificadores de la cromatina como con la histona H1, la subunidad del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF (Ini1 / Hsnf5) y con Sirtuina 1 (SIRT1: desacetilasa de histona clase III) (Swindle *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999, Das *et al.*, 2019), se sugiere que E1 no sólo podría regular la replicación del genoma del VPH, sino también podría participar en la regulación de la expresión de genes celulares de la célula huésped a través de mecanismos epigenéticos. Por lo que resulta de interés determinar si E1 regula la expresión de los genes de la vía de señalización de los ISGs, de manera indirecta a través de la interacción con factores de transcripción, co-activadores,

co-represores, proteínas modificadoras de la cromatina, o de manera directa a través de la interacción de E1 con regiones promotoras de los genes desregulados de la vía de los ISGs. De este modo, resulta relevante determinar las regiones del genoma celular con las que la proteína E1 pudiera interactuar. Estos datos ayudarían a entender los mecanismos por los cuales la proteína E1 pudiera ejercer el papel de regulador transcripcional con un alto impacto en la regulación de la respuesta inmune, pudiendo favorecer la persistencia de la infección viral y la carcinogénesis. Con todo esto resulta de interés conocer más sobre los mecanismos de la relación de E1 de diferentes VPH de alto riesgo sobre otros procesos celulares y vías de señalización, con el fin de entender su papel en las etapas tempranas de la infección, la persistencia de la misma, y el desarrollo de cáncer.

## **14. CONCLUSIONES**

El presente estudio aporta evidencia de que la proteína E1 de VPH-16 a diferencia de E1 de VPH-11, disminuye significativamente los niveles de expresión del mRNA y de proteína del complejo ISGF3 (STAT1, STAT2 e IRF-9), así como de mRNA de IFN $\beta$ 1 en la línea celular HaCaT y en consecuencia podría disminuir la expresión de otros productos de la vía de los ISGs, sugiriendo la participación de E1 en la desregulación de los componentes clave de la vía de los ISGs. Los efectos de la expresión de E1 podrían favorecer el establecimiento de la infección y la inhibición de la activación de la respuesta inmune innata en las primeras etapas de la infección.

### **14.1. CONCLUSIONES PUNTUALES**

- E1 del VPH-16 disminuyó los niveles de expresión del mRNA de STAT1, STAT2 e IRF-9 en células no estimuladas con Poli I: C.
- E1 del VPH-16 disminuyó los niveles de proteína de STAT1, IRF-9, p-STAT1 y p-STAT2 en células estimuladas y no estimuladas con Poli I: C.
- E1 del VPH-11 aumentó los niveles de p-STAT1, p-STAT2 e IRF-9 en células no estimuladas con Poli I: C.
- E1 del VPH-16 disminuyó los niveles de expresión del mRNA de IFN $\beta$ 1 en células estimuladas y no estimuladas con Poli I: C.

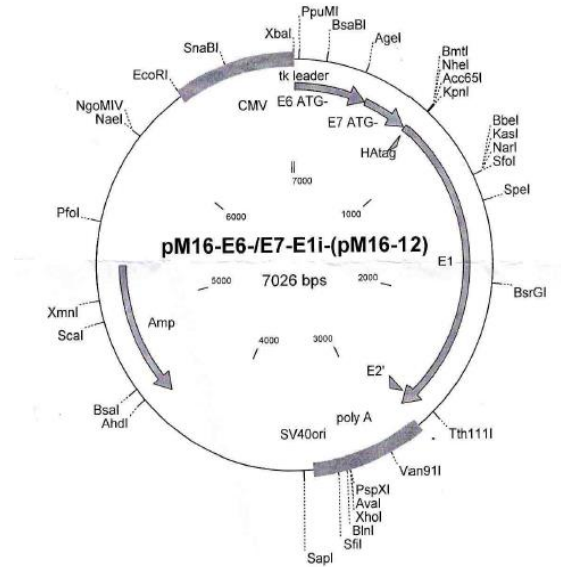
## 15. PERSPECTIVAS

Si bien la disminución a nivel de las proteínas analizadas en el presente estudio podría estar determinada por la expresión del gen, sería interesante analizar otros niveles de regulación como la estabilidad proteica de estos elementos, su localización subcelular, y sus modificaciones postraduccionales reguladas por E1 del VPH-16, lo que finalmente impactaría en sus funciones como factores de transcripción relevantes en la respuesta inmune innata del Interferón tipo I. Así mismo uno de los puntos inconclusos de este trabajo fue la determinación del efecto de E1 del VPH-11 y VPH-16 sobre la regulación de la formación del complejo ISGF3 y/o formación de dímeros STAT1-STAT2, presentes tanto en fracciones nucleares como citoplasmáticas, ya que se sabe que la regulación de la formación de estos complejos forma parte crucial de un ciclo de retroalimentación positiva o negativa posterior al estímulo del receptor por IFN de Tipo I, por lo tanto, el estado de fosforilación de estos complejos impactará en una mayor respuesta o una respuesta atenuada ante la infección viral.

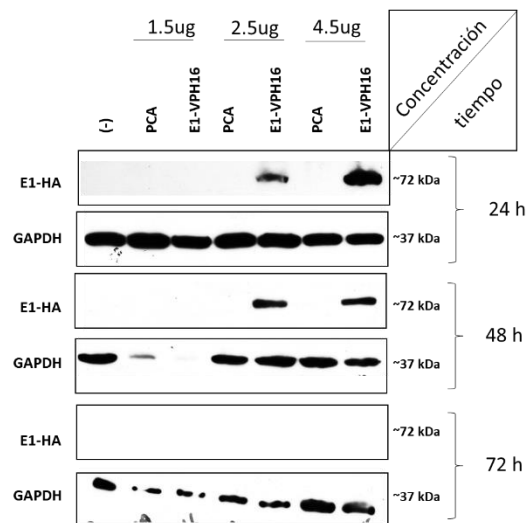
Para dilucidar de manera completa por qué se vieron afectados los niveles de IFN $\beta$ 1 en células transfectadas con E1 del VPH-11 y -16, resulta de gran relevancia evaluar la expresión y niveles proteicos, así como activación de los factores IRFs (IRF1, IRF3 e IRF7) implicados en la inducción de la expresión de IFN $\beta$ 1 y si E1 es capaz de evitar la unión de estos reguladores en las regiones promotoras de los ISGs.

## 16. ANEXO

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



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



## 17. REFERENCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). Cellular and molecular immunology E-book. Elsevier Health Sciences.
- Amin, A. A., Titolo, S., Pelletier, A., Fink, D., Cordingley, M. G., & Archambault, J. (2000). Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology*, 272(1), 137–150. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0328>
- Auster, A. S., & Joshua-Tor, L. (2004). The DNA-binding domain of human papillomavirus type 18 E1. Crystal structure, dimerization, and DNA binding. *The Journal of biological chemistry*, 279(5), 3733–3742. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311681200>
- Barnard, P., & McMillan, N. A. (1999). The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology*, 259(2), 305–313. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9771>
- Barnes, B. J., Moore, P. A., & Pitha, P. M. (2001). Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes. *The Journal of biological chemistry*, 276(26), 23382–23390. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101216200>
- Borden, E. C., Sen, G. C., Uze, G., Silverman, R. H., Ransohoff, R. M., Foster, G. R., & Stark, G. R. (2007). Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature reviews. Drug discovery*, 6(12), 975–990. <https://doi.org/10.1038/nrd2422>
- Bergvall, M., Melendy, T., & Archambault, J. (2013). The E1 proteins. *Virology*, 445(1-2), 35–56. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.020>
- Castellsagué X. (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic oncology*, 110(3 Suppl 2), S4–S7. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.07.045>
- Castillo, A., Wang, L., Koriyama, C., Eizuru, Y., Jordan, K., & Akiba, S. (2014). A systems biology analysis of the changes in gene expression via silencing of HPV-18 E1 expression in HeLa cells. *Open biology*, 4(10), 130119. <https://doi.org/10.1098/rsob.130119>
- Castro-Muñoz, L. J., Manzo-Merino, J., Muñoz-Bello, J. O., Olmedo-Nieva, L., Cedro-Tanda, A., Alfaro-Ruiz, L. A., Hidalgo-Miranda, A., Madrid-Marina, V., & Lizano, M. (2019). The Human

Papillomavirus (HPV) E1 protein regulates the expression of cellular genes involved in immune response. *Scientific reports*, 9(1), 13620. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49886-4>

- Chang, Y. E., Pena, L., Sen, G. C., Park, J. K., & Laimins, L. A. (2002). Long-term effect of interferon on keratinocytes that maintain human papillomavirus type 31. *Journal of virology*, 76(17), 8864–8874. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.17.8864-8874.2002>

- Cheng, T. F., Brzostek, S., Ando, O., Van Scoy, S., Kumar, K. P., & Reich, N. C. (2006). Differential activation of IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF-5 transcription factors during viral infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(12), 7462–7470. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7462>

- Cheon, H., Holvey-Bates, E. G., Schoggins, J. W., Forster, S., Hertzog, P., Imanaka, N., Rice, C. M., Jackson, M. W., Junk, D. J., & Stark, G. R. (2013). IFN $\beta$ -dependent increases in STAT1, STAT2, and IRF9 mediate resistance to viruses and DNA damage. *The EMBO journal*, 32(20), 2751–2763. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.203>

- Colón-López, V., Ortiz, A. P., Del Toro-Mejías, L. M., García, H., Clatts, M. C., & Palefsky, J. (2012). Awareness and knowledge of human papillomavirus (HPV) infection among highrisk men of Hispanic origin attending a sexually transmitted infection (STI) clinic. *BMC infectious diseases*, 12, 346. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-346>

- Darnell, J. E., Jr, Kerr, I. M., & Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5164), 1415–1421. <https://doi.org/10.1126/science.8197455>

- Das, D., Bristol, M. L., Smith, N. W., James, C. D., Wang, X., Pichierri, P., & Morgan, I. M. (2019). Werner Helicase Control of Human Papillomavirus 16 E1-E2 DNA Replication Is Regulated by SIRT1 Deacetylation. *mBio*, 10(2), e00263-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00263-19>

- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>

- de Weerd, N. A., & Nguyen, T. (2012). The interferons and their receptors--distribution and regulation. *Immunology and cell biology*, 90(5), 483–491. <https://doi.org/10.1038/icb.2012.9>

- Della Fera, A. N., Warburton, A., Coursey, T. L., Khurana, S., & McBride, A. A. (2021). Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses*, 13(2), 321. <https://doi.org/10.3390/v13020321>

- Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R., & Silverman, R. H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15623–15628. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15623>
- Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., & Murakami, I. (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology*, 25 Suppl 1(Suppl Suppl 1), 2–23. <https://doi.org/10.1002/rmv.1822>
- Doorbar, J., & Griffin, H. (2019). Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins. *Papillomavirus research* (Amsterdam, Netherlands), 7, 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.04.005>
- Doyle, S. E., Schreckhise, H., Khuu-Duong, K., Henderson, K., Rosler, R., Storey, H., Yao, L., Liu, H., Barahmand-pour, F., Sivakumar, P., Chan, C., Birks, C., Foster, D., Clegg, C. H., Wietzke-Braun, P., •
- Egawa, N., & Doorbar, J. (2017). The low-risk papillomaviruses. *Virus research*, 231, 119– 127. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.12.017>
- Enemark, E. J., & Joshua-Tor, L. (2006). Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature*, 442(7100), 270–275. <https://doi.org/10.1038/nature04943>
- Feng, H., Zhang, Y. B., Gui, J. F., Lemon, S. M., & Yamane, D. (2021). Interferon regulatory factor 1 (IRF1) and anti-pathogen innate immune responses. *PLoS pathogens*, 17(1), e1009220. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009220>
- Fensterl, V., Chattopadhyay, S., & Sen, G. C. (2015). No Love Lost Between Viruses and Interferons. *Annual review of virology*, 2(1), 549–572. <https://doi.org/10.1146/annurevvirology-100114-055249>
- Fink, K., & Grandvaux, N. (2013). STAT2 and IRF9: Beyond ISGF3. *JAK-STAT*, 2(4), e27521. <https://doi.org/10.4161/jkst.27521>
- Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M., & Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature immunology*, 4(5), 491–496. <https://doi.org/10.1038/ni921>
- Forero, A., Ozarkar, S., Li, H., Lee, C. H., Hemann, E. A., Nadsombati, M. S., Hendricks, M. R., So, L., Green, R., Roy, C. N., Sarkar, S. N., von Moltke, J., Anderson, S. K., Gale, M., Jr, & Savan, R. (2019).

Differential Activation of the Transcription Factor IRF1 Underlies the Distinct Immune Responses Elicited by Type I and Type III Interferons. *Immunity*, 51(3), 451–464.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.07.007>

- González-Navajas, J. M., Lee, J., David, M., & Raz, E. (2012). Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature reviews. Immunology*, 12(2), 125–135. <https://doi.org/10.1038/nri3133>
- Graham S. V. (2017). Keratinocyte Differentiation-Dependent Human Papillomavirus Gene Regulation. *Viruses*, 9(9), 245. <https://doi.org/10.3390/v9090245>
- Gutiérrez-Hoya, A., & Soto-Cruz, I. (2020). Role of the JAK/STAT Pathway in Cervical Cancer: Its Relationship with HPV E6/E7 Oncoproteins. *Cells*, 9(10), 2297. <https://doi.org/10.3390/cells9102297>
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., & Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813), 740–745. <https://doi.org/10.1038/35047123>
- Hong, S., & Laimins, L. A. (2017). Manipulation of the innate immune response by human papillomaviruses. *Virus research*, 231, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.004>
- Imaizumi, T., Yoshida, H., Hayakari, R., Xing, F., Wang, L., Matsumiya, T., Tanji, K., Kawaguchi, S., Murakami, M., & Tanaka, H. (2016). Interferon-stimulated gene (ISG) 60, as well as ISG56 and ISG54, positively regulates TLR3/IFN- $\beta$ /STAT1 axis in U373MG human astrocytoma cells. *Neuroscience research*, 105, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.09.002>
- Ivancic, R., Iqbal, H., deSilva, B., Pan, Q., & Matrká, L. (2020). Immunological tolerance of low-risk HPV in recurrent respiratory papillomatosis. *Clinical and experimental immunology*, 199(2), 131–142. <https://doi.org/10.1111/cei.13387>
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*, 16(4), 343–353. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>
- James, C. D., Fontan, C. T., Otoa, R., Das, D., Prabhakar, A. T., Wang, X., Bristol, M. L., & Morgan, I. M. (2020). Human Papillomavirus 16 E6 and E7 Synergistically Repress Innate Immune Gene Transcription. *mSphere*, 5(1), e00828-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00828-19>



- James, C. D., Das, D., Bristol, M. L., & Morgan, I. M. (2020). Activating the DNA Damage Response and Suppressing Innate Immunity: Human Papillomaviruses Walk the Line. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 9(6), 467. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060467>
- Jefferies CA (2019). Regulation of IRFs in IFN-driven diseases. *Frontiers in Immunology*, 10, 325. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00325>
- Kaur, B. P., & Secord, E. (2021). Innate Immunity. *Immunology and allergy clinics of North America*, 41(4), 535–541. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2021.07.003>
- Kim, D. H., & Ewbank, J. J. (2018). Signaling in the innate immune response. *WormBook : the online review of C. elegans biology, 2018*, 1–35. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.83.2>
- Lee, D., Sohn, H., Kalpana, G. V., & Choe, J. (1999). Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature*, 399(6735), 487–491. <https://doi.org/10.1038/20966>
- Levy, D. E., Marié, I. J., & Durbin, J. E. (2011). Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Current opinion in virology*, 1(6), 476–486. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.11.001>
- Li, S., Labrecque, S., Gauzzi, M. C., Cuddihy, A. R., Wong, A. H., Pellegrini, S., Matlashewski, G. J., & Koromilas, A. E. (1999). The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferonalph. *Oncogene*, 18(42), 5727–5737. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202960>
- Lin, W., Choe, W. H., Hiasa, Y., Kamegaya, Y., Blackard, J. T., Schmidt, E. V., & Chung, R. T. (2005). Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology*, 128(4), 1034–1041. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.02.006>
- Ma, X., & Yang, M. (2021). The correlation between high-risk HPV infection and precancerous lesions and cervical cancer. *American journal of translational research*, 13(9), 10830–10836.
- Maglennon, G. A., McIntosh, P., & Doorbar, J. (2011). Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology*, 414(2), 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.03.019>

- Mairhofer, J., & Lara, A. R. (2014). Advances in host and vector development for the production of plasmid DNA vaccines. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1139, 505–541. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0345-0\\_38](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0345-0_38)
- Meissl, K., Simonović, N., Amenitsch, L., Witalisz-Siepracka, A., Klein, K., Lassnig, C., Puga, A., Vogl, C., Poelzl, A., Bosmann, M., Dohnal, A., Sexl, V., Müller, M. y Strobl, B. (2020). Las isoformas STAT1 regulan diferencialmente la maduración de las células NK y la actividad antitumoral. *Frontiers in immunology*, 11, 2189. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02189>
- Michalska, A., Blaszczyk, K., Wesoly, J., & Bluysen, H. (2018). A Positive Feedback Amplifier Circuit That Regulates Interferon (IFN)-Stimulated Gene Expression and Controls Type I and Type II IFN Responses. *Frontiers in immunology*, 9, 1135. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01135>
- Mihm, S., & Klucher, K. M. (2006). Interleukin-29 uses a type 1 interferon-like program to promote antiviral responses in human hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 44(4), 896–906. <https://doi.org/10.1002/hep.21312>
- Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T., & Taniguchi, T. (1988). Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell*, 54(6), 903–913. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(88\)91307-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(88)91307-4)
- Morin, G., Fradet-Turcotte, A., Di Lello, P., Bergeron-Labrecque, F., Omichinski, J. G., & Archambault, J. (2011). A conserved amphipathic helix in the N-terminal regulatory region of the papillomavirus E1 helicase is required for efficient viral DNA replication. *Journal of virology*, 85(11), 5287–5300. <https://doi.org/10.1128/JVI.01829-10>
- Morgan, E. L., & Macdonald, A. (2020). Manipulation of JAK/STAT Signalling by High-Risk HPVs: Potential Therapeutic Targets for HPV-Associated Malignancies. *Viruses*, 12(9), 977. <https://doi.org/10.3390/v12090977>
- Motwani, M., Pesiridis, S., & Fitzgerald, K. A. (2019). DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease. *Nature reviews. Genetics*, 20(11), 657–674. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0151-1>
- Negishi, H., Fujita, Y., Yanai, H., Sakaguchi, S., Ouyang, X., Shinohara, M., Takayanagi, H., Ohba, Y., Taniguchi, T., & Honda, K. (2006). Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor

1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(41), 15136–15141. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607181103>

- Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(3), a006049. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006049>

- O'Shea, J. J., Ma, A., & Lipsky, P. (2002). Cytokines and autoimmunity. *Nature reviews. Immunology*, 2(1), 37–45. <https://doi.org/10.1038/nri702>

- Park, J. S., Kim, E. J., Kwon, H. J., Hwang, E. S., Namkoong, S. E., & Um, S. J. (2000). Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 275(10), 6764–6769. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.10.6764>

- Parrini, M., Meissl, K., Ola, M. J., Lederer, T., Puga, A., Wienerroither, S., Kovarik, P., Decker, T., Müller, M., & Strobl, B. (2018). The C-Terminal Transactivation Domain of STAT1 Has a Gene-Specific Role in Transactivation and Cofactor Recruitment. *Frontiers in immunology*, 9, 2879. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02879>

- Platanias L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature reviews. Immunology*, 5(5), 375–386. <https://doi.org/10.1038/nri1604>

- Platanitis, E., Demiroz, D., Schneller, A., Fischer, K., Capelle, C., Hartl, M., Gossenreiter, T., Müller, M., Novatchkova, M., & Decker, T. (2019). A molecular switch from STAT2-IRF9 to ISGF3 underlies interferon-induced gene transcription. *Nature communications*, 10(1), 2921. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10970-y>

- Qin, B. Y., Liu, C., Lam, S. S., Srinath, H., Delston, R., Correia, J. J., Derynck, R., & Lin, K. (2003). Crystal structure of IRF-3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-induced phosphoactivation. *Nature structural biology*, 10(11), 913–921. <https://doi.org/10.1038/nsb1002>

- Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* (2008) 89(Pt 1):1–47. [10.1099/vir.0.83391-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.83391-0)

- Rengachari, S., Groiss, S., Devos, J. M., Caron, E., Grandvaux, N., & Panne, D. (2018). Structural basis of STAT2 recognition by IRF9 reveals molecular insights into ISGF3 function. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 115(4), E601–E609.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1718426115>

- Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*, 148(2), 125–139. <https://doi.org/10.1111/imm.12597>
  - Roman, A., & Munger, K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, 445(1-2), 138–168. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.013>
  - Ronco, L. V., Karpova, A. Y., Vidal, M., & Howley, P. M. (1998). Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes & development*, 12(13), 2061–2072. <https://doi.org/10.1101/gad.12.13.2061>
  - Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., de Sanjosé, S., Fakhry, C., Monk, B. J., Stanley, M. A., & Franceschi, S. (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16086. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.86>
  - Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., & Rice, C. M. (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual review of immunology*, 32, 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
  - Schoggins, J. W., & Rice, C. M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current opinion in virology*, 1(6), 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.008>
  - Schreiber G. (2017). The molecular basis for differential type I interferon signaling. *The Journal of biological chemistry*, 292(18), 7285–7294. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.774562>
  - Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2015). The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(5), a016303. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016303>
  - Stanifer, M. L., Pervolaraki, K., & Boulant, S. (2019). Differential Regulation of Type I and Type III Interferon Signaling. *International journal of molecular sciences*, 20(6), 1445. <https://doi.org/10.3390/ijms20061445>
- Suzuki, M. M., & Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature reviews. Genetics*, 9(6), 465–476. <https://doi.org/10.1038/nrg2341>

- Swindle, C. S., & Engler, J. A. (1998). Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1. *Journal of virology*, 72(3), 1994–2001. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.3.1994-2001.1998>
- Taylor, P., Tamura, T., Kong, H. J., Kubota, T., Kubota, M., Borghi, P., Gabriele, L., & Ozato, K. (2007). The feedback phase of type I interferon induction in dendritic cells requires interferon regulatory factor 8. *Immunity*, 27(2), 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.06.009>
- Takahasi, K., Suzuki, N. N., Horiuchi, M., Mori, M., Suhara, W., Okabe, Y., Fukuhara, Y., Terasawa, H., Akira, S., Fujita, T., & Inagaki, F. (2003). X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. *Nature structural biology*, 10(11), 922–927. <https://doi.org/10.1038/nsb1001>
- Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D., & Taniguchi, T. (2008). The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annual review of immunology*, 26, 535–584. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400>
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., & Tanaka, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual review of immunology*, 19, 623–655. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.623>
- Tummers, B., & Burg, S. H. (2015). High-risk human papillomavirus targets crossroads in immune signaling. *Viruses*, 7(5), 2485–2506. <https://doi.org/10.3390/v7052485>
- Vambutas, A., DeVoti, J., Pinn, W., Steinberg, B. M., & Bonagura, V. R. (2001). Interaction of human papillomavirus type 11 E7 protein with TAP-1 results in the reduction of ATP-dependent peptide transport. *Clinical immunology* (Orlando, Fla.), 101(1), 94–99. <https://doi.org/10.1006/clim.2001.5094>
- Vande Pol, S. B., & Klingelutz, A. J. (2013). Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, 445(1-2), 115–137. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.026>
- Van Doorslaer, K., Li, Z., Xirasagar, S., Maes, P., Kaminsky, D., Liou, D., Sun, Q., Kaur, R., Huyen, Y., & McBride, A. A. (2017). The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic acids research*, 45(D1), D499–D506. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw879>

- Versteeg, G. A., & García-Sastre, A. (2010). Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Current opinion in microbiology*, 13(4), 508–516. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.009>
- Wang, Y., Song, Q., Huang, W., Lin, Y., Wang, X., Wang, C., Willard, B., Zhao, C., Nan, J., Holvey-Bates, E., Wang, Z., Taylor, D., Yang, J., & Stark, G. R. (2021). A virus-induced conformational switch of STAT1-STAT2 dimers boosts antiviral defenses. *Cell research*, 31(2), 206–218. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0386-6>
- Westrich, J. A., Warren, C. J., & Pyeon, D. (2017). Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. *Virus research*, 231, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.023>
- Wu, J., & Chen, Z. J. (2014). Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annual review of immunology*, 32, 461–488. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120156>
- Yanai, H., Negishi, H., & Taniguchi, T. (2012). The IRF family of transcription factors: Inception, impact and implications in oncogenesis. *Oncoimmunology*, 1(8), 1376–1386. <https://doi.org/10.4161/onci.22475>
- Zhou, J., Wang, X., He, K., Charron, J. B., Elling, A. A., & Deng, X. W. (2010). Genome-wide profiling of histone H3 lysine 9 acetylation and dimethylation in Arabidopsis reveals correlation between multiple histone marks and gene expression. *Plant molecular biology*, 72(6), 585–595. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9594-7>