



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA E1 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO  
(VPH) DE ALTO Y BAJO RIESGO EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN  
DE GENES CELULARES**

**TESIS**

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

**PRESENTA:**

M. EN C. LEONARDO JOSUÉ CASTRO MUÑOZ

**DIRECTOR DE TESIS:**

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**COMITÉ TUTOR**

DR. VICENTE MADRID MARINA  
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

DR. ERNESTO SOTO REYES  
UNIVERSIDAD METROPOLITANA DE MÉXICO

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos del Instituto Nacional de Cancerología bajo la dirección de la Dra. Marcela Lizano Soberón

Durante la realización de este trabajo el alumno Leonardo Josué Castro Muñoz fue becario de Doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 282303.

## **A G R A D E C I M I E N T O S**

**A la Dra. Marcela Lizano** por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, por su confianza y recomendaciones para la realización de este proyecto. Gracias por todo el apoyo que me ha brindado.

**Al Dr. Vicente Madrid y Ernesto Soto** por todos sus consejos y sugerencias para la realización de este proyecto. Gracias por siempre tomarse el tiempo para escucharme.

**A los Dres. Leticia Rocha Zabaleta, Rosaura Hernández Rivas, Eréndira Avendaño Vázquez y Mauricio Rodríguez Dorantes** por todos sus comentarios y sugerencias en la revisión de este trabajo.

**Al Dr. Joaquín Manzo Merino** por todas tus aportaciones, por guiarme y enseñarme todo lo necesario para la realización de este proyecto.

**A la M. en C. Adela Carrillo García, a la Dra. Adriana Contreras Paredes.**

**Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto Nacional de Cancerología.**

## DEDICATORIAS

**A mi mamá** por todo tu amor, cariño, paciencia y esfuerzo que has hecho a lo largo de estos años. Por siempre estar conmigo en todo momento, por siempre creer en mí y alimentarme a seguir adelante. Por todos tus consejos y regaños. No tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho y aunque el camino no fue fácil lo logramos, eso que siempre imaginábamos y que veíamos lejos por fin llego. Gracias por ser la mejor mamá del mundo.

**A mis abuelitos:** Chimino por enseñarme que en la vida siempre debemos mostrar humildad, sencillez y respeto hacia los demás, a mi abuelita Raquel por enseñarme que para llegar a la meta debemos luchar por lo que queremos y siempre salir adelante, a pesar de que ya no estas con nosotros, sé que estarás conmigo alegre, contenta y presumiendo por este logro como siempre lo hacías. Estas dos personas que me enseñaron el valor de la familia, la unión, la bondad y que demos ser buenos con los demás. Siempre recuerdo las palabras que me dijeron ya hace ya de 16 años, cuando platique con ustedes y les explique a lo que me quería dedicar, me escucharon y me dijeron “Nos harás sentir muy orgullosos”. Gracias por ser los mejores seres humanos que he conocido.

**A mis Tías:** Charo por siempre brindarme su apoyo, cariño, por todos sus regaños, por todos sus consejos para ser una mejor persona, por creer siempre en mí y por todo su apoyo durante todos estos años. Socorro y Guayla así como a mis Tío: Dámaso por todo su apoyo brindado durante estos años.

**A mis primos:** Naye y Enrri que más que primos somos hermanos por todo su apoyo, cariño y siempre creer mí. **Luisito** eres alguien muy especial que siempre me demuestra que debemos ser valientes, fuertes y que cada día debemos despertar y sonreír a la vida.

**A Joak** gracias por todo tu apoyo desde el primer día que nos conocimos, por ser un gran maestro, amigo y un ejemplo a seguir. Por todas tus palabras de motivación, por tus regaños, por siempre creer y confiar en mí. Por tu paciencia y exigirme para dar lo mejor de mí. Por darme la oportunidad de conocer y buscar nuevos horizontes.

**A todos mis compañeros de laboratorio 3:** Ceci, Les y Omar gracias por todo su apoyo, consejos, regaños y por su gran compromiso que siempre muestran el trabajo y que sobre todo también hay que disfrutarlo. A Lalo, Katy, Licha, Ara, Diego, Liz, Adri, Sil, Iri, Alex, Yun, Joel y Katia. Que más que un grupo somos como una gran familia. Gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado, por hacer que los largos días en el laboratorio sean muy divertidos. A pesar de que cada uno tome su camino siempre seremos parte de Lizanitos Lab.

**A grandes amigos que conocí en el camino** Danny gracias por todo tu apoyo, por brindarme tu amistad por esos momentos tan divertidos e inolvidables que hemos pasado y por siempre estar, pero lo más importante es que a pesar de la distancia siempre vamos a poder contar el uno para el otro. A David gracias por abrirme las puertas de tu casa, por brindarme tu amistad, por todos los consejos y regaños para disfrutar y ver la vida de otra manera.

Si alguien en el 2005 me hubiera dicho que un día me iba a llegar a ser Dr. en Ciencias simplemente no lo hubiera creído ¿por qué? esta es la historia. En 2005 finalicé el bachillerato como técnico Laboralista clínico estaba algo indeciso quería estudiar, estaba entre Q.B.P pero por alguna razón también quería que mi nombre tuviera antes Dr. para lo cual tendría que estudiar medicina pero me apasiono más el laboratorio clínico, así que tenía claro que quería estudiar para químico. Sin embargo, para poder entrar a la carrera que quería tuve que hacer

tres intentos (2005, 2006 y 2007) porque no lograba pasar el examen, cada intento era muy frustrante y me preguntaba si realmente esto era para mí, pero aun así seguí intentando hasta que finalmente en el 2007 logro entrar a la carrera de Q.B.P (y es cuando nace el gusto por el VPH). Cuando termine en el 2012 soñaba en estudiar una maestría en el CINVESTAV, hice el proceso de admisión y logro entrar, pero en primer semestre y un día antes de mi cumpleaños me dijeron que ya no podía seguir que porque en dos materias tenía menos de ocho, fue difícil porque algo que quería me estaba costado mucho y pensé en regresar a acapulco y dejar todo esto, pero por casualidad, llega a mi correo la convocatoria de la maestría en Biomedicina Molecular del IPN, así que después de pensarlo y de contar con el apoyo de mi mamá volví a intentarlo, hice el proceso de admisión y logro entrar, la maestría fue pesada pero me fue muy bien y aprendí mucho. Cuando estaba por terminar la maestría tenía claro que quería seguir estudiando y quería un doctorado, pero ahora quería irme a algo que antes veía como imposible, quería ingresar al doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM. Hice el proceso de admisión y logro entrar, desde que llegue al laboratorio siempre hubo personas que me apoyaron en todo momento, personas de las cuales he aprendido y sigo aprendiendo. El camino no fue fácil pero tampoco imposible ha estado lleno de muchas lecciones y cada vez corroboro que esto es para mí. Es chistoso y emocionante porque tengo el título de Q.B.P y también tendré el grado de Dr. Las dos cosas que quería después de tanto esfuerzo, paciencia y dedicación las obtendré.

Desde hace años y ahora lo confirmo que por algo pasan las cosas, y que todo pasa por alguna razón. Si las cosas no hubieran pasado como lo conté, no hubiera conocido a muchas personas que han sido importante en cada etapa, así, como no hubiera conocido a las personas que anteriormente mencioné. No me queda más que decirles gracias por formar parte importante de esta historia.

**Gracias!!**

**PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA E1 DEL VIRUS DEL  
PAPILOMA HUMANO (VPH) DE ALTO Y BAJO RIESGO  
EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES  
CELULARES**

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	i
ÍNDICE DE TABLAS .....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	iii
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Virus oncogénicos.....	1
1.2. Virus del Papiloma Humano.....	1
1.2.2. Genoma.....	2
1.2.3. Clasificación.....	3
1.2.4. Ciclo replicativo.....	3
1.3. Proteína E1 del VPH.....	6
1.3.1. Estructura.....	6
1.3.2. Función.....	7
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>9</b>
2.1. Regulación de la expresión de genes celulares mediada por virus.....	9
2.2. Regulación de la expresión de genes celulares por las proteínas del VPH.....	11
2.3. Regulación de genes celulares a través de mecanismos epigenéticos mediado por virus.....	12
2.4. E1 del VPH regula la expresión de genes celulares y a modificadores de la cromatina.....	15
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>17</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>5.1. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>18</b>
<b>5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>18</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>

6.1. Línear celular.....	19
6.2. Plàsmidos.....	19
6.3. Transformaciòn bacteriana.....	19
6.4. Aislamiento y purificaciòn de DNA de plàsmidos de expresiòn.....	20
6.5. Transfecciòn.....	21
6.6. Obtenciòn de RNA y sìnthesis de cDNA.....	22
6.7. RNA-seq.....	23
6.8. Reacciòn en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR).....	24
6.9. Western Blot.....	24
6.10. Fraccionamiento Celular.....	26
6.11. Co-Inmunoprecipitaciòn.....	26
6.12. Inmunoprecipitaciòn de la cromatina.....	27
6.13. Analisis Estadístico.....	28
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
7.1. Expresiòn y niveles de E1 del VPH en la linea celular HaCaT.....	29
7.2. E1 de los VPH de alto y bajo riesgo regulan la expresiòn de genes celulares.....	30
7.3. Las proteínas E1 de los VPH de bajo y alto riesgo regulan genes en comùn.....	36
7.4. Las proteínas E1 del VPH-16, 18 y 11 disminuyen la expresiòn de <i>IFN<math>\beta</math>1</i> e <i>IFN<math>\lambda</math>1</i> .....	37
7.5. E1 de los VPH de alto y riesgo activa la vía de NF- $\kappa$ B.....	41
7.6. E1 del VPH de alto y bajo riesgo disminuyen los niveles proteicos de HDAC3 y aumenta los niveles de la marca de histona H3K9ac.....	42
7.7. E1 del VPH-16 se une a la regiòn promotora del gen de IFN- $\beta$ .....	44
<b>8. DISCUSIÒN .....</b>	<b>47</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>57</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>58</b>
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>69</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática del genoma del VPH-16 .....	2
<b>Figura 2.</b> Ciclo replicativo del VPH en el epitelio plano escamoso estratificado .....	5
<b>Figura 3.</b> Replicación del genoma de VPH.....	8
<b>Figura 4.</b> Estructura de la proteína E1 del VPH.....	8
<b>Figura 5.</b> Expresión y niveles de E1 del VPH-16,18 y 11 .....	29
<b>Figura 6.</b> La proteína E1 del VPH-16 altera redes celulares involucradas en la respuesta inmune, el ensamblaje de la unión sustrato celular y la proliferación celular .....	32
<b>Figura 7.</b> La proteína E1 del VPH-18 altera redes celulares involucradas en la respuesta inmune y la respuesta a corticosterona.....	33
<b>Figura 8.</b> La proteína E1 del VPH-11 altera redes celulares involucradas en la respuesta inmune. ....	34
<b>Figura 9.</b> Las proteínas E1 del VPH16, 18 y 11 alteran genes en común asociadas con la respuesta inmune antiviral.....	35
<b>Figura 10.</b> La proteína E1 de los VPH-16, 18 y 11 regulan negativamente la expresión de <i>IFNβ1</i> e <i>IFNλ1</i> .....	36
<b>Figura 11.</b> La proteína E1 de VPH-16, 18 y 11 regulan negativamente la expresión de genes estimulados por interferón.....	37
<b>Figura 12.</b> Poly I: C induce la expresión de <i>IFNβ1</i> . ....	38
<b>Figura 13.</b> La proteína E1 del VPH disminuye la expresión de <i>IFNβ1</i> e <i>IFNλ1</i> en presencia del agonista Poly I: C .....	39
<b>Figura 14.</b> E1 del VPH de alto y bajo riesgo activa la vía de NF-kB. ....	40
<b>Figura 15.</b> E1 del VPH de alto y bajo riesgo disminuye e interactúa in vivo con HDAC3.....	42
<b>Figura 16.</b> La proteína E1 de los VPH-16,18 y 11 aumentan la acetilación de la lisina 9 de la histona H3.....	42
<b>Figura 17.</b> E1 del VPH-16 no se une a regiones del promotor de <i>IFN-β1</i> .....	59

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Proteínas celulares reguladas por virus oncogénicos. ....	10
<b>Tabla 2.</b> Mecanismos epigenéticos regulados por virus.....	14
<b>Tabla 3.</b> Lista de primers usados.....	21
<b>Tabla 4.</b> Procesos celulares afectados por la presencia de la proteína E1 de VPH de alto y bajo riesgo. ....	30
<b>Tabla 5.</b> Genes expresados diferencialmente en presencia de E1 del VPH-16, 18 y 11..	35

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>°C</b>	Grados Centígrados
<b>μL</b>	Microlitro
<b>ChIP</b>	Inmunoprecipitación de la cromatina
<b>Co-IP</b>	Co-inmunoprecipitación
<b>Co-IP</b>	Co-inmunoprecipitación
<b>DBD</b>	Dominio de Unión al DNA
<b>DBD</b>	Dominio de unión del DNA
<b>DMEM-F12</b>	Medio Eagle de Dulbecco modificado F12
<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>EBV</b>	Epstein-Barr
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>H1</b>	Histona 1
<b>H2A</b>	Histona 2A
<b>H2B</b>	Histona 2B
<b>H3</b>	Histona 3
<b>H3K9ac</b>	Acetilación de la lisina 9 de la histona 3
<b>H4</b>	Histona 4
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>HAT</b>	Acetiltransferasa de histonas
<b>HCMV</b>	Citomegalovirus
<b>HDAC</b>	Desacetilasa de histonas
<b>HTLV-1</b>	Virus Linfotrópico T Humano
<b>IFNβ1</b>	Interferón Beta 1
<b>IFNλ1</b>	Interferón Lamda 1
<b>ISG</b>	Genes Estimulados por Interferón
<b>kDa</b>	Kilo Daltons
<b>KDMT</b>	Desmetilasa de histonas
<b>KMT</b>	Metil transferasa de lisinas
<b>KSHV</b>	Sarcoma Kaposi asociado a herpesvirus

<b>LB</b>	Medio Luria Berth
<b>LCR</b>	Región Larga de Control
<b>MHC</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>Min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MPH</b>	Modificaciones Post-traduccionales de las Histonas
<b>NLS</b>	Señal de Localización Nuclear
<b>p-Adj</b>	Valor de p Ajustada
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>Poly IC</b>	Polyinosinic:polycytidylic acid
<b>qPCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo real
<b>RIN</b>	Rango de Integridad del DNA
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RNA-seq</b>	Secuenciación de RNA
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>siRNAs</b>	RNAs cortos de interferencia
<b>TLR</b>	<i>Toll like receptor</i>
<b>VHB</b>	Hepatitis B
<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

## RESUMEN

La proteína E1 del virus del papiloma humano (VPH) es la única proteína del VPH con actividad enzimática. La principal función conocida de esta proteína es la regulación de la replicación del ADN viral. Sin embargo, se ha demostrado que el silenciamiento del RNAm de E1 del VPH-18 en las células HeLa (adenocarcinoma), promueve la desregulación de diversos genes, particularmente aquellos involucrados en mecanismos de defensa del huésped contra infecciones virales; sin embargo, no se ha estudiado la contribución específica de la proteína E1 en un contexto no tumorigénico. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la proteína E1 del VPH en la regulación de la expresión de genes celulares a través de RNA-seq. Encontrando que las proteínas E1 de VPH-16 y 18 indujeron la sobreexpresión de diferentes conjuntos de genes asociados con procesos de proliferación, invasión, diferenciación y angiogénesis, procesos involucrados en la transformación celular. E1 de VPH-16, 18 y 11 regularon negativamente genes de como *IFN $\beta$ 1* e *IFN $\lambda$ 1* y genes estimulados por interferón (*CCL5*, *VIPERIN*, *IFIT2*), los cuales están involucrados en la respuesta inmune antiviral. Juntos, nuestros resultados indican que las proteínas E1 del VPH de alto y bajo riesgo juegan un papel importante en la inhibición de la respuesta inmune antiviral.

Los mecanismos por los cuales la proteína E1 regula la expresión génica aún no se han determinado. Mecanismos epigenéticos juegan un papel importante en la regulación de la expresión de genes. Se ha determinado que la proteína E1 es capaz de interactuar con modificadores de cromatina, histona 1 (H1), una subunidad del complejo de remodelador de cromatina (Ini1 / hSNF5) y SIRT1, las cuales promueven la replicación viral. Otros modificadores de la cromatina son las desacetilasas de histonas (HDAC) los cuales pueden regular la expresión de genes celulares y virales. No obstante, aún se desconoce el efecto de E1 sobre HDAC, específicamente en HDAC3. Aquí, mostramos, que las proteínas E1 de VPH de alto y bajo riesgo disminuyen los niveles de proteína e interactúan con HDAC3, además, aumentan el nivel de la marca de activación transcripcional (H3K9ac). Este resultado sugiere que la proteína E1 puede tener un efecto sobre la HDAC3, que a su vez podría modular la expresión de los genes del huésped. En conjunto estos resultados aportan nueva evidencia de que la proteína E1 del VPH tiene otra función independiente a la replicación viral, ya que es capaz de inducir cambios en la expresión de genes celulares, pudiendo favorecer tanto el ciclo replicativo y/o la carcinogénesis.

## ABSTRACT

The E1 protein of the human papilloma virus (HPV) is the only HPV protein with enzymatic activity. The main known function of this protein is to regulate viral DNA replication. However, silencing of HPV-18 E1 mRNA in HeLa cells (adenocarcinoma) has been shown to promote dysregulation of various genes, particularly those involved in host defense mechanisms against viral infections; however, the specific contribution of the E1 protein has not been studied in a non-tumorigenic context. The objective of this work was to determine the effect of the HPV E1 protein on the regulation of cellular gene expression through RNA-seq. Finding that HPV-16 and 18 E1 proteins induced the overexpression of different sets of genes associated with processes of proliferation, invasion, differentiation and angiogenesis, processes involved in cell transformation. On the other hand, HPV-16, 18 and 11 E1 negatively regulated genes such as IFN $\beta$ 1 and IFN $\lambda$ 1 and genes stimulated by interferon (CCL5, VIPERIN, IFIT2), which are involved in the antiviral immune response. Together, our results indicate that high and low risk HPV E1 proteins play an important role in inhibiting the antiviral immune response.

The mechanisms by which the E1 protein regulates gene expression have not yet been determined. Epigenetic mechanisms play an important role in the regulation of gene expression. The E1 protein has been determined to be capable of interacting with chromatin modifiers: histone 1 (H1), a subunit of the chromatin remodeling complex (Ini1 / hSNF5) and SIRT1, these interactions have only been shown to promote viral replication. Other chromatin modifiers are histone deacetylases (HDAC) which can regulate the expression of cellular and viral genes. However, the effect of E1 on HDAC, specifically HDAC3, is still unknown. Here, we show, the high and low risk HPV E1 proteins decrease protein levels and interact with HDAC3, in addition, they increase the level of the transcriptional activation mark (H3K9ac). This result suggests that the E1 protein may have an effect on HDAC3, which in turn could modulate the expression of host genes. Together these results provide new evidence that the HPV E1 protein has another function independent of viral replication, since it is capable of inducing changes in the expression of cellular genes, being able to favor both the replicative cycle and/or carcinogenesis.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Virus oncogénicos

Los virus oncogénicos son responsables de aproximadamente el 20% del total de casos de cáncer en humanos (Lou et al., 2015). Esto se debe a su capacidad de alterar diferentes procesos celulares tales como proliferación, diferenciación, apoptosis, que finalmente promueven la carcinogénesis (Sevik et al., 2011). Dentro de los virus denominados oncogénicos encontramos al virus Epstein Barr, Virus de la Hepatitis B, Virus de la Hepatitis C, Virus del Papiloma Humano (VPH), Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (HIV1), Virus linfotrópico de células T tipo 1 (HTLV-1), Virus de Sarcoma de Kaposi y el recientemente identificado, Poliomasvirus de células de Merkel (Krump et al., 2018). De todos ellos, el VPH es causante de la infección de transmisión sexual más prevalente a nivel mundial, el cual juega un papel importante en el desarrollo de distintos tipos de cáncer y afecta tanto a hombres como a mujeres (Álvarez-Argüelles et al., 2013).

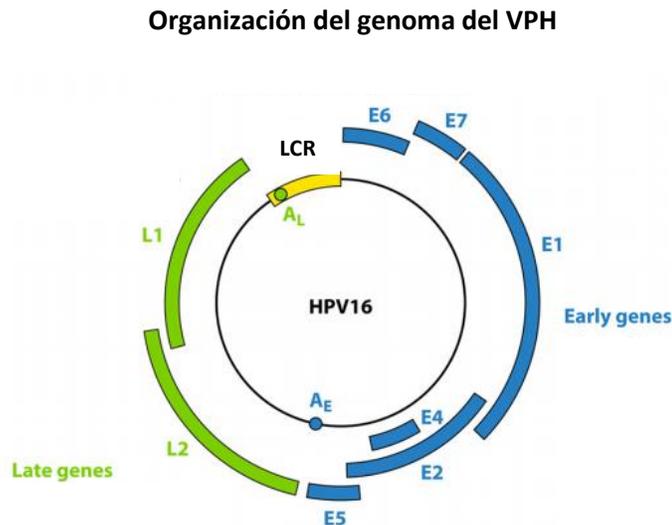
### 1.2. Virus del Papiloma Humano

#### 1.2.1. Estructura

Los VPH son virus pequeños que pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, miden aproximadamente 55 nm de diámetro y carecen de envoltura. Presentan una cápside icosaédrica compuesta por las proteínas virales L1 y L2, las cuales se organizan en pentámeros de L1 donde el centro es ocupado por una unidad de la proteína L2. Finalmente, la cápside se compone por 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), misma que alberga al genoma viral. Los VPH son causantes de verrugas genitales, algunos de los cuales poseen la particularidad de producir transformación celular, de ahí su gran relevancia en salud pública (Doorbar et al., 2015).

### 1.2.2. Genoma

El genoma del VPH consiste en una doble cadena de DNA de forma circular compuesta por aproximadamente 8,000 pares de bases (pb), la cual presenta tres regiones: 1) región larga de control (LCR) o URR (del inglés “*untranslated regulatory region*”), que contiene los elementos necesarios para la replicación y transcripción de los genes virales (promotor, *Enhancer*) así como el origen de replicación viral (ORI); 2) región de genes tempranos (E: *early*) que codifica para 7 proteínas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) involucradas en los procesos de replicación y transcripción del genoma viral, mismas que se expresan poco después de la infección y 3) región de genes tardíos (L: *Late*) que codifica para las proteínas L1 y L2 que componen la cápside, las cuales se expresan en la fase final del ciclo viral (figura 1) (Stanley, 2012; Kim, 2016) (Figura 1).



**Figura 1. Representación esquemática del genoma del VPH-16.** Se muestran las tres regiones en las que se divide el genoma del VPH. La región larga de control (LCR), la región de genes tempranos (E) y la región de genes tardíos (verde) que codifican para las proteínas de la cápside (L1-L2) (Stanley, 2012).

### 1.2.3. Clasificación

A la fecha, se han descrito más de 200 tipos de VPH, de los cuales cerca de 40 infectan la región ano-genital, estos se clasifican con base a su potencial oncogénico en: a) VPH de bajo riesgo (BR), asociados al desarrollo de condilomas genitales y a lesiones de bajo grado, encontrando a los tipos 6 y 11 como los más frecuentes y en b) VPH de alto riesgo (AR), los cuales se asocian con el desarrollo de distintos tipos de cáncer, siendo los tipos 16 y 18 los más prevalentes (Bzhalava et al., 2013; Doorbar et al., 2017).

### 1.2.4. Ciclo replicativo

Para llevar a cabo su ciclo replicativo, los VPH infectan las células del epitelio plano estratificado escamoso, las partículas virales acceden a las células de la membrana basal a través de microlesiones en donde ingresa a la célula al interactuar con diversas moléculas y receptores incluyendo el heparán sulfato proteoglicano de la membrana basal,  $\alpha$ -integrina, receptor del factor de crecimiento epidérmico (GFR), receptor del factor de crecimiento de queratinocitos (KGFR), a través de un mecanismo mediado por endocitosis (Raff *et al.*, 2013). Una vez formado el endosoma temprano, este viaja a través del citoplasma y comienza un proceso de maduración del mismo hacia endosoma tardío, fusionándose finalmente con los lisosomas (Siddiqi et al., 2019). Debido a la acidez de los lisosomas, se lleva a cabo el desensamble del virión con la subsecuente liberación del genoma viral, mismo que es rescatado por la proteína L2 de la degradación lisosomal (Wang et al., 2013), al interactuar con proteínas del retrómeto como Sorting Nexin 17 (SXN17), formándose el complejo L2-DNA viral (Bergant and Banks, 2013).

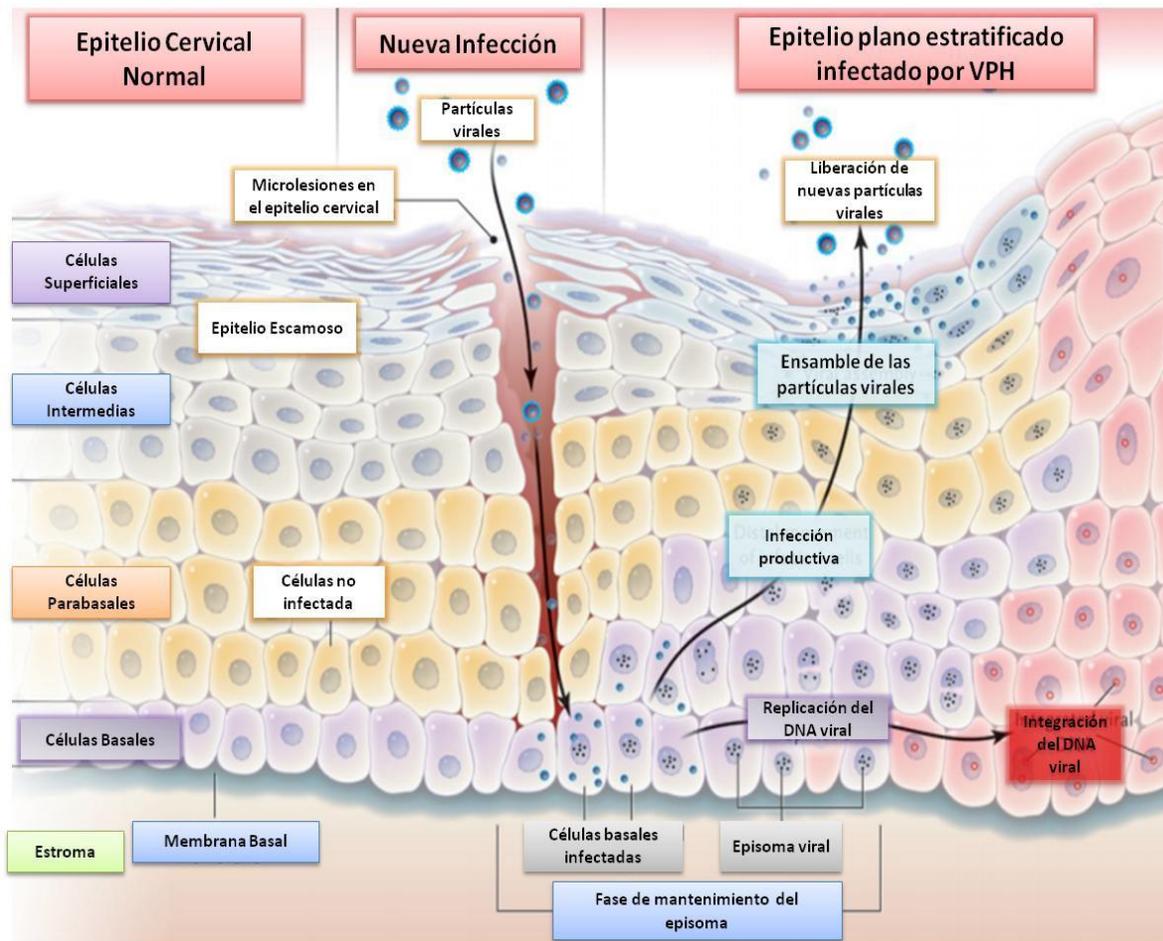
Una vez liberado, el DNA viral es transportado al núcleo. Se ha estudiado que la proteína L2 juega un papel importante en la entrada del genoma viral al núcleo (Pyeon, 2009); sin embargo, el mecanismo preciso de importación nuclear del

DNA viral aún no ha sido descrito en su totalidad. A este respecto, se postula que L2 interactúa con ciertas proteínas nucleares como Hsc70 facilitando el transporte del genoma viral del citoplasma al núcleo, por otra parte, también se ha determinado que el complejo L2-DNA viral (L2-vDNA) interactúa con la proteína motora dineína a través del dominio C-terminal de L2, que a su vez interactúa con la red de microtúbulos de actina conduciendo al complejo de L2-vDNA, del citoplasma hacia al núcleo (Wang y Roden, 2013).

Una vez que el genoma viral se encuentra dentro del núcleo, comienza la expresión de los genes tempranos E1 y E2 los cuales regulan la replicación y transcripción del genoma viral, manteniéndolo en forma episomal en un bajo número de copias (50-200 copias/cel) (Egawa et al., 2012). Además, en las células basales se expresan los genes que codifican para las proteínas E6 y E7 los cuales promueven la proliferación celular, evasión de la apoptosis y retraso en la diferenciación celular, todo esto necesario para el establecimiento de la infección productiva (Bodily and Laimins, 2011). Durante esta etapa los niveles de expresión de E6 y E7 son regulados por la proteína E2 ya que actúa como un regulador negativo de estos genes debido a que, durante el proceso de replicación viral, E2 se une a un sitio cercano al promotor de E6 y E7 impidiendo su transcripción (McBride, 2013). Además, la proteína E2, favorece la correcta segregación del genoma viral durante las infecciones persistentes, debido a que interactúa con la proteína BDR4 que se asocia a la cromatina durante la división celular, por otro lado, E2 interactúa con el episoma viral, durante la mitosis hay una segregación de las cromátidas, así como del genoma viral, asegurando que las células hijas contengan copias episomales del VPH (Jang et al., 2009).

Durante la infección productiva, las células basales comienzan a diferenciarse, esto ocasiona un incremento en la expresión de la proteína temprana E1, se ha descrito que durante esta etapa se alcanzan altos niveles de esta proteína, así como de E2, E4 y E5 los cuales promueven la amplificación del genoma en las capas intermedias del epitelio (Doorbar, 2006) (Figura 2). La proteína E5

promueve la proliferación celular debido a que ocasiona una relocalización membranal de receptores para factores de crecimiento, así mismo esta proteína inhibe componentes de la respuesta inmune, por ejemplo, interfiere con la capacidad de las células para presentar antígenos a través del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II) evitando la activación de los linfocitos T (DiMaio et al., 2013). Además, es capaz de evitar la activación de las células NKT al interferir con el procesamiento de CD1d (Miura et al., 2010), ayudando en la evasión de la respuesta inmune favoreciendo el proceso infeccioso inducido por el VPH. En las células superficiales del epitelio estratificado escamoso actúan las proteínas tardías L1 y L2, que se encargan del ensamble de la cápside del virus (Stanley, 2012). Por su parte, la proteína E4 promueve el colapso de la red de queratina (evita la fosforilación de la queratina al interferir con la cinasa celular 14-3-3), necesaria para la liberación de los viriones en las capas superficiales y así asegurar un nuevo ciclo infeccioso (Wang et al., 2004; Doorbar, 2013).



**Figura 2. Ciclo replicativo del VPH en el epitelio plano escamoso estratificado.** El VPH infecta las células basales a través de microlesiones infectando las células basales, donde inicia una fase de mantenimiento del genoma. Al dividirse, una de las células hijas infectada se diferencia, iniciando la fase de la infección productiva en donde se expresarán diversos genes para el mantenimiento y amplificación del genoma. En las capas superficiales, se lleva a cabo el ensamblaje de la cápside viral debido a la expresión de las proteínas tardías L1 y L2. Finalmente se liberan nuevos viriones que infectan nuevas células. En algunos casos, el genoma viral se integra al genoma celular, siendo este un evento importante para la carcinogénesis (Modificado de Kahn, 2009)

La integración del DNA del VPH al genoma de la célula huésped, es un evento importante en el proceso carcinogénico inducido por este virus, esto se lleva a cabo cuando existe una ruptura del genoma del VPH en la región de E2, conllevando a la sobre-expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7, ocasionando la transformación celular (proliferación descontrolada, resistencia a la apoptosis, evasión de la respuesta inmune y la inmortalización celular) (Stanley, 2012; Doorbar *et al.*, 2015; Lentz y Shideler, 2016).

Una de las proteínas del VPH que se encuentra presente durante todo el ciclo replicativo es E1, además, esta proteína ha tomado relevancia en los últimos años no solo por su papel en la replicación del genoma viral, si no también, por algunos estudios que indican un papel en la regulación de la expresión de genes de la célula huésped, implicados en el desarrollo a cáncer, así como su probable participación en la alteración de la respuesta inmune (Castillo *et al.*, 2014; Baedyananda *et al.*, 2017). Sin embargo, estos novedosos roles han sido poco estudiados.

### **1.3. Proteína E1 del VPH**

#### **1.3.1. Estructura**

E1 es una proteína que posee una localización tanto nuclear como citoplásmica, está altamente conservada y es la de mayor longitud codificada por el VPH. Su tamaño varía dependiendo del tipo viral, desde 600 hasta 650 aminoácidos con un

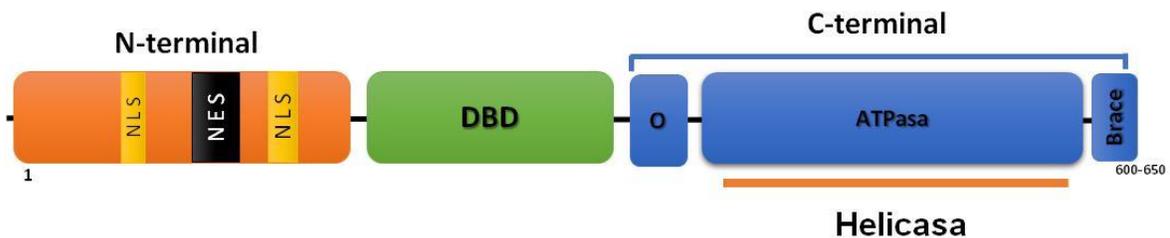
peso molecular de 67 a 72 kDa, siendo la única proteína del VPH que posee actividad enzimática (Bergvall *et al.*, 2013). La proteína E1 se divide en 3 dominios funcionales (Figura 3) incluyendo una región amino terminal, un dominio de unión al DNA y una región ATPasa, importantes para desempeñar sus funciones de helicasa durante la amplificación del genoma viral (Côté-Martin *et al.*, 2008; Bergvall *et al.*, 2013).

La región amino terminal (N-terminal) de aproximadamente 200 aminoácidos, es el dominio menos conservado de la proteína E1. Incluye dos señales de localización nuclear (NLS) y una señal de exporte nuclear (NES), así como un motivo de unión a ciclinas (CBM) involucrado en su interacción con ciclina A/E y con el complejo cinasa dependiente de ciclina 2 (Cdk2), entre otras cinasas (Bergvall *et al.*, 2013). El Dominio de unión al DNA (DBD) reconoce secuencias específicas en el origen de replicación “Ori” de la LCR y el extremo carboxilo terminal (C-terminal) contiene un dominio de helicasa (DH) dependiente de ATP, un dominio de oligomerización (O) necesario para oligomerizarse ya sea en un doble-hexámero en presencia del Ori y ATP o en un hexámero en presencia de ssDNA. Finalmente, contiene una región denominada abrazadera (*Brace*), una secuencia corta flexible que juega un papel en el montaje y estabilización del hexámero E1 sobre el DNA. Este mecanismo de estabilización de hexámero se conserva en las proteínas E1 de todos los tipos de VPH (Côté-Martin *et al.*, 2008; Bergvall *et al.*, 2013).

### **1.3.2. Función de E1**

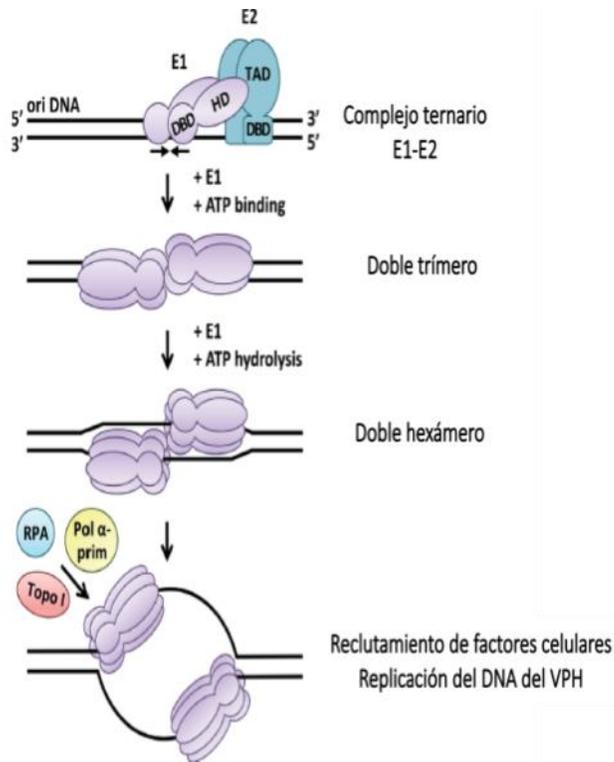
Hasta ahora, la única función atribuida para esta proteína es en la replicación del DNA del VPH, la cual inicia cuando E1 se une al *Ori* con ayuda de la proteína viral E2, la cual ayuda a posicionar y estabilizar a E1 en el *Ori*, formando el complejo ternario E1-E2-*ori*. Este complejo sirve como base para reclutar más unidades de la proteína E1 así como ATP, formando un doble-trímero (DT) de E1. Posteriormente se reclutan más unidades de proteína E1 y se lleva a cabo la hidrólisis de ATP, el DT de E1 se convierte en un doble-hexámero en el que cada

uno de los dos hexámeros circunda una cadena del DNA, provocando la apertura de la misma. Esto conlleva al reclutamiento de la maquinaria de replicación celular, que incluye a la DNA polimerasa  $\alpha$  primasa (Pol  $\alpha$ -prim), Topoisomerasa I (Topo I), proteína de replicación A (RPA), el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y la DNA polimerasa  $\delta$ , que finalmente permite la replicación del DNA del VPH (Figura 4) (Melendy et al., 1995; Park et al. 1994; Han et al., 1999; Hu et al., 2006).



**Figura 3. Estructura de la proteína E1 del VPH.** La región amino N-terminal (naranja) posee dos señales de localización nuclear bipartita (NLS) (amarillo) y una señal de exporte nuclear (NES) (negro). De color verde se indica el dominio de unión al DNA (DBD) requerido para su interacción con el origen de replicación (*Or*). La región de oligomerización (O), el dominio de unión a ATP y la abrazadera se localizan en la región Carboxilo C-terminal (color azul), necesarios para su interacción con otras proteínas E1 y para la actividad de helicasa (Bergvall *et al.*, 2013).

La capacidad de E1 para promover la formación de la horquilla de replicación involucra su interacción con una variedad de proteínas con actividades diversas, haciendo pensar que E1, no solo sería capaz de participar en la replicación del genoma viral, sino que podría de cierta manera regular otros procesos en el DNA celular, dentro de ellos, la regulación de la expresión de genes celulares, evento que ha sido estudiado para otros virus en diversas patologías



**Figura 4. Replicación del genoma de VPH.** La replicación del DNA viral se inicia con el reclutamiento de E1 al Ori en la LCR con ayuda de E2, resultando en el montaje de un complejo ternario E1-E2-ori. Este recluta más proteínas E1 formándose un doble-trímero de E1 (DT), además se da la unión de ATP. El DT recluta nuevas moléculas de E1 convirtiéndolo rápidamente en un doble hexámero con la posterior hidrólisis de ATP y la subsecuente formación de la horquilla de replicación, favoreciendo la replicación del genoma del VPH. Tomado de Bergvall et al., 2013.

## 2.1. Regulación de la expresión de genes celulares mediada por virus

Se ha demostrado que, durante la infección por diversos virus, se producen cambios en la expresión de genes celulares favoreciendo el ciclo replicativo viral (Krishnan et al., 2004). En un estudio realizado por Zhu y cols. (1998) se evaluó la expresión de genes celulares a los 40 min, 8 h y 24 h post-infección por citomegalovirus (HCMV) encontrando que, 27 transcritos se sobre-expresaron a los 40 min, mientras que a las 8 y 24 h post-infección 93 y 364 transcritos aumentaron respectivamente (Zhu et al., 1998). Entre las proteínas celulares afectadas por la infección viral se encontraron proteínas asociadas a interferón, citocinas, sistemas de degradación de proteínas y factores de transcripción, indicando que la presencia del virus es capaz de inducir cambios en la expresión de genes celulares.

Diversos mecanismos han sido propuestos para explicar los efectos de los virus sobre la expresión de genes, destacando que los herpes virus 1 y 2 (HSV-1 y -2),

herpes virus asociados a sarcoma de Kaposi (KSHV) y los virus Epstein Barr (EBV) son capaces de regular la expresión de genes celulares a través de mecanismos utilizados en común, como la inhibición de la iniciación y terminación de la transcripción, inhibición del “*splicing*” y la degradación de los RNAm en el citoplasma (Rivas et al., 2016). Price y colaboradores (2012) determinaron los cambios en la expresión de genes celulares inducidos por EBV en líneas celulares derivadas de linfocitos B transformados (linfoblastoide) mediante el uso de microarreglos de expresión, encontrando que la presencia de EBV provocó un aumento en genes asociados a procesos de proliferación celular, respuesta a estrés, la vía de p53, citoesqueleto, así como inhibición de la apoptosis e interesantemente afectó la actividad del factor transcripcional NF- $\kappa$ B (Price et al., 2012). Un estudio realizado por Kang y colaboradores (2018), demuestran que la presencia del VPH-16 en queratinocitos cervicales primarios (16HCK) induce cambios en la expresión de genes celulares afectando diversos celulares asociados a la carcinogénesis (proliferación, respuesta inmune, diferenciación) (Kang et al., 2018).

Si bien la presencia de los virus ocasiona un cambio en la expresión de genes celulares, se ha demostrado que ciertas proteínas virales inducen cambios en la expresión génica mediante la regulación de factores y co-factores transcripcionales. Estos datos sugieren que, durante la infección viral se producen cambios importantes en la expresión de genes celulares no solo para favorecer el ciclo replicativo viral sino también para alterar procesos clave implicados en la transformación celular (Tabla 1).

**Tabla 1.** Proteínas celulares asociadas a regulación transcripcional afectadas por virus oncogénicos. (Modificada de Mesri et al, 2014; Dayaram et al., 2008; Roman et al., 2013; Vande et al., 2013).

Virus	Proteína viral	Proteínas celulares
<b>EBV</b>	EBNA LMP-1 LMP-2A	NFκB PI3K, ERK1/2
<b>HBV</b>	HBx	p53, Rb, Wnt, src, DNMTs, ras, PI3K JNK, NF-κB, ERK1/2. TGFβ, HDACs
<b>HCV</b>	Core, NS3, Ns5A	p53, PARP, hTERT, TGFβ, HDACs,
<b>HTLV-1</b>	Tax	NFκB, CREB, PI3K, DDR
<b>KSHV</b>	vFLIP LANA vGPCR vIRF-1	NFκB p53, Rb, HIF, Notch, Wnt PI3K-AKT-mTOR, ERK, p38, JNK, NFκB, IFN, p53, ATM, Bim
<b>VPH</b>	E6  E7	p53, E6AP, IRF3, P300, AP-1, NOTCH E2F, BRG1, c-FOS, DNMT1, SIRT1, hTERT

**EBV:** Epstein-Barr, **VHB:** Hepatitis B, **VPH:** Virus del Papiloma Humano, **HCMV:** Citomegalovirus, **HTLV-1:** Virus Linfotrópico T Humano, **KSHV:** Sarcoma Kaposi asociado a herpesvirus.

## 2.2. Regulación de la expresión de genes celulares por las proteínas del VPH

Se ha demostrado que algunas proteínas del VPH como E2, E6 y E7 son capaces de regular la expresión de genes celulares para favorecer el ciclo replicativo o la carcinogénesis. E2 es una proteína de expresión temprana, que actúa como un regulador transcripcional de la expresión de genes virales (McBride, 2013), que además, se ha descrito que puede regular la expresión de genes celulares, tal como lo demuestran los estudios realizados por Ramírez et al. (2011) y Fuentes-González et al. (2019) donde observan que la presencia de E2 del VPH-16 y VPH-18, respectivamente, induce cambios en la expresión de genes asociados a

procesos de apoptosis, proliferación y diferenciación en la línea celular C33-A (Ramírez et al., 2011; Fuentes-González et al., 2019).

Por otra parte, las proteínas E6 y E7 son capaces de promover la transformación celular (Tomaić, 2016), lo que se debe en gran parte a su habilidad para regular la expresión de genes celulares. Un estudio realizado por Smith y colaboradores (2016), analizó que la presencia de E6 y E7 del VPH-16 indujo cambios en reguladores transcripcionales en un modelo celular derivado de cáncer de cérvix (W12), encontrando que en presencia de E6 del VPH-16 siete reguladores transcripcionales maestros se expresaron diferencialmente (*EGR3*, *FOSB*, *NR4A2*, *PRDM1*, *SOX9*, *OVOL1* y *MNT*) y cinco más en presencia de E7 (*PA2G4*, *ENO1*, *TEAD4*, *FOXO4* y *ZNF365*) (Smith et al., 2016). Yang y colaboradores (2019), a través de la tecnología RNA-seq, mostraron que la presencia de E6/E7 de VPH-16 indujo cambios en la expresión de genes celulares en queratinocitos primarios. Los autores observaron que la presencia de las oncoproteínas E6 y E7 provocó cambios en 301 genes (120 sobre-expresados y 181 sub-expresados), los cuales están involucrados en diferentes procesos celulares como adhesión celular, crecimiento tumoral, citólisis, diferenciación de queratinocitos, formación de colonias, muerte celular, respuesta inmune e invasión (Yang et al., 2019). Por lo tanto, las oncoproteínas del VPH son capaces de promover cambios en la expresión de genes a través de la alteración de reguladores transcripcionales, teniendo un impacto tanto en el ciclo replicativo como en la carcinogénesis.

### **2.3. Regulación de genes celulares a través de mecanismos epigenéticos mediado por virus**

La cromatina es una estructura altamente ordenada compuesta por DNA, RNA, histonas y otras proteínas cromosómicas, la cual ayuda a compactar el DNA dentro del núcleo y a regular diferentes procesos celulares como la replicación, transcripción y el daño al DNA (Black et al., 2011). La cromatina tiene como unidad mínima al nucleosoma o fibra de 10 nm constituida por dímeros de cuatro

proteínas básicas llamadas histonas (H2A, H2B, H3 y H4), mismas que conforman el *core* nucleosomal sobre el cual se asocian aproximadamente 146 pares de bases del DNA (Chen et al., 2014). El siguiente nivel de organización de la cromatina es la fibra de 30 nm o solenoide, la cual se forma con ayuda de la histona H1 o histona *linker*, esta se une al DNA que se encuentra libre entre los nucleosomas (Maeshima et al., 2013). La fibra de 30 nm se pliega sobre sí misma y forma “*bucles*” de cromatina con un tamaño promedio de entre 50-100 Kpb de DNA. Posteriormente, estos *bucles* se pliegan y súper enrollan para finalmente obtener los cromosomas que se observan en metafase, el cual representa el máximo nivel de compactación (Annunziato et al., 2008). La presencia de nucleosomas o la fibra de 30 nm se convierte en un impedimento para llevar a cabo diferentes procesos celulares como la transcripción, ocasionando que las secuencias del DNA no sean accesibles a los factores celulares encargados de llevar a cabo estos procesos (Annunziato et al, 2008). Adicionalmente, diversos mecanismos epigenéticos están asociados a la regulación de la expresión de genes. A la fecha, se han descrito seis mecanismos epigenéticos: 1) Metilación del DNA, 2) modificaciones post-traduccionales de las histonas (MPH), 3) Complejos remodeladores de la cromatina ATP-dependientes, 4) Variantes de histonas), 5) RNAs no-codificantes y 6) Organización tridimensional de la cromatina, los cuales tienen un efecto sobre la cromatina promoviendo o evitando el reconocimiento de secuencias del DNA por factores en *trans* con un impacto en la expresión de genes celulares (Felsenfeld, 2014; Aristizabal et al., 2019).

Los virus de DNA como los poliomavirus, adenovirus, VPH, herpesvirus y virus de la hepatitis B son capaces de organizar su genoma en cromatina (Lieberman et al., 2008). Esto es necesario para regular diferentes procesos en el genoma viral como, la replicación, la transcripción, la estabilización del genoma y el empaquetamiento de viriones (Balakrishnan et al., 2017). Además, se ha demostrado que algunos virus son capaces de regular algunos mecanismos epigenéticos como la Metilación del DNA, modificaciones post-traduccionales de las histonas, complejos remodeladores ATP-dependientes, variantes de histonas,

RNAs no-codificantes y la organización tridimensional de la cromatina, favoreciendo su ciclo replicativo (tabla 2) Balakrishnan y Milavetz, 2017). No obstante, esto también podría tener consecuencias, ya que también podrían estar regulando la expresión de genes celulares asociados a la carcinogénesis.

**Tabla 2. Mecanismos epigenéticos regulados por virus.** (Modificado de Balakrishnan y Milavetz, 2017; Placek et al., 2009; Conn et al., 2013; Tsai et al., 2014; Albright y Kalejta, 2016; Moquin et al., 2018; Hensel et al., 2018; Kuss-Duerkop et al., 2018).

Virus	Mecanismo epigenético	Efecto en la expresión de genes	Impacto en la cromatina
<b>Poliomavirus, VPH, EBV, KSHV, Hepatitis B,</b>	Metilación del DNA	Silenciamiento de genes	viral y celular
<b>Poliomavirus, VPH, Hepatitis B, HSV, EBV, KSHV,</b>	Localización de nucleosomas	Accesibilidad a secuencias del DNA (Activación o represión)	Viral y celular
<b>Poliomavirus, SV40, Merkel, Adenovirus, VPH, Hepatitis B, EBV, HSV-1</b>	Modificaciones post-traduccionales de las histonas	Activación o represión)	Celular y viral
<b>HSV-1, HCMV, EBV</b>	Variantes de histonas	Replicación viral y regulación de la expresión de genes virales	Viral
<b>Poliomavirus, SV40, VPH, EBV</b>	miRNA	Regulación de la expresión de genes	Celular y viral
<b>EBV, EBV</b>	Organización tridimensional de la cromatina	Regulación de la expresión de genes virales	Viral

**EBV:** Epstein-Barr, **VHB:** Hepatitis B, **VPH:**Virus del Papiloma Humano, **SV40:** virus del simio 40, **HSV-1:** Herpes simplex, **HCMV:** Citomegalovirus. (Modificado de Balakrishnan y Milavetz, 2017; Placek et al., 2009; Conn et al., 2013; Tsai et al., 2014; Albright y Kalejta, 2016; Moquin et al., 2018; Hensel et al., 2018; Kuss-Duerkop et al., 2018).

## **2.4 E1 del VPH regula la expresión de genes celulares y a modificadores de la cromatina.**

Un estudio realizado por Seedorf y colaboradores (1987) identificó la presencia del RNAm y de una proteína (mediante un anti-suero) de 70 kDa que correspondía a la proteína E1 en la línea celular HeLa (células derivadas de adenocarcinoma positivas para VPH-18). Con el objetivo de determinar el papel de esta proteína en la línea celular de adenocarcinoma Castillo y colaboradores (2014) inhibieron la expresión del RNAm de E1 utilizando RNAs cortos de interferencia (siRNAs) y determinaron la expresión diferencial de genes mediante microarreglos de expresión. El análisis mostró 2669 genes expresados diferencialmente, de los cuales 1718 genes se encontraron sobre-expresados y 951 genes fueron regulados negativamente. Además, se encontró un aumento significativo de cuatro conjuntos de genes implicados en mecanismos de defensa del huésped frente a la infección viral, los cuales incluyen: vías de señalización de los *Toll like* receptor (TLR), vía de señalización de interferón, genes antivirales estimulados por interferón (ISG) y señalización de apoptosis (Castillo et al., 2014), sin embargo, los mecanismos por los cuales E1 de VPH pudiera estar regulando la expresión de dichos genes aún no han sido esclarecidos.

En 1997, Favre y colaboradores determinaron que el genoma del VPH es capaz de organizarse en una estructura similar a la cromatina (Favre *et al.*, 1977). Posteriormente, se demostró que la LCR del VPH presenta una organización en cromatina (Stünkel y Bernard, 1999), por lo que el VPH debe ser capaz de interactuar con proteínas celulares que le permitan modificar la estructura de la cromatina viral y poder llevar a cabo la replicación y transcripción de su genoma. Se ha determinado que los VPH son capaces de alterar la expresión de genes celulares mediante la regulación de algunos mecanismos epigenéticos (tabla 2) (Poreba et al., 2011; Balakrishnan et al., 2017), esto se debe principalmente a la capacidad de las oncoproteínas (E6 y E7) para afectar directamente o indirecto a diferentes componentes epigenéticos (Ferrari et al., 2009). Cambios en el patrón

de metilación y la alteración en la modificación de histonas son los principales mecanismos epigenéticos afectados por el VPH, los cuales, regulan la expresión de genes celulares que pueden contribuir al ciclo replicativo así, como a la carcinogénesis.

Al respecto, un estudio realizado por Swindle y Engler (1998), demostró que la proteína E1 del VPH-11 es capaz de interactuar con la histona H1. A través de Far-Western blot, co-inmunoprecipitación y mediante ensayos de protección con DNasa I determinaron que conforme se aumenta la concentración de E1, existe una mayor degradación del DNA indicando que la proteína E1 del VPH puede interactuar y desplazar a la histona H1 dejando accesibles diversas regiones del DNA viral (Engler y Swindle, 1998), lo que podría favorecer diversos mecanismos como la replicación y transcripción viral. Un estudio reveló que la proteína E1 de los VPH-18 y 11 interactúa con Ini1/hSNF5, una subunidad del complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF. Mediante ensayos de replicación transitoria, se determinó que la replicación del DNA del VPH-18, es estimulada de una manera dependiente de la dosis de Ini1/hSNF5, además se observó que la replicación se inhibe al usar un RNA antisentido para Ini1/hSNF5. Estos resultados indican que la interacción E1 con Ini1/hSNF5 es necesaria para la replicación del DNA del VPH (Lee et al., 1999).

Como se mencionó anteriormente, el VPH puede regular la expresión de genes celulares al interactuar con reguladores transcripcionales como factores de transcripción; sin embargo, también son capaces de regular a componentes epigenéticos los cuales juegan un papel importante en modular la expresión de genes celulares. A la fecha no se ha demostrado si la proteína E1 del VPH puede inducir cambios en la expresión de genes celulares a través de la modulación de mecanismos epigenéticos específicamente a modificadores de la cromatina.

### **3. Justificación**

Se ha determinado que el silenciamiento del gen E1 del VPH-18 en un contexto celular de cáncer afecta la expresión de genes celulares, sin embargo, no se ha determinado si la sola presencia de la proteína E1 de los VPH de alto o bajo riesgo son capaces de inducir cambios en la expresión de genes celulares en un contexto celular no tumorigénico. Además, se sabe que la proteína E1 es capaz de interactuar con proteínas modificadoras de la cromatina, que a su vez están implicadas en la regulación de expresión de genes.

Por lo que resulta de interés evaluar el efecto de la proteína E1 del VPH de alto y bajo riesgo sobre la expresión de genes celulares e identificar genes que pudieran repercutir en el ciclo replicativo y/o en la carcinogénesis inducida por este virus, así como los posibles mecanismos involucrados en dicha regulación.

### **4. Hipótesis**

Las proteínas E1 de los VPH de alto y bajo riesgo inducen cambios en la expresión de genes celulares mediado por mecanismos epigenéticos.

## **5. Objetivos**

### **5.1. General**

Determinar la participación de la proteína E1 de los VPH de alto riesgo (tipo 16,18) y bajo riesgo (tipo 11) en la expresión de genes celulares y su implicación con mecanismos epigenéticos.

### **5.2. Específicos**

En la línea celular inmortalizada negativa a VPH (HaCaT) que expresen de manera transitoria la proteína E1 de los VPH-16,18 y 11:

1. Determinar el efecto de E1 de los diferentes tipos virales en la expresión de genes celulares.
2. Seleccionar grupos de genes expresados diferencialmente para su validación.
3. Evaluar el efecto de E1 del VPH sobre proteínas modificadoras de la cromatina: Desacetilasas de histonas y acetiltransferasas de histonas.
4. Determinar la unión de E1 a los promotores de los genes expresados diferencialmente.

## 6. Material y Métodos

### 6.1 Línea celular

Se empleó la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT, negativa a la infección por 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%.

### 6.2 Plásmidos

Se usaron tres plásmidos para expresar la proteína E1 de los VPH-16, 18 y 11. El plásmido pcDNA-HPV18 E1 expresa la proteína E1 del VPH18 bajo el control del promotor CMV y posee el tag HA en su extremo amino terminal (Amador Molina et al., 2019). El plásmido pMHPV16 E1HA que expresa la proteína E1 de VPH16 y el plásmido pMHPV11 E1HA que expresa la proteína E1 de VPH11 contienen la bandera de HA, los cuales fueron amablemente donados por el Dr. Mart Ustav, Institute of Molecular and Cell Biology, Institute of Technology, University of Tartu, Estonia. El plásmido pCA se usó como plásmido control al carecer de secuencias codificantes.

### 6.3 Transformación bacteriana

#### Generación de bacterias competentes

Para recuperar los plásmidos, estos fueron transformados en bacterias competentes. La cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* se hizo competente mediante el método de CaCl<sub>2</sub>. Brevemente, 50mL de medio Luria Berth (LB) fueron inoculados con las bacterias hasta alcanzar una DO<sub>600</sub>=0.4, estas se incubaron en hielo durante 15 min, posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm/4°C/10 min. El botón celular se resuspendió 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 resuspender el botón celular en 3.3mL del mismo buffer.

### Transformación

Para este fin se empleó el método de choque térmico. En tubos colocados en hielo se agregaron por separado 100ng de cada plásmido. A cada tubo se le añadieron 200µL de las bacterias competentes y se incubaron por 30 min en hielo. Tras la incubación, se generó un choque térmico de hielo a 42°C por 2 min y nuevamente en hielo por 5 min. Después, se añadieron 800µL de LB estéril y se incubó 1h a 37°C en agitación constante a 300rpm. Al finalizar el tiempo de incubación, alícuotas de las bacterias se sembraron por separado mediante estría masiva en placas LB suplementadas con 100 µg/mL de ampicilina como medio de selección y se incubaron a 37°C toda la noche para la obtención de colonias transformantes.

## 6.4 Aislamiento y purificación de DNA de plásmidos de expresión

Los diferentes plásmidos fueron extraídos utilizando el kit PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) basado en una lisis alcalina modificada, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, una colonia de las placas de selección positiva de transformación fue inoculada por estría aislada en agar LB con ampicilina y se incubó toda la noche a 37°C, de este cultivo una colonia aislada se seleccionó e inoculó en 5mL de LB con ampicilina en agitación constante 6-8h. El cultivo inicial se diluyó en 300mL de LB estéril incubándolo a 37° en agitación constante toda la noche. Al día siguiente, las bacterias fueron centrifugadas a 6000 x g durante 10 min a 4°C, el botón celular se resuspendió en 10mL del buffer de resuspensión R3 con RNasa A, posteriormente se añadieron 10mL del buffer de lisis L7, mezclando cuidadosamente por inversión y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, se añadieron 10mL de buffer de precipitación (N3) mezclando por inversión. El lisado celular resultante se centrifugó a 12500 x g durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se vertió en una columna equilibrada con buffer EQ1, permitiendo que la solución se drenara por gravedad. Se añadieron 60mL de

buffer de lavado W8 a la columna, cuando todo el fluido se descartó, se añadieron a la columna 15 mL del buffer de elusión E4, permitiendo un flujo por gravedad en un tubo estéril. La solución eluida contiene el DNA purificado que fue precipitado con 10.5mL de isopropanol, posteriormente se centrifugó a 12500 x g por 5 min a 4°C descartando el sobrenadante. El DNA se lavó una vez con 5mL de etanol al 70%, descartando el sobrenadante. El botón de DNA purificado se resuspendió en buffer TE. Se determinó la concentración e índice de pureza y se almacenó hasta su uso a -20°C. 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.

## 6.5 Transfección

Para transferir el material genético a las células en cultivo se empleó el método químico de dendrímeros activados en condiciones estériles utilizando el reactivo Polyfectamine (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron 380,000 células HaCaT en placas de 60mm, se incubaron durante 24 horas para permitir la adherencia y una confluencia del 70 al 80%. Posteriormente, se aspiró el medio y se añadieron 2mL de medio de cultivo nuevo, tras lo cual se transfectaron los plásmidos correspondientes: 4.5 µg de plásmido pCA como control de transfección y 4.5 µg de los plásmidos pcDNA-HPV18 E1, pMHPV16 E1HA y pMHPV11 E1HA se incubaron durante 5 min con medio DMEM F-12 sin suero para posteriormente adicionar 10µl del reactivo Polyfectamine (Qiagen, Hilden Alemania). La mezcla se incubó por 25 min a temperatura ambiente y se agregaron 600 µl de medio DMEM F-12 con suero fetal bovino al 10%. Posteriormente, la mezcla final se agregó sobre la monocapa celular y se incubaron durante 24 h (condiciones temperatura, CO<sub>2</sub>). Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo fue retirado y las células transfectadas se usaron para realizar los diferentes ensayos, como RNA-seq, qPCR, Western Blot (WB),

Fraccionamiento celular y Co-inmunoprecipitación (Co-IP).

## 6.6 Obtención de RNA y síntesis de cDNA

Se utilizaron células HaCaT, las cuales fueron sembradas en placas de 60mm por triplicado, posteriormente se transfectaron con 4.5  $\mu$ g de cada uno de los tipos de plásmidos de E1 del VPH y el pCA. Después de 24 hrs postransfección se obtuvo el RNA total de cada condición utilizando el RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El RNA obtenido se resuspendió 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, Waltham, MA USA). Se utilizaron 400 ng de RNA para la reverso-transcripción (RT) empleando Oligo dT utilizando el Kit GeneAmp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La expresión de E1 de los diferentes tipos de VPH fue verificado por RT-PCR utilizando *primers* específicos enlistados en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Lista de primers usados.

Gene	Forward 5'	Reverse 3'	Fragmento (bp)
E1 VPH-16	GGTTACAACCATTAGCAGAT	ACCAATGGTCTATGCTTTAC	200
E1 VPH-18	CTGCTCACAACCTAACATTCA	CCGTTCTTATCAAATGGGAA	170
E1 VPH-11	GTGTACAGGATGGTTTATGG	TGTCATCAATAAAGTCCACC	150
IFN $\beta$ 1	GCCAAGGAGTACAGTCACTG	TGAAGCAATTGTCCAGTCCC	100
IFN $\lambda$ 1	CGCCTTGGAAGAGTCACTCA	GAAGCCTCAGGTCCCAATTC	100
18s	AACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	140
CCL5 o RANTES	GCTGTCATCCTCATTGCTACTG	TGGTGTAGAAATACTCCTTGATGT	150
RSAD2 o Viperin	CACAAAGAAGTGCCTGCTTGGT	AAGCGCATATATTTTCATCCAGAATAAG	150
IFIT2	ACTGCAACCATGAGTGAGAAG	GCCTCGTTTTGCCCTTTGAG	140

## 6.7. RNA-Seq

### *Preparación de bibliotecas y secuenciación*

El RNA total fue obtenido de tres transfecciones independientes por condición. La cuantificación del RNA se realizó a través de espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific Waltham, MA USA). La integridad del RNA, se evaluó mediante el rango de integridad (RIN), el cual se determinó a través de electroforesis capilar, usando el equipo *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies In., Santa Clara, CA USA); todas las muestras mostraron un valor de RIN >9.0. Las bibliotecas a emplearse en el RNA-seq de todas las réplicas (n=12) fueron construidas utilizando el kit *TruSeq Stranded Preparation kit* (Illumina, San Diego, CA) con una longitud de lectura de 76pb. La secuenciación de las muestras se realizó con el equipo Illumina NextSeq 500, generando un mínimo de 40 millones de lecturas por muestra. Las lecturas de pares de bases fueron asignadas de acuerdo a la puntuación de calidad y alineadas de acuerdo con la referencia genómica RefSeq (hg19) utilizando Bowtie, la cuantificación del número de archivos se generó con el Htseq.count. Finalmente, la expresión diferencial de genes se realizó empleando el software DESeq2, en donde los valores de  $p < 0.05$  y  $p$  ajustada ( $p$ -Adj)  $< 0.05$  fueron consideradas como estadísticamente significativas (BIOCONDUCTOR: Open Source Software For Bioinformatics)

### *Análisis Bioinformático*

El flujo del análisis bioinformático se llevó a cabo utilizando las herramientas otorgadas por la plataforma Illumina's Base Space. El análisis de los procesos biológicos (categoría GO) se obtuvo utilizando la expresión diferencial de genes y su visualización a través de ClueGo (Plug-in de Cytoscape). El análisis de integración (IPA) se realizó para determinar las vías de señalización canónicas y las vías funcionales afectadas por la expresión diferencial de genes. La prueba de exactitud de Fisher fue realizada de forma automática por el software

## 6.8. 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. 400 µg de RNA fue reverso-transcrito de cada condición, con *primers Oligo dT* utilizando el kit *GeneAmp RNA PCR Core Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se evaluó la expresión de los genes FOSB, IFIT2, CCL5, RSAD2, IFNβ1 y IFNλ1 mediante qPCR utilizando *primers* específicos para cada gen, los cuales se enlistan en la tabla 3. Como control de expresión constitutiva se utilizó el gen 18S. Los resultados fueron presentados como una cuantificación relativa utilizando el método de  $\Delta\Delta Ct$  (Schmittgen y Livak, 2008).

## 6.9. Western blot (WB)

Para detectar los niveles de proteína E1 del VPH, así como los diversos blancos celulares analizados en este trabajo, se realizaron ensayos de western blot utilizando proteínas totales obtenidas de las células HaCaT 24 h postransfección.

### *Extracción de proteínas*

De las células HaCaT transfectadas se obtuvieron extractos proteicos totales a las 24 h post-transfección, para lo cual se retiró el medio de cultivo y se lavaron con 2 mL de PBS estéril. Posteriormente las cajas con los cultivos se colocaron sobre hielo y se añadieron 100µL de buffer de carga y las células fueron recolectadas usando un gendarme. El raspado se pasó de 10-15 veces por una jeringa de 3 mL posteriormente de 10-15 veces con una jeringa de 1 mL, el lisado resultante se conservó a -80°C.

### *Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)*

Se realizó una electroforesis en medio desnaturalizante con el fin de separar, de

acuerdo al peso molecular, las proteínas presentes en las muestras. A cada muestra se le adicionó el volumen necesario de buffer de carga con una relación 1:1 (v:v), a continuación se colocaron en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos. Las muestras en los geles de poliacrilamida al 12%. La electroforesis se llevó a cabo usando buffer de corrida 1X inicialmente a 80 V hasta que las muestras entren al parte concentrador del gel y posteriormente a 100 V hasta que el frente de migración salió del gel.

### *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 frío a 100V durante 1h 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.

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

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

### *Anticuerpos*

Los anticuerpos primarios empleados fueron: anti-HA (1:1000) (Cell Signaling), (1:1000) (Invitrogen), anti-HDAC3 (1:1000, Active Motif), Anti-H3 (1:150,000, Abcam), Anti-NF- $\kappa$ B (1:500, Santa Cruz Biotechnologies) y anti -GAPDH (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA) este último empleado como control de carga. Los anticuerpos secundarios empleados en este trabajo fueron anti-conejo y anti-ratón

(1:10,000, Santa Cruz Biotechnologies, USA), acoplados a peroxidasa de rábano (HRP), los cuales se diluyeron en TBS-T 1X.

#### *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).

### **6.10 Fraccionamiento celular**

Para el ensayo de fraccionamiento celular las células HaCaT se sembraron en una placa de 100mm y se transfectaron con 8.5 µg del plásmido correspondiente. Después de 24 h de la transfección, las células se resuspendieron con 300µl de buffer de lisis (Tris 10 mM pH 6.5, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 27 mM, Triton X-100 al 1%, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, sacarosa 25 mM y cóctel de inhibidores de proteasas) y se incubaron durante 10 min a 4°C dando golpes cada 3 minutos. Pasado el tiempo las muestras se centrifugaron a 3200g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante correspondía a la fracción citoplasmática, la cual se depositó en un tubo eppendor. Al sedimento se le realizó dos lavados con buffer Fosfato-Salino (PBS) 1X para eliminar las trazas de citoplasma. El botón de células fue resuspendido con 300 µL de buffer de extracción (HEPES 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM pH 8.0, EGTA 0.1 mM pH 8.0 y cóctel de inhibidores de proteasas) y se centrifugaron a 10,000g por 10 minutos a 4°C. Finalmente, la pastilla obtenida se resuspendió en el buffer RIPA (Tris 100 mM pH 8.0, NaCl<sub>2</sub> 50mM, Nonidet P-40 al 0.5% y cóctel de inhibidores de proteasas) para lisar los núcleos. Las muestras se analizaron mediante inmunoblot, utilizando los anticuerpos anti-HA (cell signalling), Anti-H3 (Abcam), anti-HDAC3 (Active Motif), anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnologies).

### **6.11 Ensayo de Co-inmunoprecipitación (CoIP)**

Para determinar la interacción entre la proteína E1 y HDAC3, células HaCaT se sembraron en una placa de 100mm y se transfeció con 8.5 µg del plásmido correspondiente. Después de 24 h de la Transfección. Las placas de p100 con las células se pusieron en hielo y se les agrego 500 µl de buffer de RIPA (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 5mM EDTA pH 8.0, 1% Tritón X – 100, 0.5% Deoxicolato de Sodio y 0.05% SDS) durante 10 minutos. Posteriormente se rasparon las células con un gendarme y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Los extractos se lisaron pasando por jeringas de 3ml y 1ml 10 veces y se dejaron incubando en hielo durante 30 minutos. Pasado el tiempo los tubos se centrifugaron a velocidad máxima (13,000 g) por 15 minutos a 4°C y se recupera el sobrenadante colocándolo en un tubo eppendorf de 1.5 mL. El sobrenadante se dividió en el número de muestras a inmunoprecipitar, además, se toma una parte para el Input el cual se almacena a -80°C. Se adiciono el anticuerpo primario contra la proteína que se desea inmunoprecipitar (Anti-HA Santa Cruz Biotechnologies) y con un control de isotipo Anti-IgG (Santa Cruz Biotechnologies, USA) se incubaron a 4°C durante toda la noche. Al otro día se le agregan 20uL de perlas de Agarosa A/G (Upstate Biotechnology, Inc, Fisher Scientific) durante 3 horas o toda la noche. Posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 2,500 g, con cuidado se tomó el sobrenadante sin tocar las perlas. Las perlas en donde se encuentran los complejos inmunes, se lavaron 3 veces con el buffer de lisis y entre cada lavado centrifugar a 2000 g durante 2 minutos. Se retiro completamente el sobrenadante sin tomar las perlas. Finalmente, se adicionaron 20 µL de buffer de carga y se analizó la interacción mediante Wb utilizando los anticuerpos anti-HA (Santa Cruz Biotechnologies) y anti-HDAC3 (Antive-Motif).

### **6.12. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)**

El ensayo de ChIP se realizó para evaluar la capacidad de la proteína E1 de unirse a la región promotora de algunos de los genes expresados

diferencialmente, para lo cual las células HaCaT se sembraron en placas de 100 mm y se transfectaron con 8.5 µg del plásmido pMHPV16 E1HA. 24 h post-transfección, las células se fijaron con formaldehído al 1% durante 10 minutos y posteriormente se adiciono glicina a una concentración final de 0.125 M y se incubo por 5 minutos. Posteriormente se lavó con PBS 1X más inhibidores de proteasas y despegaron de la caja mediante un gendarmen. Se realizo la lisis celular utilizando el buffer de lisis celular (20 mM Tris-HCl, pH 8, 85 mM de KCl, 0,5% Nonidet P-40) incubando durante 10 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugo durante 5 minutos a 1000 rpm a 4°C. Se descarto el sobrenadante y el botón obtenido se resuspendió utilizando buffer de lisis nuclear (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 1.0% SDS), se incubó durante 10 minutos a 4°C, pasado el tiempo los extractos nucleares fueron sonicados utilizando un Bioruptor Pico (Diagenode) utilizando los siguientes parametros: 7 ciclos de 30 segundos *On* y 30 segundos *Off* (previamente estandarizado), obteniendo fragmentos de DNA de un tamaño desde 200 hasta 800 pb. La cromatina sonicada se diluyó 1:10 utilizando el buffer de dilución (Triton X-100 al 1%, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM pH 8, Tris HCl 20 mM pH 8 y cóctel de inhibidores de proteasas). Después, todas las muestras se pre-clarearon con 50 µl de perlas de proteína G/A DNA de esperma de salmón (Millipore) durante 3 horas a 4°C y posteriormente se centrifugaron a 1000 rpm durante 2 minutos. Los sobrenadantes se incubaron con los anticuerpos anti-HA (Cell Signaling), anti-IgG (Santa Cruz Biotechnologies) y anti-H3 (Abcam) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se agregaron 50 µl de perlas de proteína A/G DNA de esperma de salmón (Millipore) y se incubaron durante 3 horas a 4°C. Las perlas se lavaron con los siguientes buffer durante 5 minutos: 1) Low salt wash buffer: 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2) High salt wash buffer: 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH8.0, 500mM, 3) NaCl LiCl wash buffer: 0.25 M LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% Na-deoxycholate, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 TE buffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA y finalmente se eluyeron los complejos utilizando el buffer de elución (1% SDS, 2mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 8.0). al sobrenadante se trataron con NaCl 200 mM durante 5 horas a 65°C, con 200 µg

RNAasa y Proteinasa K a una concentración de 160  $\mu$ g. La purificación de DNA se obtuvo mediante la técnica fenol/cloroformo. Finalmente se realizaron las PCRs para evaluar la interacción de E1 del VPH-16 con 5 regiones del promotor de IFN- $\beta$ .

### **6.13 Análisis estadístico**

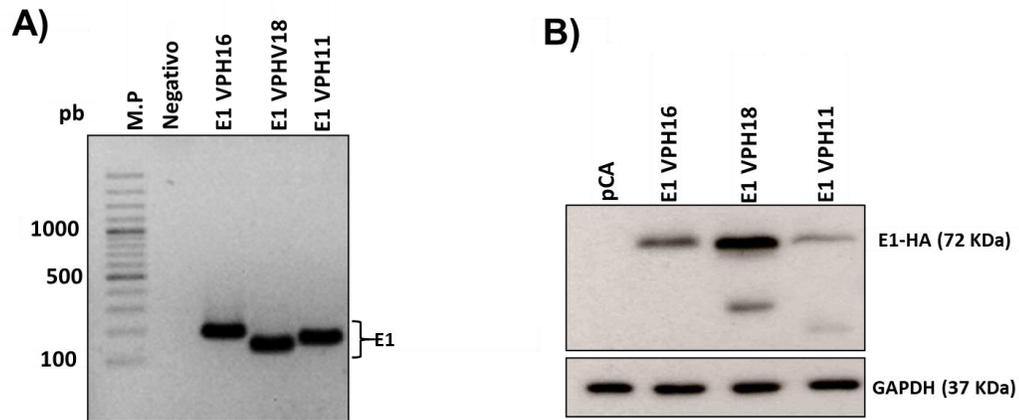
Los datos que muestran los efectos de E1 VPH-16, 18 y 11 fueron comparados contra el control pCA en los diferentes ensayos y son presentados como promedios  $\pm$  SD. El valor de p se calculó mediante la prueba *t* de Student o bien con la prueba ANOVA con el análisis post hoc de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas con un valor de  $p \leq 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

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

Para evaluar el efecto de la proteína E1 de los VPH-16,18 y 11 en la línea celular HaCaT (queratinocitos inmortalizados negativo a la presencia del VPH), 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 RNA mensajero mediante RT-PCR. La figura 5A muestra un gel de agarosa al 1.5% 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, demostrando que las células expresan E1 a nivel de mRNA.

Posteriormente se determinaron los niveles de la proteína E1 en las células HaCaT a 24 post-transfección (previamente se evaluó que a este tiempo es el óptimo para la expresión de E1). En la figura 5B se muestra el resultado de WB en donde se observa una banda de aproximadamente 72 kDa correspondiente con el peso molecular de E1, esta banda se no se encuentra en el control de transfección pCA. Además, se detectaron otras bandas de menor peso molecular, lo cual puede deberse a que E1 es reconocido y escindido por caspasas, generando fragmentos más pequeños de E1 como ya ha sido demostrado en otros estudios (Moody *et al.*, 2007).



**Fig. 5. Expresión y niveles de E1 del VPH-16,18 y 11.** Células HaCat transfectadas con E1 del VPH-16,18 y 11. A) Gel de agarosa al 1.5% que muestra los productos de PCR con un tamaño de aproximadamente 200 pb correspondientes a E1 del VPH. B) Ensayo de Western blot que muestra la expresión de E1 del VPH 24 h post-transfección en el que se observa una banda de aproximadamente 72 kDa que corresponde al peso de E1 la cual se no observa en el control (pCA). GAPDH fue empleado como control de carga. M.P: marcador de peso molecular.

## 7.2 E1 de los VPH de alto y bajo riesgo regulan la expresión de genes celulares

Una vez que se estableció el modelo de estudio, para demostrar el efecto de E1 sobre la expresión de genes celulares se realizó un análisis de RNA-seq. Al RNA obtenido de células HaCat transfectadas con los plásmidos de E1 del VPH-16, 18 y 11 y el vector vacío pCA, se le determinó el rango de integridad (RIN) empleando el equipo *Bioanalyzer* (Agilent 2100), obteniendo un RIN superior a 9 en todas las muestras. Se seleccionaron los genes que tuvieron un valor de  $p \leq 0.05$  y con base en los valores de cambio del  $\log_2$ -fold change, se encontró que E1 VPH-16 reguló un total de 302 genes de los cuales 199 estuvieron sobre-expresados y 103 sub-expresados; mientras que E1 del VPH-18 alteró la expresión de 86 genes, de los cuales 45 fueron sobre-expresados y 41 sub-expresados; finalmente E1 del VPH-11 reguló 72 genes de los cuales 34 fueron sobre-expresados y 38 sub-expresados (<https://doi.org/10.1038/s41598-019-49886-4>).

Los genes diferencialmente expresados fueron analizados mediante el *software* ClueGO-Cytoscape para determinar los procesos celulares que se afectan en presencia de la proteína E1. Se encontró que E1 afecta procesos celulares involucrados en respuesta inmune, principalmente de tipo antiviral (Tabla 4).

**Tabla 4.** Procesos celulares afectados por la presencia de la proteína E1 de VPH de alto y bajo riesgo.

E1 VPH-16	E1 VPH-18	E1 VPH-11
Regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	Endothelial cell chemotaxis	Regulation of MHC class I biosynthetic process
Formation of primary germ layer	Negative regulation of viral genome replication	Melanosome localization
Cellular response to vascular endothelial growth factor stimulus	Negative regulation of viral genome transcription	MDA-5 signaling pathway
Negative regulation of viral genome replication	Positive regulation of epidermal cell differentiation	Regulation of natural killer cell chemotaxis
Defense response to virus	Regulation of toll-like receptor 9 signaling pathway	Viral genome replication
Cellular response to interferon-gamma	Monocyte differentiation	Type I interferon signaling pathway
Cytokine-mediated signaling pathway	MDA-5 signaling pathway	Pharyngeal system development
Regulation of bone mineralization	Cellular response to corticotropin-releasing hormone stimulus	Bile acid and bile salt transport
	Response to corticosterone	

Para analizar aún más el efecto de E1 sobre la expresión de genes celulares, se realizó análisis más restringido, considerando solo aquellos genes que fueron significativos en función del valor  $p$  ajustado ( $p$ -adj). Los resultados indicaron que

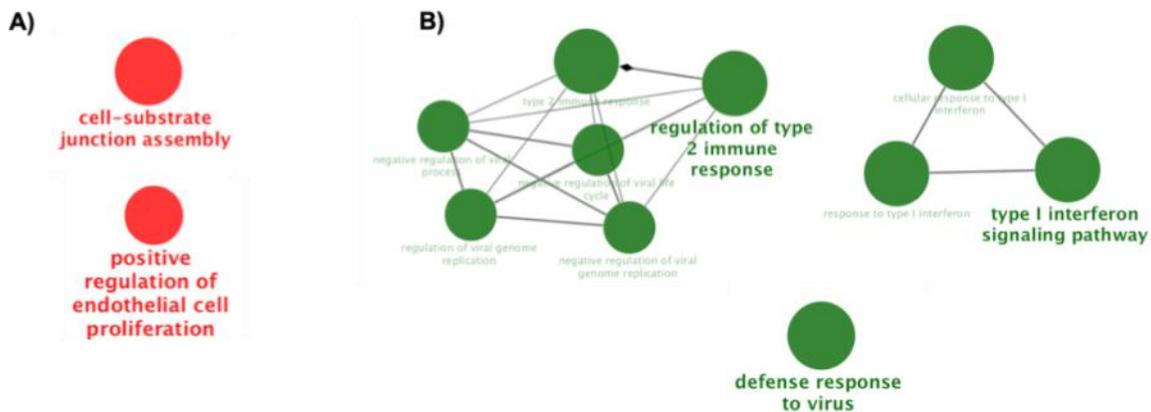
E1 del VPH-16 modula 36 genes; mientras que 15 y 14 genes fueron regulados por E1 VPH-18 y VPH-11, respectivamente (Tabla 5). Con base a los valores de cambio del  $\log_2$  *fold-change*, se encontró que E1 del VPH-16 sobre regula 22 genes mientras que 14 genes fueron regulados a la baja, por su parte E1 del VPH-18 sobre reguló 9 genes y reguló a la baja 6 genes y E1 del VPH11 regula al alza 4 genes y 10 genes a la baja.

**Tabla 5. Genes expresados diferencialmente en presencia de E1 del VPH-16, 18 y 11.**

Proteína	Total de genes p-adj	Genes
<b>E1 VPH-16</b>	35	<i>FST, FOSB, DUSP6, MMP1, MACF1, MYH16, NR4A1, CCNA1, EREG, LIF, LAMA3, ANGPTL4, LAMC2, FAM83A, VEGFA, TFPI2, TINAGL1, AHNAK, IER3, FLNB, GABRB3, ABCB1, IFNB1, TP73, TRIM22, IFI44L, CCL5, HERC5, GBP4, IFIT3, SAMD9L, TNFSF10, XAF1, IFIT2, IFNL1, RSAD2</i>
<b>E1 VPH-18</b>	15	<i>FOSB, NR4A1, IL11, DUSP6, FOS, CCNA1, CD55, CDKN1A, S100A2, IFNB1, CCL5, C20orf24, IFNL1, RSAD2, HBB</i>
<b>E1 VPH-11</b>	14	<i>CYP2C8, NDUFC2, SRP9, COPS2, IFNB1, PARP10, HES1, TNFAIP2, IFIT2, DHX58, USP18, RSAD2, CCL5, IFNL1</i>

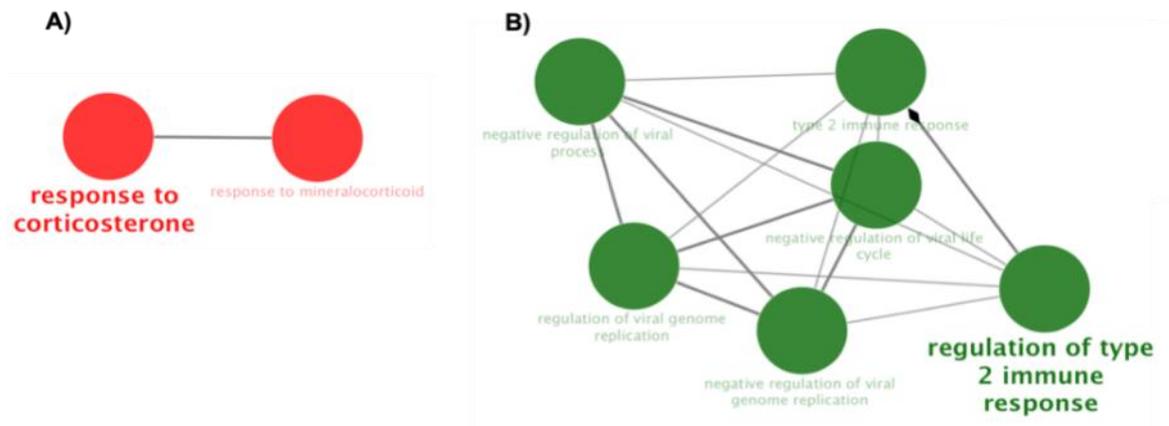
Valor de p ajustada  $\leq 0.05$ .

Para analizar los procesos celulares en los que están involucrados los genes afectados por E1, se realizó un análisis de ontología génica mediante ClueGO-Cytoscape. Los resultados revelaron que los genes regulados por E1 del VPH-16 se asociaron a procesos involucrados en respuesta inmune antiviral (Figura 6A), unión célula-célula y la proliferación celular (Figura 6B).



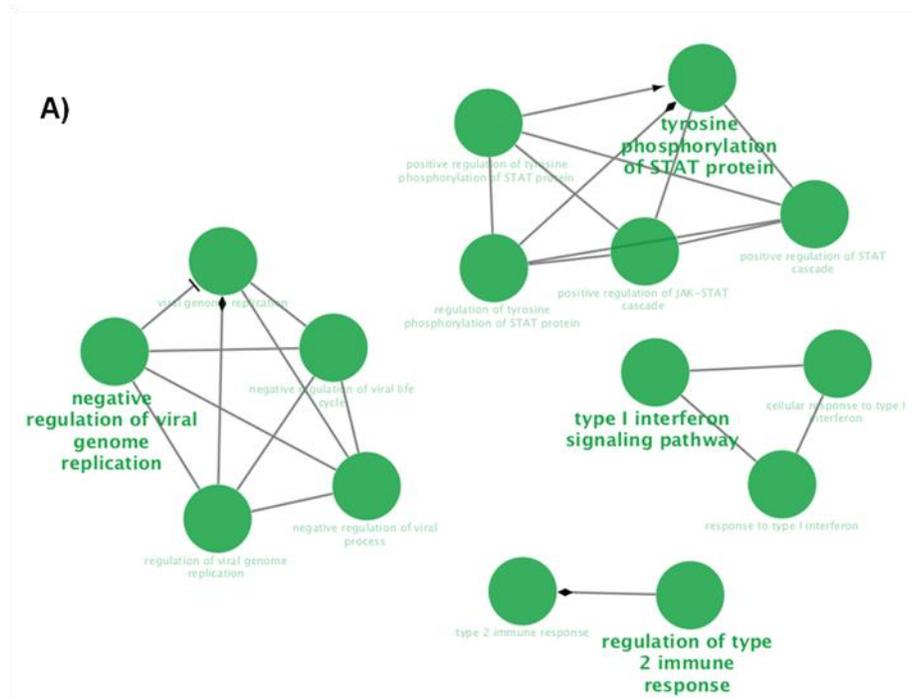
**Figura 6. La proteína E1 del VPH-16 altera redes celulares involucradas en la respuesta inmune, el ensamblaje de la unión sustrato celular y la proliferación celular.** Análisis ClueGO muestra la red de procesos celulares de genes desregulados en presencia de E1 del VPH-16 en A) los procesos celulares asociados a los genes sobre-expresados (color rojo) y en B) genes sub-expresados (color verde) en presencia de la proteína E1 del VPH-16. Solo se muestra la etiqueta del término más significativo por grupo. El tamaño de los nodos refleja el grado de enriquecimiento de los términos. La red se diseñó automáticamente utilizando el algoritmo de diseño orgánico en Cytoscape. Se analizaron los genes que muestran cambios con un valor de padj con una significancia de  $<0.05$ .

El análisis de ontología génica reveló que los genes sobre regulados por el E1 VPH-18 están involucrados procesos asociados a respuesta a los mineralocorticoides y la corticosterona (Figura 7A), mientras que los genes regulados negativamente están relacionados con procesos asociados con la regulación de la respuesta inmune (Figura 7B).



**Figura 7. La proteína E1 del VPH-18 altera redes celulares involucradas en la respuesta inmune y la respuesta a corticosterona.** Análisis ClueGO de genes significativamente regulados en células que expresan E1 del VPH-18. A) Red de procesos celulares asociados a genes sobre-expresados (color rojo) y B) procesos celulares asociados a genes sub-expresados (color verde) en presencia de la proteína E1 del VPH-18. Solo se muestra la etiqueta del término más significativo por grupo. El tamaño de los nodos refleja el grado de enriquecimiento de los términos. La red se diseñó automáticamente utilizando el algoritmo de diseño orgánico en Cytoscape. Solo los grupos funcionales representados por su término más significativo se visualizaron en la red. Se analizaron los genes que muestran un valor  $P_{adj} < 0.05$ .

Finalmente, al analizar genes desregulados por la proteína E1 del VPH-11, no se encontraron procesos celulares afectados por los genes sobre-expresados, probablemente debido a la pequeña cantidad de estos (cuatro genes), en comparación con los regulados por los VPH de alto riesgo. En contraste, el programa ClueGO demostró que los genes sub-expresados por E1 del VPH-11 están involucrados en procesos como la regulación negativa de la replicación del genoma viral, la fosforilación de la proteína STAT, la vía de señalización de interferón tipo I y la regulación de la respuesta inmune tipo 2 (figura 8).

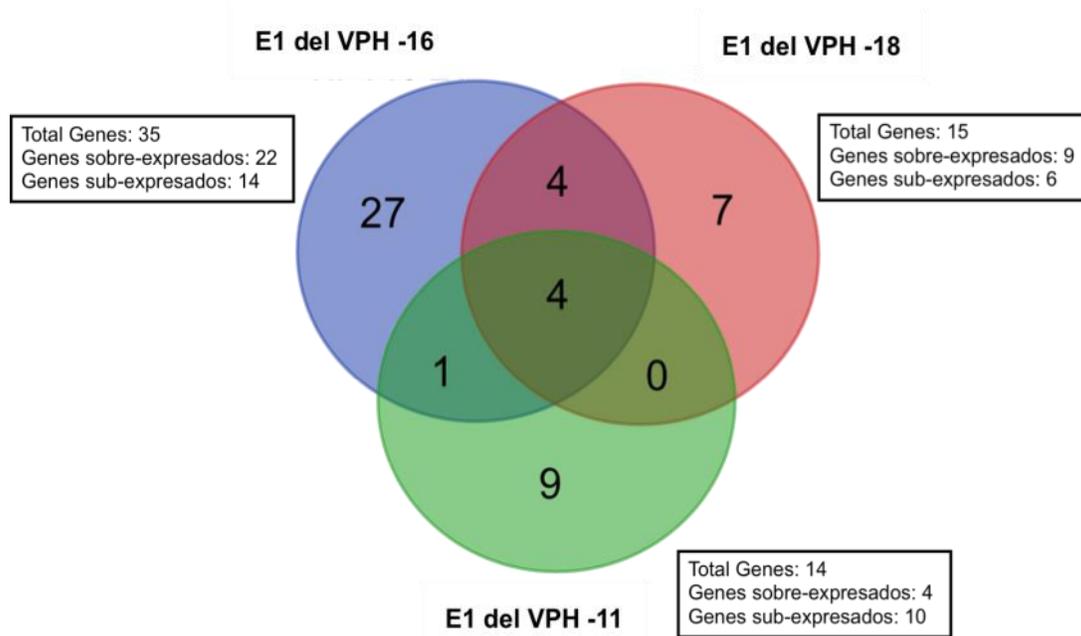


**Figura 8. La proteína E1 del VPH-11 altera redes celulares involucradas en la respuesta inmune.** Análisis de ClueGO de genes significativamente regulados en células que expresan E1 del VPH-11. Redes celulares asociados a genes regulados negativamente en presencia de la proteína E1 del VPH-11. Solo se muestra la etiqueta del término más significativo por grupo. El tamaño de los nodos refleja el grado de enriquecimiento de los términos. La red se diseñó automáticamente utilizando el algoritmo de diseño orgánico en Cytoscape. Solo los grupos funcionales representados por su término más significativo se visualizaron en la red. Se analizaron los genes que muestran cambios de padj con una significancia de  $<0.05$ .

### 7.3. Las proteínas E1 de los VPH de bajo y alto riesgo regulan genes en común.

Una vez que se determinó que E1 de los diferentes tipos virales regula la expresión de genes celulares, lo siguiente fue realizar un análisis para explorar si las proteínas E1 de los distintos tipos virales comparten entre sí la regulación de algunos genes. En la figura 9 se muestra un diagrama de Venn en donde se observa que E1 de los VPH-16 y 18 desregularon cuatro genes en común: FOSB, DUSP6, NR4A y CCA1, mientras que los tipos 16 y 11 comparten solo un gen (IFIT2). E1 de los VPH-18 y 11 no comparten genes. Interesantemente, E1 de los

tres tipos virales regularon cuatro genes en común, los cuales fueron IFNB1, IFNL1, CCL5 o RANTES y RSAD2 o Viperin. Estos genes están involucrados en respuesta inmune innata, específicamente respuesta inmune antiviral. Esto sugiere que las proteínas E1 del VPH podrían tener impacto en la expresión de genes asociados con la respuesta inmune, efecto que se comparte entre los VPH de alto y bajo riesgo.

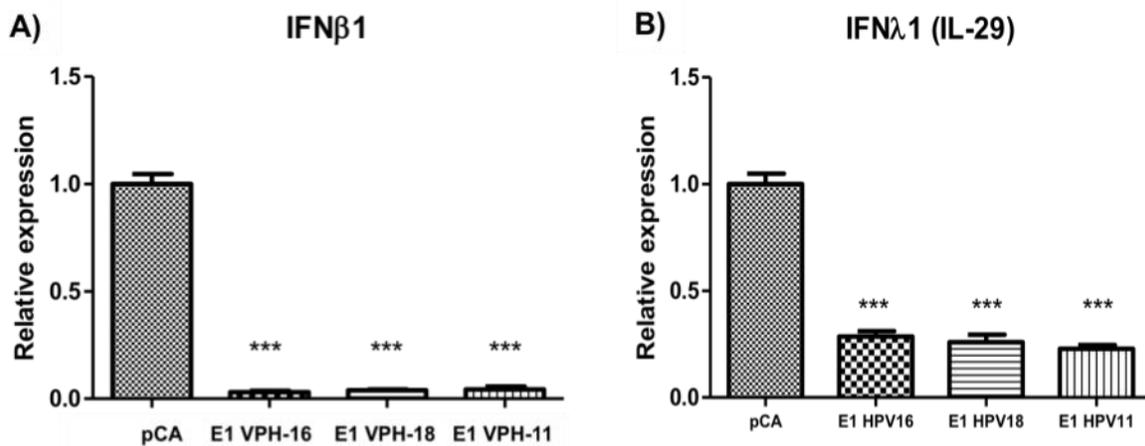


**Figura 9. Las proteínas E1 del VPH16, 18 y 11 alteran genes en común asociadas con la respuesta inmune antiviral.** Diagrama de Venn muestra el número de genes en común expresados diferencialmente por las proteínas E1 del VPH.

#### 7.4 Las proteínas E1 del VPH-16, 18 y 11 disminuyen la expresión de IFN $\beta$ 1 e IFN $\lambda$ 1.

Dentro de los genes que fueron desregulados por las proteínas E1 de los VPH de alto y bajo riesgo, se encontraron cuatro genes sub expresados involucrados en la respuesta inmune innata antiviral (CCL5, RSAD2, IFN $\beta$ 1 e IFN $\lambda$ 1). Se conoce que IFN $\beta$ 1 e IFN $\lambda$ 1 promueven la expresión de genes de tipo ISG, los cuales ayudan a controlar procesos infecciosos permitiendo una respuesta inmune antiviral

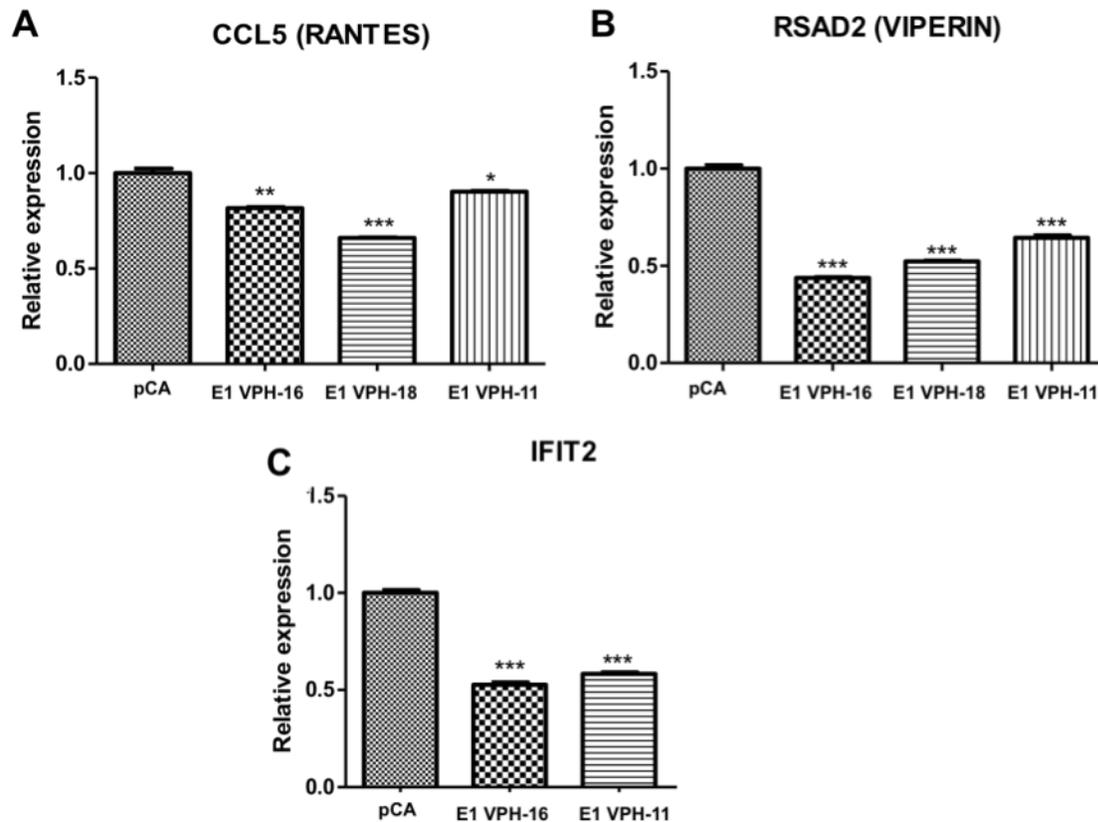
eficiente (Schoggins et al., 2011). Debido a su importante papel en la respuesta inmune innata antiviral (Levy et al., 2011), tanto IFN $\beta$ 1 como IFN $\lambda$ 1 fueron seleccionados para determinar el papel de E1 sobre genes que podrían definir la respuesta ante una infección por VPH. La expresión de IFN $\beta$ 1 e IFN $\lambda$ 1 se validó mediante ensayos de qPCR en células HaCaT que expresan la proteína E1 de los distintos tipos virales. Los resultados demostraron una disminución en la expresión del RNAm de IFN $\beta$ 1 (figura 10A) e IFN $\lambda$ 1 (figura 10B) en presencia de E1 de los tres tipos virales, en comparación con las células que fueron transfectadas con el vector vacío pCA ( $p < 0.001$ ).



**Figura 10. La proteína E1 de los VPH-16, 18 y 11 regulan negativamente la expresión de IFN $\beta$ 1 e IFN $\lambda$ 1.** Niveles relativos del RNAm de los genes A) IFN $\beta$ 1 y B) IFN $\lambda$ 1 muestran una disminución en presencia de la proteína VPH-16, 18 y 11. Los valores se expresan como la diferencia del  $\Delta\Delta Ct$  en comparación con las células transfectadas con control de pCA. La expresión del gen constitutivo 18S se utilizó para normalizar. Las barras representan la media  $\pm$  DE. \*\*\* $p < 0.0001$  vs control (pCA). Se realizaron tres replicas técnicas y biológicas.

Debido a que en el análisis de RNA-seq los tres tipos de VPH afectaron la expresión de algunos genes estimulados por interferón (ISG) se decidió evaluar los niveles del RNAm mediante qPCR de CCL5 y RSAD2 (viperin) encontrando una disminución significativa en presencia de E1 de los VPH de alto y bajo riesgo en comparación con el pCA ( $p < 0.001$ ) (Figura 8). Además, los niveles de RNAm de IFIT2 (el cual también es ISG) único gen compartido entre los tipos VPH-16 y VPH-11, disminuyó significativamente ( $p < 0.001$ ) en presencia de ambas proteínas

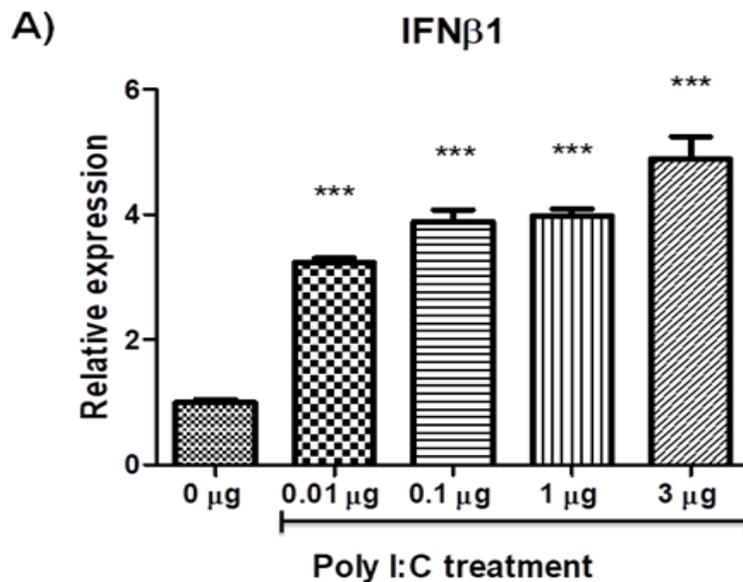
(Figura 11). Estos resultados indican que las proteínas E1 de los VPH tanto de alto como de bajo riesgo, inhiben la expresión de IFN, lo que a su vez afecta la expresión de genes estimulados por interferón evitando así el control del proceso infeccioso.



**Figura 11. La proteína E1 de VPH-16, 18 y 11 regulan negativamente la expresión de genes estimulados por interferón.** Los niveles relativos del RNAm de los genes A) CCL5 B) RSAD2 (Viperin) e C) IFIT2 muestran una disminución estadísticamente significativa en presencia de E1 del VPH-16, 18 y 11. Los valores se expresan como la diferencia en doble  $\Delta\Delta$ -Ct en comparación con las células transfectadas con el control pCA. La expresión del gen constitutivo 18S se usó para normalizar. Las barras representan la media  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs control (pCA). Se realizaron tres replicas técnicas y biológicas.

Dado que las proteínas E1 del VPH inhiben la expresión de IFN, se procedió a demostrar si esta proteína podría interferir con la expresión de IFN después de estimular la vía con un inductor de IFN $\beta$ , para demostrar esto se usó el Poly I:C, el cual es un análogo sintético de RNA viral de doble cadena y es un bien establecido inductor de la producción de IFN $\beta$  (Raj y Pita, 1986). Para lo cual, se transfectaron cantidades crecientes de Poly I:C (0.01, 0.1, 1 y 3  $\mu$ g) para inducir la

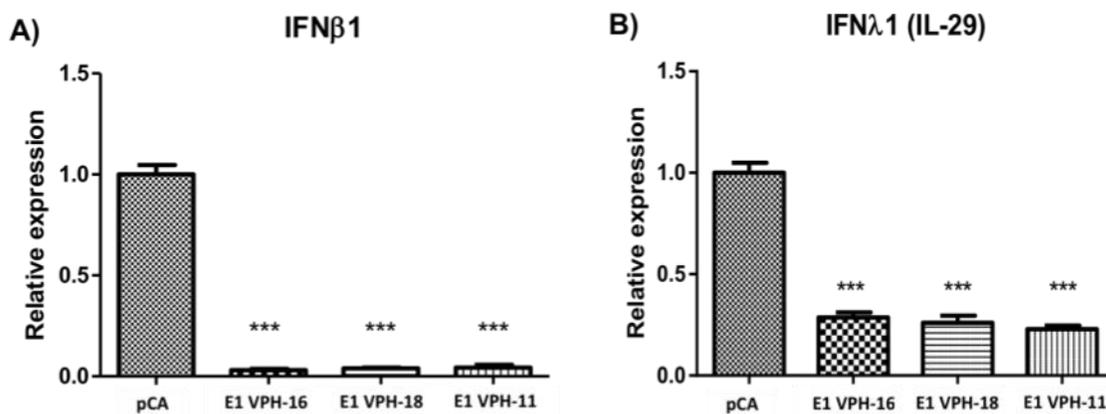
expresión de IFN $\beta$  en células HaCaT. En todos los casos se transfectaron 4.5  $\mu$ g del plásmido pCA para determinar que la presencia de DNA exógeno no induce un cambio en la expresión de IFN. Después de 24 h de la transfección, se evaluaron los niveles de RNAm de IFN $\beta$ 1 mediante qPCR. Los resultados indican que la expresión de IFN $\beta$ 1 aumenta significativamente en las células HaCaT al ser transfectadas con las diferentes cantidades de Poly I:C (Figura 12) ( $p < 0.0001$ ). Un estudio realizado por Takada y colaboradores determinaron que la concentración de 0.1  $\mu$ g de Poly I:C promueve la estimulación de IFN $\beta$ 1, sin afectar la viabilidad de las células HaCaT a las 24 horas (Takada et al., 2017); por lo tanto, se decidió utilizar dicha concentración para realizar los experimentos posteriores.



**Figura 12. Poly I: C induce la expresión de IFN $\beta$ 1.** El Poly I: C aumenta la expresión de IFN $\beta$ 1 en las células HaCaT en todas las concentraciones de 0.01 a 3  $\mu$ g. La concentración de 0.1  $\mu$ g se seleccionó para análisis adicionales. Las barras representan la media  $\pm$  SD. \*\*\*  $p < 0.0001$  vs control (pCA).

Para determinar si E1 interfiere con la expresión de IFN $\beta$ 1 durante el tratamiento con Poly I:C, las células HaCaT se co-transfectaron con 0.1  $\mu$ g de Poly I:C y 4.5  $\mu$ g de plásmido que expresa E1 de los diferentes VPH o bien con el plásmido control. Después de 24 h, se evaluó la expresión de IFN $\beta$ 1 mediante qPCR. La Figura 13A muestra que las células que expresan las proteínas E1 de los VPH-16, 18 y 11 inhiben la expresión de IFN $\beta$ 1 en comparación con las células

transfectadas con Poly I:C más el vector pCA ( $p < 0.0001$ ). Además, se decidió determinar si la concentración de  $0.1 \mu\text{g}$  de Poly I:C promueve la expresión de IFN $\lambda$ 1, al ser uno de los genes encontrados en el análisis de RNAseq, observando que en presencia de E1 de los VPH, la expresión de IFN $\lambda$ 1 disminuyó a pesar de la presencia del estimulante Poly I:C ( $p < 0.0001$ ) (Figura 13B). En conjunto, estos resultados demuestran que las proteínas E1 de los VPH de bajo y alto riesgo disminuyen la expresión de IFN tipo I y III incluso después de estimular la transcripción del gen IFN, lo que demuestra que las proteínas E1 de los VPH-16, 18 y 11 regulan negativamente la expresión de dos componentes clave de la respuesta inmune antiviral.



**Figura 13. La proteína E1 del VPH disminuye la expresión de IFN $\beta$ 1 e IFN $\lambda$ 1 en presencia del agonista Poly I:C.** La expresión de A) IFN $\beta$ 1 y B) IFN $\lambda$ 1 disminuyen significativamente en presencia de las proteínas E1 del VPH-16, 18 y 11. Los valores se expresan como la diferencia en  $\Delta\Delta\text{-Ct}$  en comparación con las células transfectadas con el vector pCA. La expresión del gen constitutivo 18S se usó para normalizar. Las barras representan la media  $\pm$  SD. \*\*\* $p < 0.0001$  vs control de pCA. Se realizaron tres replicas técnicas y biológicas.

### 7.5. E1 de los VPH de alto y riesgo activan la vía de no canónica de NF- $\kappa$ B.

Para determinar un posible mecanismo implicado en la regulación de los IFNs por parte de la proteína E1, se evaluaron los niveles protéicos de NF $\kappa$ B, un regulador maestro de genes implicados en la respuesta inmune (Liu et al., 2017), observando que en presencia de las diferentes proteínas E1 del VPH, existe un

aumento en los niveles de proteína p52 (NF- $\kappa$ B) (Fig.14A) y una disminución del inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 14B). Estos resultados indican que en presencia de E1 existe una activación de la vía no canónica de NF- $\kappa$ B, además, nuestros resultados son similares a los reportados por Nakahara y colaboradores (2017), en donde observaron que E1 del VPH-16 interactúa y activa la vía de NF- $\kappa$ B, promoviendo la expresión de sus genes blanco (Nakahara et al., 2017). Por lo tanto, la regulación de la expresión de IFN $\beta$ 1 e IFN $\lambda$ 1 no recae en la modulación de este factor de transcripción, sin embargo, podrían estar regulando otros genes sobre-expresados en presencia de E1 del VPH.

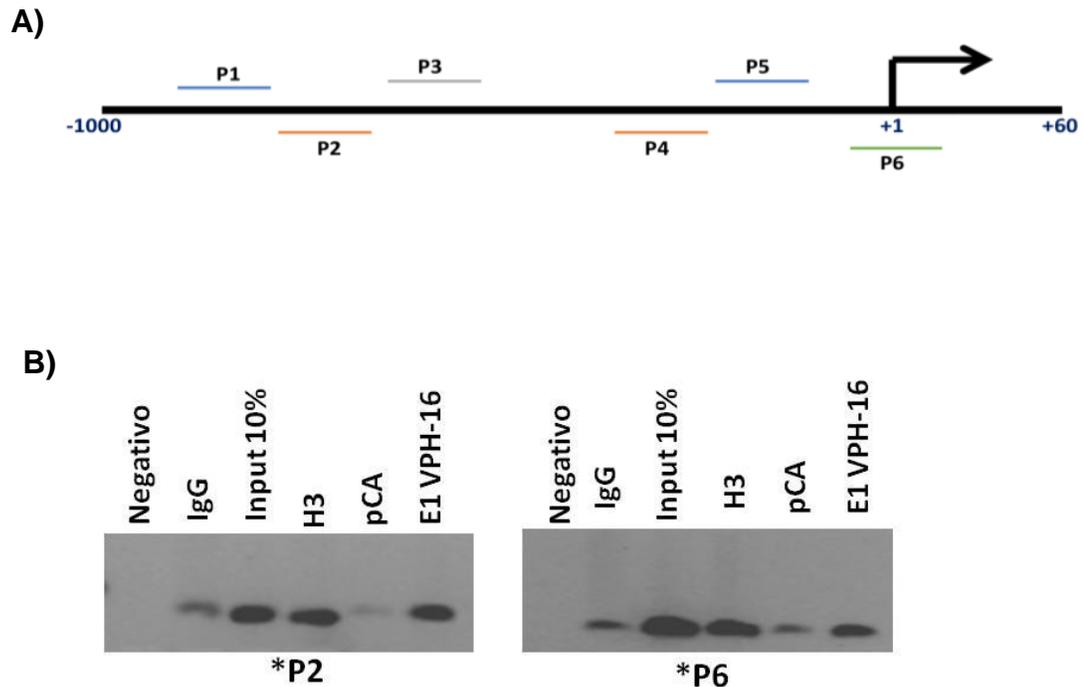


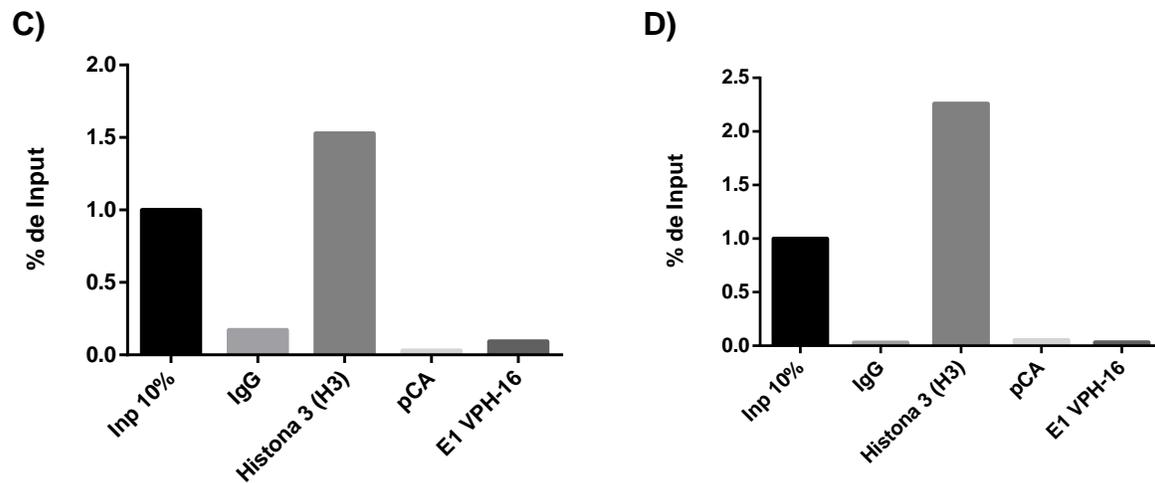
**Figura 14. E1 del VPH de alto y bajo riesgo activa la vía de NF- $\kappa$ B.** Las células HaCaT transfectadas con el vector pCA y los plásmidos que expresan E1 del VPH se recolectaron y se obtuvo un extracto de proteínas totales, 24 h después de la transfección. Los niveles de NF- $\kappa$ B se determinaron mediante transferencia Western blot. Las proteínas se separaron en una SDS-PAGE al 10% y la membrana se incubó con anti-NF- $\kappa$ B(p52) observando un aumento de los niveles de NF- $\kappa$ B y disminución de los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  (36kDa) en presencia de proteínas E1 del VPH-16, 18 y 11 E1. Se usaron GAPDH y Actina como control de carga.

## 7.6 E1 del VPH-16 no se une a la región promotora del gen de *IFN- $\beta$* .

Un posible mecanismo de cómo las proteínas virales pueden regular la expresión de genes celulares, es a través de la unión a regiones regulatorias como los promotores (Cannán et al., 2009). Se evaluó la posibilidad de que E1 del VPH-16 se una a la región promotora de IFN- $\beta$ 1 (este gen fue seleccionado debido a que en presencia de E1 disminuye la expresión, incluso a pesar de un estimulante de IFN- $\beta$ , además juega un papel importante en la respuesta inmune antiviral). Para

lo cual, se buscó la secuencia promotora de IFN- $\beta$ 1 (-1000 a +60) en “EPD The Eukaryotic Promoter Database” y se diseñaron *primers* de manera que abarcaran toda la secuencia regulatoria (Fig. 15A). Al analizar el ChIP con PCR punto final en las células HaCaT transfectadas con E1 del VPH-16 y el control pCA, se observó que posiblemente la proteína E1 se une a dos regiones del promotor de IFN- $\beta$ 1, la región P2 y P6 (Fig. 15B), debido a que se nota una amplificación en la IP con HA y una menor amplificación con IgG, sin embargo para determinar esta interacción se realizó ensayos qPCR (Fig. 15C) en el cual se compara el enriquecimiento de la IP con HA comparado con el Input determinando que no hay una asociación entre E1 del VPH-16 y las dos regiones del promotor de IFN- $\beta$ 1. Por lo tanto, esto nos sugiere que la proteína E1 del VPH-16 no se une al promotor de IFN tipo I. Sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que E1 pueda unirse al DNA celular.



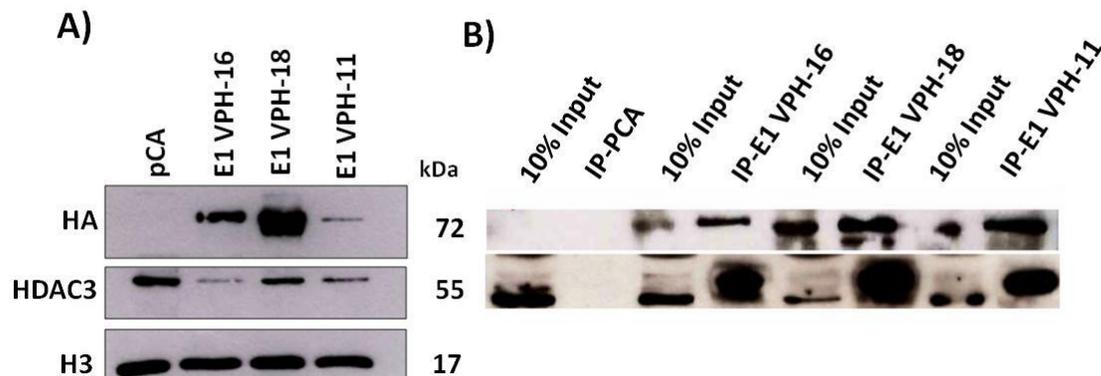


**Figura 15. E1 del VPH-16 no se une al promotor de IFN- $\beta$ 1.** A) Secuencia promotora de IFN $\beta$ 1, en el cual se muestra los primers (P1-P6) diseñados que abarcan la mayor parte del promotor. B) Ensayo de ChIP de células HaCaT transfectadas con pCA y E1 del VPH-16, analizadas mediante PCR punto final. En el gel de agarosa de 1.5% se observa un amplicón (aprox. 150pb) en presencia de E1 del VPH-16 tanto en la región P2 y P6. C) Ensayo de ChIP analizado mediante qPCR, muestra el enriquecimiento de E1 del VPH-16 en la región P2 del promotor de IFN $\beta$ 1 comparado con el enriquecimiento de input 10%. D) Ensayo de ChIP analizado mediante qPCR, muestra el enriquecimiento de E1 del VPH-16 en la región P6 del promotor de IFN $\beta$ 1 comparado con el enriquecimiento de input 10%. Indicando que E1 del VPH-16 no se une al promotor de IFN tipo I. La inmunoprecipitación del DNA asociado a la proteína E1 del VPH-16 se hizo mediante el anticuerpo HA, como control positivo el anticuerpo anti-H3 y como control de especificidad el anticuerpo IgG.

### 7.7 E1 del VPH de alto y bajo riesgo disminuyen los niveles proteicos de HDAC3 y aumenta los niveles de la marca de histona H3K9ac.

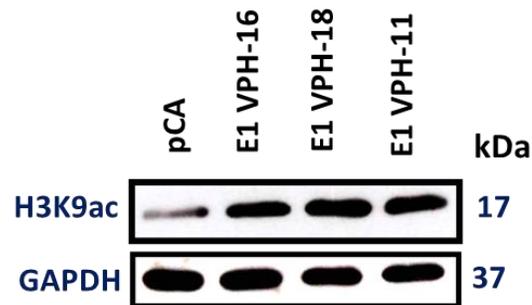
Se ha determinado que algunos virus son capaces de regular componentes epigenéticos como los modificadores de la cromatina particularmente las deacetilasas de histonas (HDACs), teniendo un efecto sobre el ciclo replicativo y el desarrollo de cáncer (Herbein et al., 2010). Con el fin de explorar posibles mecanismos asociados a la regulación de la expresión de genes celulares promovida por E1, se evaluó el efecto de E1 sobre modificadores de la cromatina, particularmente sobre la desacetilasa de histona 3 (HDAC3). Células HaCat fueron transfectadas con los plásmidos que expresan E1 del VPH-16, 18 y 11 y el control (pCA), 24 horas post-transfección se obtuvieron extractos nucleares para determinar el efecto de E1 del VPH sobre los niveles de la proteína de HDAC3 mediante WB. Los resultados obtenidos nos indican que en presencia de E1 de los tres tipos virales existe una disminución de los niveles de HDAC3 con respecto

al control, siendo más evidente en presencia de E1 del VPH-16 (figura 16A). Posteriormente, surgió la interrogante sobre como la proteína E1 del VPH podría estar induciendo la disminución en los niveles de HDAC3, para lo cual se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) y demostrar la capacidad de E1 para interactuar con HDAC3. Para ello, se inmunoprecipitó la proteína E1 de cada tipo viral utilizando el anticuerpo anti-HA, el WB se realizó para evaluar la presencia de HDAC3. La figura 16B muestra el resultado del WB de la Co-IP en la línea celular HaCat observando una banda de aproximadamente 55kDa que corresponde a HDAC3 en presencia de las diferentes proteínas E1, mientras que en la IP realizada a las células transfectadas con el vector vacío pCA, esta banda no se observa. Estos resultados indican que la disminución en los niveles de HDAC3 inducida por E1 podría incluir un mecanismo dependiente de su interacción con dicha proteína.



**Figura 16. E1 del VPH de alto y bajo riesgo disminuye e interactúa *in vivo* con HDAC3.** A) Western blot de extractos nucleares de células HaCat transfectadas con Pca y E1 del VPH, se observa disminución de los niveles de HDAC3 en presencia de E1 del VPH-16, 18 y 11 con respecto al control. Como control de carga se utilizó a la histona H3 total. B) Co-IP en células HaCaT transfectadas con E1 del VPH. B). Se realizaron de coimmunoprecipitación (IP) de extractos de células HaCaT transfectados con pCA (control) y E1 del VPH de alto y bajo riesgo con anticuerpos anti-HA de ratón. Los productos inmunoprecipitados (IP) se analizaron mediante western blot con anticuerpos anti-HA o anti-HDAC3. Se observa una banda de aproximadamente 55kDa en la IP de E1 del VPH-16,18 y 11 la cual corresponde al peso de HDAC3, mostrando la formación de un complejo entre estas dos proteínas. Mientras que en el pCA no se muestra la formación del complejo.

Debido a que se encontró que la proteína E1 afecta los niveles de HDAC3, se decidió evaluar uno de los residuos blanco de HDAC3, la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9ac), la cual representa una marca de activación transcripcional. Los resultados muestran que en presencia de E1 existe un incremento de los niveles de esta marca de activación (figura 17), lo cual sugiere que E1 podría tener efecto en el patrón de acetilación de las histonas y así regular la expresión de genes celulares.



**Figura 17. La proteína E1 de los VPH-16,18 y 11 aumentan la acetilación de la lisina 9 de la histona H3.** Células HaCat fueron transfectadas con E1 del VPH-16, 18 y 11. El western blot muestra la expresión de E1 del VPH 24 horas post-transfección, en el que se observa un aumento en los niveles de H3K9ac en presencia de las tres proteínas E1. GAPDH como control de carga.

## 8. DISCUSIÓN

La proteína E1 del VPH, es una proteína de expresión temprana que participa a lo largo de todo el ciclo replicativo viral, es la única proteína con actividad enzimática del VPH ya que presenta un dominio de helicasa dependiente de ATP, lo cual favorece la replicación viral (Bervgal et al., 2013). E1 del VPH interactúa con proteínas de la maquinaria de replicación celular (Egawa et al., 2012) y es capaz de interactuar con proteínas asociadas a mecanismos epigenéticos, favoreciendo la replicación del genoma del VPH (Swindle et al., 1998; Lee et al., 1999). Los estudios en E1 se basan principalmente en solo esta función, sin embargo, se han identificado otras posibles funciones esta proteína como en la regulación de expresión de genes, por ejemplo, al silenciar el gen E1 del VPH-18 en la línea celular HeLa (Adenocarcinoma positiva a VPH-18), los niveles de genes asociados a procesos celulares de respuesta inmune y apoptosis se recuperaban (Castillo et al., 2014). Sin embargo, adicional al estudio mencionado anteriormente, no existe más evidencia de E1 y su posible implicación en la regulación de la expresión de genes celulares. Debido a lo anterior, en este estudio se evaluó el efecto directo de E1 del VPH sobre la expresión de genes celulares en una línea celular negativa a VPH, además, evaluamos si podrían existir diferencias entre los VPH de alto y bajo riesgo, mediante RNA-seq.

En este trabajo encontramos que las proteínas E1 de los VPH de alto y bajo riesgo regulan la expresión de genes celulares involucrados en la respuesta inmune, más específicamente en la respuesta inmune antiviral. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por el grupo de Castillo y colaboradores, ya que ellos al silenciar a E1 genes asociados a respuesta inmune antiviral incrementaron su expresión. Posteriormente se identificó que los tres tipos virales regulan cuatro genes en común, IFB1, IFNL1, CCL5 y Viperin, genes clave involucrados en la respuesta inmune antiviral.

IFN $\beta$ 1 e IFN $\lambda$ 1 son dos elementos clave de la respuesta inmune antiviral, una vez que son liberados se unen a su receptor específico y promueven la expresión de

genes estimulados por interferón (ISG), ayudando a controlar los procesos infecciosos (Schoggins et al., 2011). Los ISG regulan múltiples mecanismos como la inhibición de la traducción de proteínas, la degradación del RNA viral y la activación y supervivencia de células inmunes innatas y adaptativas como las células dendríticas (DC), macrófagos, células NK y células T, activando la respuesta inmune innata y adaptativa para inhibir la infección viral (Zuniga et al., 2015; Schoggins, 2018). Debido a la relevancia de estos dos elementos, se seleccionaron IFN $\beta$ 1 e IFN $\lambda$ 1 para una validación adicional a través de qPCR, que demostró una disminución de los niveles de RNAm en presencia de los tres tipos virales. Del mismo modo, al analizar IFN $\lambda$ 1, se encontró que E1 también disminuyó su expresión después del tratamiento con Poly I:C. Es importante mencionar que este efecto podría llevarse a cabo cuando el VPH infecta las células de la capa basal de epitelio plano estratificado, al expresarse E1 se promovería una regulación negativa sobre la expresión de genes del sistema inmune. Tal afirmación podría estar respaldada por el hecho de que algunos otros elementos involucrados en la respuesta inmune fueron regulados negativamente por E1 como CCL5, viperin e IFIT2, los cuales son genes estimulados por interferón, estos juegan un papel importante en la respuesta inmune antiviral, ya que son capaces de inhibir la producción de proteínas virales, la transcripción de genes virales y pueden promover la degradación del RNA mensajero viral. Estos datos sugieren que E1 tiene un efecto como un inmunosupresor favoreciendo la infección por el VPH. Además, de su participación en la replicación del genoma del VPH, E1 podría actuar en la persistencia del VPH, debido a su posible papel como un inmunosupresor, debido a que bloquea la expresión de IFN tipo I y III. Por lo que sería interesante analizar el mecanismo por el cual E1 interfiere con la expresión IFNs, así, como su efecto sobre la expresión de ISG.

La inhibición de la expresión de IFN ha sido observada en otras infecciones virales como las producidas por HVB, HSV, y HTLV-1, mismo que emplean para evadir la respuesta inmune innata y así favorecer el proceso infeccioso y la persistencia viral (Schoggins et al., 2018). Nuestros resultados proponen una nueva función

que se le podría atribuir a la proteína E1, el cual puede asociarse a favorecer el ciclo replicativo y/o la persistencia viral.

Interesantemente el diagrama de Venn mostró que E1 del VPH-16 y E1 del VPH-18, compartían los siguientes cuatro genes en común FOSB (Promueve proliferación celular), DUSP6 (Regulan negativamente a los miembros de la superfamilia de las MAPK; MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38), NRA4 (regulador transcripcional asociado a proliferación, diferenciación y apoptosis) y CCNA1 (promueve proliferación celular, ya que se une a las Cdk2 y Cdc2, que actúan la fase S y la fase G2 del ciclo celular respectivamente del ciclo celular) (Yang et al., 1999; Zhao et al., 2010; Huang et al., 2016; Zhu et al., 2017). Se ha demostrado que la sobreexpresión de algunos de estos genes juega un papel importante en la carcinogénesis como DUSP6, el cual puede tener un papel dual en la carcinogénesis actuando como supresor de tumor (cáncer de páncreas, ovario) pero también se ha demostrado su papel como pro-oncogenico en algunos tipos de cáncer como glioblastoma, carcinoma de tiroides, cáncer de mama y la leucemia mieloide aguda (Ahmad et al., 2018). Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de DUSP6 se asocia con un mal pronóstico y resistencia al tratamiento en cáncer de ovario, páncreas, esófago y glioblastoma (Ahmad et al., 2018). Por otra parte, se ha reportado que la sobreexpresión de NR4A en carcinoma de células pequeñas de pulmón, se asocia con recurrencia del tumor y con baja supervivencia (Zhu et al., 2017). Así mismo, se determinó que la sobreexpresión del gen de ciclina A se asocia con resistencia al tratamiento en cáncer de ovario (Huang et al., 2016). Debido a la participación de E1 a lo largo del proceso carcinogénico y su continua expresión en cáncer, resulta interesante estudiar la expresión de estos genes en los tipos de cáncer positivos a VPH y evaluar si podrían ser usados como biomarcadores asociados al desenlace clínico.

Adicionalmente, se determinó que E1 del VPH-16 reguló la expresión de MMP1, EREG y ANGEPTL4, los cuales están involucrados en procesos celulares como la migración de queratinocitos, la reepitelización, proliferación y angiogénesis (Shirakata et al., 2000; Nagase et al., 2006; Yotsumoto et al., 2013).

Interesantemente, la sobreexpresión de estos genes se ha asociado a la migración y angiogénesis en algunos tipos de cáncer. La sobreexpresión de MMP1 se asocia con la progresión del tumor en cáncer de mama (Boström et al., 2011), Además, se ha demostrado que la inhibición de ANGPTLA4, reduce el fenotipo angiogénico en un modelo de melanoma (Hu et al., 2016). Estos datos sugieren que E1 podría desempeñar un papel en la proliferación, migración y angiogénesis en tumores positivos a VPH a través de la sobreexpresión de algunos genes celulares, por lo cual es necesario continuar con los estudios de los efectos producidos por esta proteína en cáncer asociados a VPH.

El papel de E1 y su posible participación en el desarrollo a cáncer se ven apoyado con el estudio realizado por Baedyananda y colaboradores, en donde analizaron los niveles de RNAm de E1 del VPH-16 en biopsias con diferentes grados de lesión (CIN), así como en cáncer cervical, observando una mayor expresión de E1 conforme avanza la lesión, concluyendo que E1 podría jugar un papel en el inicio y/o progresión del tumor (Baedyananda et al., 2017). Sin embargo, es necesario realizar estudios en presencia de E1 del VPH, para demostrar si tiene la capacidad de contribuir a la carcinogénesis.

Ya que se demostró que la proteína E1 afecta la expresión de genes celulares, nos preguntamos cual o cuales podrían ser los mecanismos involucrados en la regulación de genes celulares. Considerando que las proteínas E1 de los VPH-16, 18y 11 son capaces de interactuar con modificadores de la cromatina como la histona H1, con la subunidad del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF (Ini1 / hSNF5) y con Sirtuina 1 (SIRT1: deacetilasa de histona clase III) (Swindle et al., 1998; Lee et al., 1999, Das et al., 2019), sugiere que E1 no solo 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. Se ha demostrado que diversos virus incluyendo al VPH, a través de sus oncoproteínas, son capaces de regular a desacetilasas de histonas (HDACs) para incrementar o inhibir la expresión de genes virales y/o celulares, promoviendo tanto el ciclo replicativo como la transformación celular (Mirzaei et al., 2020). Por lo

tanto, quisimos demostrar si la proteína E1 es capaz de regular a HDACs y así impactar en la expresión de genes celulares. Encontramos que E1 de los VPH de alto y bajo riesgo son capaces de interactuar con e inhibir los niveles de HDAC3. Esta, es una deacetilasa que pertenece a la familia clase I, las cuales usan como cofactor al Zinc, que se localiza a nivel nuclear y citoplasmático y que es capaz de deacetilar residuos de lisina presentes en las histonas H3 y H4 a través de la formación del complejo co-represor del receptor nuclear (NCoR) y el mediador silenciador de los co-represores del ácido retinoico y del receptor de la hormona tiroidea (SMRT) o complejo NCoR/SMRT. Además, puede desacetilar proteínas no histónicas involucradas en diversos procesos celulares (Seto et al., 2014; Emmett et al., 2019). Un estudio realizado por Chan y colaboradores demostraron que la inhibición de HDAC3 incrementa la acetilación de la H4, favoreciendo la expresión de genes asociados a inflamación. Interesantemente, observaron que al disminuir a HDAC3 se inhibe la expresión de IFN- $\beta$ , así mismo, demostraron que al inhibir a HDAC3 aumenta la expresión de ciclo-oxigenasa 1 (COX-1) y prostranglandinas 2 (PGE2), los cuales favorecen la regulación negativa de INF- $\beta$  (Chen et al., 2012).

Además, se ha demostrado que el silenciamiento de HDAC3 favorece la expresión de genes asociados a inflamación como IL-4, la cual participa en la polarización de macrófagos 1 (M1) a macrófagos 2 (M2), también llamados macrófagos asociados a tumor (TAMs), los cuales tienen la capacidad de inducir la proliferación, migración, invasión y angiogénesis, procesos necesarios para la transformación celular (Wang et al., 2010; Mullican et al., 2011). Estos datos sugieren que E1 del VPH al inhibir a HDAC3 favorece la evasión de la respuesta inmune antiviral (mediante la inhibición de IFN- $\beta$ ), además apoyan el posible papel que E1 podría tener en la carcinogénesis asociada al VPH.

En muestras de pacientes con cáncer de mama, colón y páncreas los niveles de HDAC3 está aumentada y esto favorece la proliferación, migración, invasión y resistencia al tratamiento en estos tipos de cáncer (Spurling et al., 2008; Jiao et al., 2014; Cui et al., 2018), por lo que resulta interesante determinar los niveles de expresión de HDAC3 en muestras de cáncer asociadas a VPH y relacionar la

disminución de dicha HDAC con parámetros clínico-histopatológicos que pudieran o no favorecer el desarrollo de cáncer, lo que nos permitiría proponer a HDAC3 como un posible biomarcador en tumores VPH positivos.

Al observar una clara disminución de los niveles de HDAC3 en presencia de E1 de los diferentes tipos virales, nos llevó a pensar si esto también tenía un impacto sobre los niveles de algunas modificaciones post-traduccionales de las histonas asociadas a HDAC3 como es la acetilación de la lisina 9 de la H3 (H3K9ac), la cual es una marca asociada a activación transcripcional que se localiza en los promotores de algunos genes (Kratz et al., 2010; Večeřa et al., 2017). Encontramos que en presencia de E1 del VPH de alto y bajo riesgo hay un incremento de la marca H3K9ac, lo cual podría estar favoreciendo la sobreexpresión de genes observados en presencia de E1 del VPH. Por lo que sería interesante determinar si en los promotores de los genes sobre-expresados en presencia de E1 de los VPH de alto riesgo, hay un mayor enriquecimiento de la marca de activación transcripcional e inclusive determinar que otras marcas se están enriqueciendo en presencia de E1 en los promotores de genes sub-expresados, por lo tanto los cambios inducidos en marcas de histonas en presencia de E1 podría ser uno de los mecanismos mediante los cuales esta proteína regula la expresión de genes celulares.

Algunos virus son capaces de inducir cambios en marcas de histonas para favorecer la replicación viral (Reeves et al., 2010; Knipe et al., 2013; Milavetz et al., 2015; Gao et al., 2020), sin embargo, también se ha observado que algunos de estos son capaces de interactuar con modificadores de la cromatina e inducir cambios en marcas de histonas favoreciendo la expresión de genes asociados a transformación celular (Flanagan et al., 2006; Poreba et al., 2011) denominadas como onco-marcas (Füllgrabe et al., 2011). En diversos tipos de cáncer se ha evaluado la H3K9ac y se ha asociado con datos clínicos, por ejemplo, en cáncer de ovario se encontró que la disminución de H3K9ac está asociada con la progresión tumoral, así como con el estadio clínico (Zhen et al., 2010). En contraste, en pacientes con adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas o

astrocitoma la disminución de la expresión de H3K9ac se asocia con un mejor pronóstico (Barlesi et al., 2007) mientras que en pacientes con glioma se asoció con peor supervivencia en los pacientes (Liu et al., 2010).

Por otro lado, Ji et al., 2020, evaluaron la expresión de HDAC3 en muestras ratones y en pacientes con carcinoma hepatocelular (positivos al virus de hepatitis), encontrando una correlación entre la disminución de HDAC3, aumento de H3K9ac y disminución de la marca de represión transcripcional H3K9 trimetilada (H3K9me3). Además, la sobreexpresión de H3K9ac tuvo un enriquecimiento en los promotores de genes asociados a regular el ciclo celular y la diferenciación (*Cdk6*, *Usp39*, *Actn4*, *Ptpn7*, *Mapre3* y *Tfdp2*), reparación de daño en el DNA (*Ercc1* y *Trip13*), así como *Kras*, *Pbx3*, *Rpl34* y *Mical2*, todos estos genes están involucrados en transformación celular. Estos datos sugieren que H3K9ac promueve activación transcripcional de genes relacionados con el carcinoma y activa su expresión para promover la formación de tumores (Ji et al., 2020). A pesar de que la mayoría de los tumores muestran disminución de H3K9ac, un estudio en carcinoma hepatocelular muestra aumento, el cual se asoció con la disminución de HDAC3, lo cual es similar a nuestros datos. Por lo que será interesante analizar tanto a HDAC3 y H3K9ac en muestras de pacientes con cáncer asociados a VPH y conocer si sus niveles de expresión se asocian con datos clínicos y si pudieran tener un papel como posibles biomarcadores. Además, resulta interesante que nuestros resultados al igual que los de carcinoma hepatocelular son diferentes a lo reportado con otros tipos de cáncer, esto podría deberse a que no se asocian a infecciones virales, sugiriendo que en los tipos de cáncer asociados virus se inducen cambios en marcas muy particulares mostrando un comportamiento diferente a aquellos tumores no asociados a virus.

Estos datos muestran evidencia que E1 pudiera regular marcas de histonas, por lo que sería interesante determinar en presencia de E1 del VPH cambios en las modificaciones post-traduccionales de las histonas, siendo este un posible mecanismo de cómo E1 pudiera regular la expresión de genes celulares que favoreciera tanto el ciclo replicativo como la carcinogénesis.

La proteína E1 del VPH cuenta con un DBD, el cual se une al origen de replicación en el genoma del VPH (Auster y Joshua-Tor, 2004). Además, se ha demostrado que proteínas virales que contienen DBD son capaces de unirse al DNA celular y como EBNA1 del Virus de Epstein-Barr, E2 del VPH y LANA de Herpesvirus (Canaan et al., 2009; Vösa et al., 2012; Lu et al., 2012). Partiendo de esto, consideramos que E1 del VPH-16 podría unirse al DNA celular y así regular la expresión de genes celulares. El primer abordaje que se hizo fue buscar en los promotores de los genes regulados en presencia de E1, la secuencia a la cual E1 se une al origen de replicación; sin embargo, no hubo alguna similitud en al menos los promotores de los genes compartidos por los tres tipos virales, lo cual nos podría indicar que E1 pudiera unirse al DNA celular a través del reconocimiento a una secuencia diferente a la cual reconoce en el origen de replicación viral. Para continuar indagando en este posible mecanismo se hicieron ensayos tipo ChIP, para demostrar la unión de E1 al promotor de los genes expresados diferencialmente, para iniciar con esta pregunta escogimos al gen de IFN- $\beta$ 1, encontrando que E1 no se une a dos regiones del promotor (P2 y P6) de este gen. Sin embargo, esto no indica que no pudiera unirse a otros genes celulares expresados diferencialmente, inclusive a otros elementos regulatorios y así, poder regular la expresión de genes celulares, por lo que sería interesante determinar a qué otros genes y a que otras regiones del genoma celular la proteína E1 se pudiera unir, así como, determinar si la interacción es de manera directa o de manera indirecta a través de la interacción con factores de transcripción, con co-reguladores (co-activadores o co-represores) o con proteínas modificadoras de la cromatina (DNA metil-transferasas, Acetil, metil-transferasas, desacetilasas, desmetilasas, variantes de histonas).

Por ejemplo Canaan y colaboradores (2009), demostraron que la proteína antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Bar (EBNA1) (proteína que participa en la replicación y transcripción viral) del virus de Epstein-Barr (EBV), se une directamente a promotores de genes celulares, ocasionando cambios en la expresión de genes asociados a procesos como crecimiento celular, migración, respuesta inmune y metabolismo, los autores muestra como la proteína viral

regula la expresión de genes a través de la unión al DNA celular (Canaan et al., 2009).

Además del papel conocido de E1 en la replicación viral, los resultados aquí mostrados apuntan a que la proteína E1 de los VPH de alto y bajo riesgo están estar implicados en la evasión de la respuesta inmune antiviral, favoreciendo así, el ciclo replicativo. E1 del VPH de alto riesgo, al evadir la respuesta inmune podría favorecer el establecimiento de una infección persistente, además de regular genes involucrados en procesos que conllevan a la transformación celular.

Por lo tanto, encontramos que la proteína E1 puede ser regulador transcripcional con alto impacto en la evasión de la respuesta inmune, pudiendo favorecer la persistencia de la infección viral y la carcinogénesis, de esta manera, al efecto ya conocido de los oncogenes virales E5, E6 y E7, se podría sumarse E1. Sin embargo, es claro que debe seguir estudiándose su impacto de la regulación de genes sobre el sistema inmune y la carcinogénesis, así, como los mecanismos de cómo regula la expresión de genes celulares. Esto ayudaría a entender el papel que tiene E1 en el establecimiento de la infección y la carcinogénesis, además, es posible que en un futuro pueda ser valorado como un posible blanco terapéutico.

## 9. CONCLUSIONES

1. La proteína E1 del VPH-16, 18 y 11 regulan la expresión de genes celulares.
2. E1 del VPH-16, 18 y 11 disminuyen la expresión de genes celulares asociados a respuesta inmune antiviral (*IFN $\beta$ 1* e *IFN $\lambda$ 1*).
3. E1 del VPH de alto y bajo riesgo inhiben la producción de *IFN $\beta$ 1* y de *IFN $\lambda$ 1*.
4. La proteína E1 del VPH-16, 18 y 11 disminuye la expresión de algunos genes estimulados por IFN (*CCL5*, *VIPERIN* e *IFIT2*).
5. La presencia de E1 del VPH-16, 18 y 11 promueven la activación de la vía no canónica de NF- $\kappa$ B.
6. La proteína E1 del VPH-16 y 18 aumentan la expresión de genes celulares en común asociados a transformación celular (*FOSB*, *DUSP6*, *NR4A1* y *CCNA1*).
7. E1 del VPH-16 aumenta la expresión de *MMP1*, *EREG*, *ANGPTL4* y *VEGFA* involucrados en procesos de proliferación, migración, angiogénesis.
8. La presencia de E1 del VPH-16,18 y 11 disminuyen los niveles de proteína de HDAC3.
9. La proteína E1 del VPH-16, 18 y 11 aumenta los niveles de la H3K9ac: marca asociada a activación transcripcional.
10. E1 del VPH-16 no se une de manera *in vivo* al promotor de *IFN $\beta$ 1*.

## 10. PERSPECTIVAS

1. Determinar los mecanismos por los cuales E1 de los VPH de alto y bajo riesgo regulan la expresión de genes celulares.
2. Determinar el papel de la activación de la vía de NF- $\kappa$ B (ciclo replicativo o carcinogénesis) por parte de E1 del VPH.
3. Evaluar el efecto de E1 del VPH de alto y bajo riesgo sobre las modificaciones post-traduccionales de las histonas.
4. Analizar la capacidad de unión de E1 del VPH a elementos regulatorios (promotores y enhancer) de los genes expresados diferencialmente.

## 11. REFERENCIAS

- Ahmad MK, Abdollah NA, Shafie NH, Yusof NM, Razak SRA. Dual-specificity phosphatase 6 (DUSP6): a review of its molecular characteristics and clinical relevance in cancer. *Cancer Biol Med*. 2018 Feb;15(1):14-28. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0107. PMID: 29545965; PMCID: PMC5842331.
- Albright ER, Kalejta RF. Canonical and Variant Forms of Histone H3 Are Deposited onto the Human Cytomegalovirus Genome during Lytic and Latent Infections. *J Virol*. 2016 Oct 28;90(22):10309-10320. doi: 10.1128/JVI.01220-16. PMID: 27605676; PMCID: PMC5105665.
- Álvarez-Argüelles ME, Melón S, Junquera ML, Boga JA, Villa L, Pérez-Castro S, de Oña M. Human papillomavirus infection in a male population attending a sexually transmitted infection service. *PLoS One*. 2013;8(1): e54375. doi: 10.1371/journal.pone.0054375. Epub 2013 Jan 23. PMID: 23372715; PMCID: PMC3553085.
- Amador-Molina A, Trejo-Moreno C, Romero-Rodríguez D, Sada-Ovalle I, Pérez-Cárdenas E, Lamoyi E, Moreno J, Lizano M. (2019). Vaccination with human papillomavirus-18 E1 protein plus  $\alpha$ -galactosyl-ceramide induces CD8+ cytotoxic response and impairs the growth of E1-expressing tumors. *Vaccine*. 21;37(9):1219-1228. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.12.036. Epub 2019 Jan 28.
- Annunziato, A. (2008) DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin. *Nature Education* 1(1):26.
- Aristizabal MJ, Anreiter I, Halldorsdottir T, Odgers CL, McDade TW, Goldenberg A, Mostafavi S, Kobor MS, Binder EB, Sokolowski MB and O'Donnell KJ. Biological embedding of experience: A primer on epigenetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Oct 17. pii: 201820838. doi: 10.1073/pnas.1820838116.
- Balakrishnan L, Milavetz B. Epigenetic Regulation of Viral Biological Processes. *Viruses*. 2017 Nov 17;9(11):346. doi: 10.3390/v9110346. PMID: 29149060; PMCID: PMC5707553.
- Barlesi F, Giaccone G, Gallegos-Ruiz MI, Loundou A, Span SW, Lefesvre P et al. (2007). Global histone modifications predict prognosis of resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 25: 4358–4364.
- Bergant M, Banks L. SNX17 facilitates infection with diverse papillomavirus types. *J Virol*. 2013 Jan;87(2):1270-3. doi: 10.1128/JVI.01991-12. Epub 2012 Oct 31. PMID: 23115288; PMCID: PMC3554065.
- Bergvall M, Melendy T, Archambault J. The E1 proteins. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):35-56. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.020. Epub 2013 Sep 10. PMID: 24029589; PMCID: PMC3811109.

- Black JC, Whetstine JR. Chromatin landscape: methylation beyond transcription. *Epigenetics*. 2011 Jan;6(1):9-15. doi: 10.4161/epi.6.1.13331. Epub 2011 Jan 1. PMID: 20855937; PMCID: PMC3052912.
- Boström, P., Söderström, M., Vahlberg, T., Söderström, K. O., Roberts, P. J., Carpén, O., & Hirsimäki, P. (2011). MMP-1 expression has an independent prognostic value in breast cancer. *BMC cancer*, 11, 348.
- Castillo A, Wang L, Koriyama C, Eizuru Y, Jordan K, Akiba S. A systems biology analysis of the changes in gene expression via silencing of HPV-18 E1 expression in HeLa cells. *Open Biol*. 2014 Oct;4(10):130119. doi: 10.1098/rsob.130119. PMID: 25297386; PMCID: PMC4221889.
- Chen R, Kang R, Fan XG, Tang D. Release and activity of histone in diseases. *Cell Death Dis*. 2014 Aug 14;5(8):e1370. doi: 10.1038/cddis.2014.337. PMID: 25118930; PMCID: PMC4454312.
- Chen X, Barozzi I, Termanini A, Prosperini E, Recchiuti A, Dalli J, Miettton F, Matteoli G, Hiebert S, Natoli G. Requirement for the histone deacetylase Hdac3 for the inflammatory gene expression program in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 16;109(42):E2865-74. doi: 10.1073/pnas.1121131109. Epub 2012 Jul 16. PMID: 22802645; PMCID: PMC3479529.
- Chen Z, Li S, Subramaniam S, Shyy JY, Chien S. Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers. *Annu Rev Biomed Eng*. 2017 Jun 21;19:195-219. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044720.
- Conn KL, Hendzel MJ, Schang LM. The differential mobilization of histones H3.1 and H3.3 by herpes simplex virus 1 relates histone dynamics to the assembly of viral chromatin. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003695. doi: 10.1371/journal.ppat.1003695. Epub 2013 Oct 10. Erratum in: *PLoS Pathog*. 2016 Apr;12(4):e1005575. PMID: 24130491; PMCID: PMC3795045.
- Cui Z, Xie M, Wu Z, Shi Y. Relationship Between Histone Deacetylase 3 (HDAC3) and Breast Cancer. *Med Sci Monit*. 2018 Apr 22;24:2456-2464. doi: 10.12659/msm.906576. PMID: 29680858; PMCID: PMC5935015.
- Das D, Bristol ML, Smith NW, James CD, Wang X, Pichierri P, Morgan IM. Werner Helicase Control of Human Papillomavirus 16 E1-E2 DNA Replication Is Regulated by SIRT1 Deacetylation. *mBio*. 2019 Mar 19;10(2):e00263-19. doi: 10.1128/mBio.00263-19. Erratum in: *mBio*. 2019 Aug 13;10(4): PMID: 30890607; PMCID: PMC6426601.
- Dayaram T, Marriott SJ. Effect of transforming viruses on molecular mechanisms associated with cancer. *J Cell Physiol*. 2008 Aug;216 (2):309-14. doi: 10.1002/jcp.21439. PMID: 18366075; PMCID: PMC4160108.

- Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):80-98. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.008. Epub 2013 Sep 7.
- Doorbar J. Host control of human papillomavirus infection and disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018 Feb;47:27-41. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.08.001. Epub 2017 Aug 12. PMID: 28919159.
- Egawa N, Doorbar J. The low-risk papillomaviruses. *Virus Res*. 2017 Mar 2;231:119-127. doi: 10.1016/j.virusres.2016.12.017. Epub 2016 Dec 28. PMID: 28040475.
- Eckhardt M, Zhang W, Gross AM, Von Dollen J, Johnson JR, Franks-Skiba KE, Swaney DL, Johnson TL, Jang GM, Shah PS, Brand TM, Archambault J, Kreisberg JF, Grandis JR, Ideker T, Krogan NJ. Multiple Routes to Oncogenesis Are Promoted by the Human Papillomavirus-Host Protein Network.
- Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, Kiyono T. The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol*. 2012 Mar;86(6):3276-83. doi: 10.1128/JVI.06450-11. Epub 2012 Jan 11. PMID: 22238312; PMCID: PMC3302310.
- Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, Kiyono T. The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol*. 2012 Mar;86(6):3276-83. doi: 10.1128/JVI.06450-11. Epub 2012 Jan 11. PMID: 22238312; PMCID: PMC3302310.
- Eckhardt M, Zhang W, Gross AM, Von Dollen J, Johnson JR, Franks-Skiba KE, Swaney DL, Johnson TL, Jang GM, Shah PS, Brand TM, Archambault J, Kreisberg JF, Grandis JR, Ideker T, Krogan NJ. Multiple Routes to Oncogenesis Are Promoted by the Human Papillomavirus-Host Protein Network. *Cancer Discov*. 2018 Nov;8(11):1474-1489. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-1018. Epub 2018 Sep 12. PMID: 30209081; PMCID: PMC6375299.
- Emmett MJ, Lazar MA. Integrative regulation of physiology by histone deacetylase 3. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Feb;20(2):102-115. doi: 10.1038/s41580-018-0076-0. PMID: 30390028; PMCID: PMC6347506.
- Ferrari R, Berk AJ, Kurdistani SK. Viral manipulation of the host epigenome for oncogenic transformation. *Nat Rev Genet*. 2009 May;10(5):290-4. doi: 10.1038/nrg2539. PMID: 19290008; PMCID: PMC2692573.
- Felsenfeld G. A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Jan 1;6(1):a018200. doi: 10.1101/cshperspect.a018200. PMID: 24384572; PMCID: PMC3941222.
- Flanagan JM. Host epigenetic modifications by oncogenic viruses. *Br J Cancer*. 2007 Jan 29;96(2):183-8. doi: 10.1038/sj.bjc.6603516. Epub 2006 Dec 19. PMID: 17179991; PMCID: PMC2359987.

- Füllgrabe J, Kavanagh E, Joseph B. Histone onco-modifications. *Oncogene*. 2011 Aug 4;30(31):3391-403. doi: 10.1038/onc.2011.121. Epub 2011 Apr 25. PMID: 21516126.
- Gao C, Chen L, Tang SB, Long QY, He JL, Zhang NA, Shu HB, Chen ZX, Wu M, Li LY. The epigenetic landscapes of histone modifications on HSV-1 genome in human THP-1 cells. *Antiviral Res*. 2020 Apr;176:104730. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104730. Epub 2020 Jan 31. PMID: 32014498.
- Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, Mansour M, Vincent I, Gissmann L, Iftner T, Sideri M, Stubenrauch F, Tommasino M (2007) TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol* 178:3186–3197.
- Hensel KO, Cantner F, Bangert F, Wirth S, Postberg J. Episomal HBV persistence within transcribed host nuclear chromatin compartments involves HBx. *Epigenetics Chromatin*. 2018 Jun. 22;11(1):34. doi: 10.1186/s13072-018-0204-2. PMID: 29933745; PMCID: PMC6015472.
- Herbein G, Wendling D. Histone deacetylases in viral infections. *Clin Epigenetics*. 2010 Sep;1(1-2):13-24. doi: 10.1007/s13148-010-0003-5. Epub 2010 May 30. PMID: 22704086; PMCID: PMC3365363.
- Hu, K., Babapoor-Farrokhran, S., Rodrigues, M., Deshpande, M., Puchner, B., Kashiwabuchi, F., Hassan, S. J., Asnaghi, L., Handa, J. T., Merbs, S., Eberhart, C. G., Semenza, G. L., Montaner, S., & Sodhi, A. (2016). Hypoxia-inducible factor 1 upregulation of both VEGF and ANGPTL4 is required to promote the angiogenic phenotype in uveal melanoma. *Oncotarget*, 7(7),7816–7828.
- Huang KC, Yang J, Ng MC, Ng SK, Welch WR, Muto MG, Berkowitz RS, Ng SW. Cyclin A1 expression and paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Eur J Cancer*. 2016 Nov;67:152-163. doi: 10.1016/j.ejca.2016.08.007. Epub 2016 Sep 24. PMID: 27669502; PMCID: PMC5080661.
- Huang KC, Yang J, Ng MC, Ng SK, Welch WR, Muto MG, Berkowitz RS, Ng SW. Cyclin A1 expression and paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Eur J Cancer*. 2016 Nov;67:152-163. doi: 10.1016/j.ejca.2016.08.007. Epub 2016 Sep 24. PMID: 27669502; PMCID: PMC5080661.
- Jang MK, Kwon D, McBride AA. Papillomavirus E2 proteins and the host BRD4 protein associate with transcriptionally active cellular chromatin. *J Virol*. 2009 Mar;83(6):2592-600. doi: 10.1128/JVI.02275-08. Epub 2009 Jan 7. PMID: 19129460; PMCID: PMC2648287.
- Ji H, Zhou Y, Zhuang X, Zhu Y, Wu Z, Lu Y, Li S, Zeng Y, Lu QR, Huo Y, Shi Y, Bu H. HDAC3 Deficiency Promotes Liver Cancer through a Defect in H3K9ac/H3K9me3 Transition. *Cancer Res*. 2019 Jul 15;79(14):3676-3688. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-

18-3767. Epub 2019 May 16. Erratum in: *Cancer Res.* 2020 Feb 15;80(4):923. PMID: 31097476; PMCID: PMC6679938

Jiao F, Hu H, Yuan C, Jin Z, Guo Z, Wang L, Wang L. Histone deacetylase 3 promotes pancreatic cancer cell proliferation, invasion and increases drug-resistance through histone modification of P27, P53 and Bax. *Int J Oncol.* 2014 Oct;45(4):1523-30. doi: 10.3892/ijo.2014.2568. Epub 2014 Jul 29. PMID: 25070540.

Johung K, Goodwin EC, DiMaio D. Human papillomavirus E7 repression in cervical carcinoma cells initiates a transcriptional cascade driven by the retinoblastoma family, resulting in senescence. *Journal of Virology.* 2007; 81:2102–2116. [PubMed: 1718268

Kahn J.A.(2009) HPV Vaccination for the Prevention of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *The New England Journal of Medicine;* 361(3), 271 – 278.

Kang SD, Chatterjee S, Alam S, Salzberg AC, Milici J, van der Burg SH, Meyers C. Effect of Productive Human Papillomavirus 16 Infection on Global Gene Expression in Cervical Epithelium. *J Virol.* 2018 Sep 26;92(20):e01261-18. doi: 10.1128/JVI.01261-18. PMID: 30045992; PMCID: PMC6158420.

Knipe, D. M., Lieberman, P. M., Jung, J. U., McBride, A. A., Morris, K. V., Ott, M., Margolis, D., Nieto, A., Nevels, M., Parks, R. J., & Kristie, T. M. (2013). Snapshots: chromatin control of viral infection. *Virology*, 435(1), 141–156. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.023>

Kratz A, Arner E, Saito R, Kubosaki A, Kawai J, Suzuki H, Carninci P, Arakawa T, Tomita M, Hayashizaki Y, Daub CO. Core promoter structure and genomic context reflect histone 3 lysine 9 acetylation patterns. *BMC Genomics.* 2010 Apr 21;11:257. doi: 10.1186/1471-2164-11-257. PMID: 20409305; PMCID: PMC2867832.

Krishnan V, Zeichner SL. Host cell gene expression during human immunodeficiency virus type 1 latency and reactivation and effects of targeting genes that are differentially expressed in viral latency. *J Virol.* 2004 Sep;78(17):9458-73. doi: 10.1128/JVI.78.17.9458-9473.2004. PMID: 15308739; PMCID: PMC506933.

Krump NA, You J. Molecular mechanisms of viral oncogenesis in humans. *Nat Rev Microbiol.* 2018 Nov;16(11):684-698. doi: 10.1038/s41579-018-0064-6. PMID: 30143749; PMCID: PMC6336458.

Kuss-Duerkop SK, Westrich JA, Pyeon D. DNA Tumor Virus Regulation of Host DNA Methylation and Its Implications for Immune Evasion and Oncogenesis. *Viruses.* 2018 Feb 13;10(2):82. doi: 10.3390/v10020082. PMID: 29438328; PMCID: PMC5850389.

Lee D, Sohn H, Kalpana GV, Choe J. Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature.* 1999 Jun 3;399(6735):487-91. doi: 10.1038/20966. PMID: 10365963.

- Lieberman PM. Chromatin organization and virus gene expression. *J Cell Physiol.* 2008 Aug;216(2):295-302. doi: 10.1002/jcp.21421. PMID: 18314879; PMCID: PMC3311874.
- Liu BL, Cheng JX, Zhang X, Wang R, Zhang W, Lin H et al. (2010). Global histone modification patterns as prognostic markers to classify glioma patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19: 2888–2896.
- Luo GG, Ou JH. Oncogenic viruses and cancer. *Virol Sin.* 2015 Apr;30(2):83-4. doi: 10.1007/s12250-015-3599-y. PMID: 25924992; PMCID: PMC4731227.
- Lu, F., Tsai, K., Chen, H. S., Wikramasinghe, P., Davuluri, R. V., Showe, L., Domsic, J., Marmorstein, R., & Lieberman, P. M. (2012). Identification of host-chromosome binding sites and candidate gene targets for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA. *Journal of virology*, 86(10), 5752–5762. <https://doi.org/10.1128/JVI.07216-11>
- Maeshima K, Imai R, Tamura S, Nozaki T. Chromatin as dynamic 10-nm fibers. *Chromosoma.* 2014 Jun;123(3):225-37. doi: 10.1007/s00412-014-0460-2. Epub 2014 Apr 16. PMID: 24737122; PMCID: PMC4031381.
- McBride AA. The papillomavirus E2 proteins. *Virology.* 2013 Oct;445(1-2):57-79. doi: 10.1016/j.virol.2013.06.006. Epub 2013 Jul 10.
- Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe.* 2014 Mar 12;15(3):266-82. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.011. PMID: 24629334; PMCID: PMC3992243.
- Milavetz, B. I., & Balakrishnan, L. (2015). Viral epigenetics. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1238, 569–596. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_30)
- Mirzaei H, Ghorbani S, Khanizadeh S, Namdari H, Faghihloo E, Akbari A. Histone deacetylases in virus-associated cancers. *Rev Med Virol.* 2020 Jan;30(1):e2085. doi: 10.1002/rmv.2085. Epub 2019 Nov 19. PMID: 31743548.
- Moquin SA, Thomas S, Whalen S, Warburton A, Fernandez SG, McBride AA, Pollard KS, Miranda JL. The Epstein-Barr Virus Episome Maneuvers between Nuclear Chromatin Compartments during Reactivation. *J Virol.* 2018 Jan 17;92(3):e01413-17. doi: 10.1128/JVI.01413-17. PMID: 29142137; PMCID: PMC5774889.
- Mullican SE, Gaddis CA, Alenghat T, Nair MG, Giacomini PR, Everett LJ, Feng D, Steger DJ, Schug J, Artis D, Lazar MA. Histone deacetylase 3 is an epigenomic brake in macrophage alternative activation. *Genes Dev.* 2011 Dec 1;25(23):2480-8. doi: 10.1101/gad.175950.111. PMID: 22156208; PMCID: PMC3243058.
- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006 Feb 15;69(3):562-73. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002. Epub 2006 Jan 5. PMID: 16405877.

- Nakahara T, Tanaka K, Ohno S, Egawa N, Yugawa T, Kiyono T. Activation of NF- $\kappa$ B by human papillomavirus 16 E1 limits E1-dependent viral replication through degradation of E1. *J Virol.* 2015 May;89(9):5040-59. doi: 10.1128/JVI.00389-15. Epub 2015 Feb 25. PMID: 25717108; PMCID: PMC4403482.
- Placek BJ, Huang J, Kent JR, Dorsey J, Rice L, Fraser NW, Berger SL. The histone variant H3.3 regulates gene expression during lytic infection with herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 2009 Feb;83(3):1416-21. doi: 10.1128/JVI.01276-08. Epub 2008 Nov 12. PMID: 19004946; PMCID: PMC2620911.
- Poreba E, Broniarczyk JK, Gozdzicka-Jozefiak A. Epigenetic mechanisms in virus-induced tumorigenesis. *Clin Epigenetics.* 2011 Aug;2(2):233-47. doi: 10.1007/s13148-011-0026-6. Epub 2011 Mar 23. PMID: 22704339; PMCID: PMC3365383.
- Price AM, Tourigny JP, Forte E, Salinas RE, Dave SS, Luftig MA. Analysis of Epstein-Barr virus-regulated host gene expression changes through primary B-cell outgrowth reveals delayed kinetics of latent membrane protein 1-mediated NF- $\kappa$ B activation. *J Virol.* 2012 Oct;86(20):11096-106. doi: 10.1128/JVI.01069-12. Epub 2012 Aug 1. PMID: 22855490; PMCID: PMC3457162.
- Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog.* 2009 Feb;5(2):e1000318. doi: 10.1371/journal.ppat.1000318. Epub 2009 Feb 27. PMID: 19247434; PMCID: PMC2642596.
- Raff AB, Woodham AW, Raff LM, Skeate JG, Yan L, Da Silva DM, Schelhaas M, Kast WM. The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *J Virol.* 2013 Jun;87(11):6062-72. doi: 10.1128/JVI.00330-13. Epub 2013 Mar 27. PMID: 23536685; PMCID: PMC3648114.
- Ramírez-Salazar E, Centeno F, Nieto K, Valencia-Hernández A, Salcedo M, Garrido E. HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. *Virology J.* 2011 May 20;8:247. doi: 10.1186/1743-422X-8-247. PMID: 21599968; PMCID: PMC3127837.
- Ramírez-Salazar E, Centeno F, Nieto K, Valencia-Hernández A, Salcedo M, Garrido E. HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. *Virology J.* 2011 May 20;8:247. doi: 10.1186/1743-422X-8-247. PMID: 21599968; PMCID: PMC3127837.
- Reeves MB, Sinclair JH. Analysis of latent viral gene expression in natural and experimental latency models of human cytomegalovirus and its correlation with histone modifications at a latent promoter. *J Gen Virol.* 2010 Mar;91(Pt 3):599-604. doi: 10.1099/vir.0.015602-0. Epub 2009 Nov 11. PMID: 19906945.
- Reinson T, Toots M, Kadaja M, Pipitch R, Allik M, Ustav E, Ustav M. Engagement of the ATR-dependent DNA damage response at the human papillomavirus 18 replication

- centers during the initial amplification. *J Virol.* 2013 Jan;87(2):951-64. doi: 10.1128/JVI.01943-12. Epub 2012 Nov 7. PMID: 23135710; PMCID: PMC3554080.
- Rivas HG, Schmalings SK, Gaglia MM. Shutoff of Host Gene Expression in Influenza A Virus and Herpesviruses: Similar Mechanisms and Common Themes. *Viruses.* 2016 Apr 16;8(4):102. doi: 10.3390/v8040102. PMID: 27092522; PMCID: PMC4848596.
- Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology.* 2013 Oct;445(1-2):138-68. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.013. Epub 2013 May 31. PMID: 23731972; PMCID: PMC3783579.
- Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology.* 2013 Oct;445(1-2):138-68. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.013. Epub 2013 May 31. PMID: 23731972; PMCID: PMC3783579.
- Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* 1998 Jul 1;12(13):2061-72. doi: 10.1101/gad.12.13.2061. PMID: 9649509; PMCID: PMC316980.
- Sakakibara N, Mitra R, McBride AA. The papillomavirus E1 helicase activates a cellular DNA damage response in viral replication foci. *J Virol.* 2011 Sep;85(17):8981-95. doi: 10.1128/JVI.00541-11. Epub 2011 Jul 6. PMID: 21734054; PMCID: PMC3165833.
- Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. Version 2. *Curr Opin Virol.* 2011 Dec;1(6):519-25. doi: 10.1016/j.coviro.2011.10.008. PMID: 22328912; PMCID: PMC3274382.
- Schoggins JW. Recent advances in antiviral interferon-stimulated gene biology. *F1000Res.* 2018 Mar 12;7:309. doi: 10.12688/f1000research.12450.1. PMID: 29568506; PMCID: PMC5850085.
- Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.*3, 1101–1108 (2008)
- Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Apr 1;6(4):a018713. doi: 10.1101/cshperspect.a018713. PMID: 24691964; PMCID: PMC3970420.
- Sevik M. (2012). Oncogenic viruses and mechanisms of oncogenesis. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*36(4): 323-329.
- Shirakata Y, Komurasaki T, Toyoda H, Hanakawa Y, Yamasaki K, Tokumaru S, Sayama K, Hashimoto K. Epiregulin, a novel member of the epidermal growth factor family, is an autocrine growth factor in normal human keratinocytes. *J Biol Chem.* 2000 Feb 25;275(8):5748-53. doi: 10.1074/jbc.275.8.5748. PMID: 10681561.

- Siddiq A, Massimi P, Pim D, Banks L. Diverse Papillomavirus Types Induce Endosomal Tubulation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019 May 28;9:175. doi: 10.3389/fcimb.2019.00175. PMID: 31192164; PMCID: PMC6546808.
- Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol.* 2018 Jan;12(1):3-20. doi: 10.1002/1878-0261.12155. Epub 2017 Nov 27. PMID: 29124875; PMCID: PMC5748484.
- Smith SP, Scarpini CG, Groves IJ, Odle RI, Coleman N. Identification of host transcriptional networks showing concentration-dependent regulation by HPV16 E6 and E7 proteins in basal cervical squamous epithelial cells. *Sci Rep.* 2016 Jul 26;6:29832. doi: 10.1038/srep29832. PMID: 27457222; PMCID: PMC4960560.
- Spurling CC, Godman CA, Noonan EJ, Rasmussen TP, Rosenberg DW, Giardina C. HDAC3 overexpression and colon cancer cell proliferation and differentiation. *Mol Carcinog.* 2008 Feb;47(2):137-47. doi: 10.1002/mc.20373. PMID: 17849419.
- 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.
- Tomaić V. Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites. *Cancers (Basel).* 2016 Oct 19;8(10). pii: E95.
- Tsai K, Chan L, Gibeault R, Conn K, Dheekollu J, Domsic J, Marmorstein R, Schang LM, Lieberman PM. Reprogramación viral de la chaperona Daxx histone H3.3 durante la infección temprana por el virus de Epstein-Barr. *J Virol.* Diciembre de 2014; 88 (24): 14350-63. doi: 10.1128 / JVI.01895-14. Epub 2014 Oct 1. PMID: 25275136; PMCID: PMC4249116.
- Võsa L, Sudakov A, Remm M, Ustav M, Kurg R. Identification and analysis of papillomavirus E2 protein binding sites in the human genome. *J Virol.* 2012 Jan;86(1):348-57. doi: 10.1128/JVI.05606-11. Epub 2011 Oct 26. PMID: 22031941; PMCID: PMC3255907.
- van Slegtenhorst M, Nellist M, Nagelkerken B, Cheadle J, Snell R, van den Ouweland A, Reuser A, Sampson J, Halley D, van der Sluijs P (1998) Interaction between hamartin and tuberlin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum Mol Genet* 7:1053–1057.
- Vande Pol SB, Klingelhutz AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology.* 2013 Oct;445(1-2):115-37. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.026. Epub 2013 May 24. PMID: 23711382; PMCID: PMC3783570.
- Večeřa J, Bártová E, Krejčí J, Legartová S, Komůrková D, Rudá-Kučerová J, Štark T, Dražanová E, Kašpárek T, Šulcová A, Dekker FJ, Szymanski W, Seiser C, Weitzer G, Mechoulam R, Micale V, Kozubek S. HDAC1 and HDAC3 underlie dynamic H3K9 acetylation during embryonic neurogenesis and in schizophrenia-like animals. *J Cell*

- Physiol. 2018 Jan;233(1):530-548. doi: 10.1002/jcp.25914. Epub 2017 May 3. PMID: 28300292.
- Wang HW, Joyce JA. Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4: priming for protumoral functions. *Cell Cycle*. 2010 Dec 15;9(24):4824-35. doi: 10.4161/cc.9.24.14322. Epub 2010 Dec 15. PMID: 21150330; PMCID: PMC3047808.
- Wang JW, Roden RB. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):175-86. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.017. Epub 2013 May 17. PMID: 23689062; PMCID: PMC3770800.
- Wang, Q., Griffin, H., Southern, S., Jackson, D., Martin, A., McIntosh, P. Doorbar, J. (2004). Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1=E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *Journal of virology*, 78(2), 821–833. doi:10.1128/jvi.78.2.821-833.2004
- Yang R, Klimentová J, Göckel-Krzikalla E, Ly R, Gmelin N, Hotz-Wagenblatt A, Řehulková H, Stulík J, Rösl F, Niebler M. Combined Transcriptome and Proteome Analysis of Immortalized Human Keratinocytes Expressing Human Papillomavirus 16 (HPV16) Oncogenes Reveals Novel Key Factors and Networks in HPV-Induced Carcinogenesis. *mSphere*. 2019 Mar 27;4(2):e00129-19. doi: 10.1128/mSphere.00129-19. PMID: 30918060; PMCID: PMC6437273.
- Yang R, Müller C, Huynh V, Fung YK, Yee AS, Koeffler HP. Functions of cyclin A1 in the cell cycle and its interactions with transcription factor E2F-1 and the Rb family of proteins. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar;19 (3):2400-7. doi: 10.1128/mcb.19.3.2400. PMID: 10022926; PMCID: PMC84032.
- Yang R, Müller C, Huynh V, Fung YK, Yee AS, Koeffler HP. Functions of cyclin A1 in the cell cycle and its interactions with transcription factor E2F-1 and the Rb family of proteins. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar;19(3):2400-7. doi: 10.1128/mcb.19.3.2400. PMID: 10022926; PMCID: PMC84032.
- Yotsumoto F, Tokunaga E, Oki E, Maehara Y, Yamada H, Nakajima K, Nam SO, Miyata K, Koyanagi M, Doi K, Shirasawa S, Kuroki M, Miyamoto S. Molecular hierarchy of heparin-binding EGF-like growth factor-regulated angiogenesis in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Res*. 2013 May;11(5):506-17. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0428. Epub 2013 Feb 26. PMID: 23443317.
- Zhao, Y., & Bruemmer, D. (2010). NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(8), 1535–1541. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.191163>
- Zhen L, Gui-lan L, Ping Y, Jin H, Ya-li W. (2010). The expression of H3K9Ac, H3K14Ac, and H4K20TriMe in epithelial ovarian tumors and the clinical significance. *Int J Gynecol Cancer* 20: 82–86.

Zhu B, Yang JR, Jia Y, Zhang P, Shen L, Li XL, Li J, Wang B. Overexpression of NR4A1 is associated with tumor recurrence and poor survival in non-small-cell lung carcinoma. *Oncotarget*. 2017 Dec 8;8(69):113977-113986. doi: 10.18632/oncotarget.23048. PMID: 29371962; PMCID: PMC5768379.

Zhu B, Yang JR, Jia Y, Zhang P, Shen L, Li XL, Li J, Wang B. Overexpression of NR4A1 is associated with tumor recurrence and poor survival in non-small-cell lung carcinoma. *Oncotarget*. 2017 Dec 8;8(69):113977-113986. doi: 10.18632/oncotarget.23048. PMID: 29371962; PMCID: PMC5768379.

Zhu H, Cong JP, Mamtora G, Gingeras T, Shenk T. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 24;95(24):14470-5. doi: 10.1073/pnas.95.24.14470. PMID: 9826724; PMCID: PMC24397.

Zuniga EI, Macal M, Lewis GM, Harker JA. Innate and Adaptive Immune Regulation During Chronic Viral Infections. *Annu Rev Virol*. 2015 Nov;2(1):573-97.

## 12. Anexos.

### Artículos publicados

1. de la Cruz-López KG, **Castro-Muñoz LJ**, Reyes-Hernández DO, García-Carrancá A, Manzo-Merino J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Front Oncol*. 2019;9:1143. Published 2019 Nov 1. doi:10.3389/fonc.2019.01143.
2. Ayala-Díaz, S., Jiménez-Lima, R., Ramírez-Alcántara, K. M., Lizano, M., **Castro-Muñoz, L. J.**, Reyes-Hernández, D. O., Arroyo-Ledezma, J., & Manzo-Merino, J. Presence of Papillomavirus DNA sequences in the canine transmissible venereal tumor (CTVT). *PeerJ*. 2019;7:e7962. Published 2019 Oct 25. doi:10.7717/peerj.7962.
3. **Castro-Muñoz LJ**, Manzo-Merino J, Muñoz-Bello JO, et al. The Human Papillomavirus (HPV) E1 protein regulates the expression of cellular genes involved in immune response. *Sci Rep*. 2019;9(1):13620. Published 2019 Sep 20. doi:10.1038/s41598-019-49886-4.
4. Manzo-Merino, J., Lagunas-Martínez, A., Contreras-Ochoa, C. O., Lizano, M., **Castro-Muñoz, L.J.**, Calderón-Corona, C., Torres-Poveda, K., Román-Gonzalez, A., Hernández-Pando, R., Bahena-Román, M., & Madrid-Marina, V. The Human Papillomavirus (HPV) E6 Oncoprotein Regulates CD40 Expression via the AT-Hook Transcription Factor AKNA. *Cancers (Basel)*. 2018;10(12):521. Published 2018 Dec 17. doi:10.3390/cancers10120521.
5. Muñoz-Bello JO, Olmedo-Nieva L, **Castro-Muñoz LJ**, et al. HPV-18 E6 Oncoprotein and Its Spliced Isoform E6\*I Regulate the Wnt/ $\beta$ -Catenin Cell Signaling Pathway through the TCF-4 Transcriptional Factor. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10):3153. Published 2018 Oct 13. doi:10.3390/ijms19103153.
6. **Castro-Muñoz LJ** y Lizano M. Nuevos mecanismos del VPH en la evasión de la respuesta inmune y en la carcinogénesis. *Gaceta Biomédicas*. Julio, 2020. 25(7). ISSN 1607-6788.

OPEN

# The Human Papillomavirus (HPV) E1 protein regulates the expression of cellular genes involved in immune response

Leonardo Josué Castro-Muñoz<sup>1,2</sup>, Joaquín Manzo-Merino<sup>2,3</sup>, J. Omar Muñoz-Bello<sup>1,2</sup>, Leslie Olmedo-Nieva<sup>2</sup>, Alberto Cedro-Tanda<sup>1,4</sup>, Luis Alberto Alfaro-Ruiz<sup>4</sup>, Alfredo Hidalgo-Miranda<sup>1,4</sup>, Vicente Madrid-Marina<sup>5</sup> & Marcela Lizano<sup>1,2,6</sup>

The Human Papillomavirus (HPV) E1 protein is the only viral protein with enzymatic activity. The main known function of this protein is the regulation of the viral DNA replication. Nevertheless, it has been demonstrated that the ablation of HPV18 E1 mRNA in HeLa cells promotes a deregulation of several genes, particularly those involved in host defense mechanisms against viral infections; however, the specific contribution of E1 protein in HPV-independent context has not been studied. The aim of this work was to determine the effect of the HPV E1 protein in the regulation of cellular gene expression profiles evaluated through RNA-seq. We found that E1 proteins from HPV16 and 18 induced an overexpression of different set of genes associated with proliferation and differentiation processes, as well as downregulation of immune response genes, including IFN $\beta$ 1 and IFN $\lambda$ 1 and Interferon-stimulated gene (ISG), which are important components involved in the antiviral immune response. Together, our results indicate that HR-(High-Risk) and LR-(Low-Risk) HPV E1 proteins play an important role in inhibiting the anti-viral immune response.

Infection with Human Papillomavirus (HPV) is the most frequent sexually transmitted disease worldwide, affecting more than a half of the sexually active population<sup>1</sup>. To date, close to 300 types of HPV have been identified based on their genomic sequences and approximately 40 of those types are able to infect the anogenital region<sup>2</sup>. HPVs are classified into high and low risk according to their oncogenic potential. Low-risk HPVs (LR-HPV) are associated with the development of genital warts, respiratory papillomatosis and low-grade cervical lesions, being the HPV6 and 11 the most prevalent types in such diseases<sup>3</sup>. High-risk HPVs (HR-HPV) are associated with the development of different types of anogenital cancers such as cervix, vulva, vagina, penis and anus, where HPV 16 and 18 types are the most prevalent in cervical cancer, accounting for almost 70% of the cases. In addition, HR-HPVs have been associated with a subset of head and neck cancers, mainly with oropharyngeal cancer<sup>4,5</sup>.

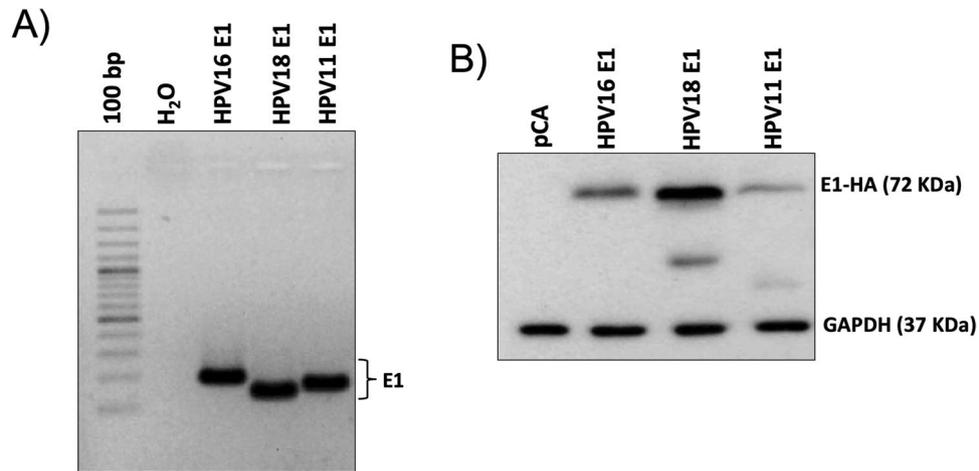
The HPV genome contains an early expressed region containing the ORF (Open reading frames) of E1 to E7 genes which are necessary for viral replication and transcriptional regulation<sup>6</sup>. The E6, E7 and E5 proteins are able to interact with many cell targets, promoting cellular transformation<sup>7,8</sup>. The E1 protein is encoded within the early expressed region and it is localized in nuclear and cytoplasmic fractions. This protein is highly conserved among different HPV types and is the unique HPV protein with enzymatic activity<sup>9</sup>. The aminoacidic sequence

<sup>1</sup>Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar S/N, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, 04500, Mexico City, Mexico. <sup>2</sup>Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, México/Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, Tlalpan, 14080, Mexico City, Mexico. <sup>3</sup>Cátedras CONACyT-Instituto Nacional de Cancerología, San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, Tlalpan, México City, Mexico. <sup>4</sup>Laboratorio de Genómica del Cáncer, Instituto Nacional de Medicina Genómica, México City, Mexico. <sup>5</sup>Dirección de Infecciones Crónicas y Cáncer. Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI), Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad 655, Santa María Ahuacatlán, Cuernavaca, Morelos, 62100, Mexico. <sup>6</sup>Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Ciudad de México, Mexico. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.L. (email: [lizanosoberon@gmail.com](mailto:lizanosoberon@gmail.com))

Received: 1 March 2019

Accepted: 29 August 2019

Published online: 20 September 2019



**Figure 1.** HA-HPV E1 expression in HaCaT cells. (A) HPV16, 18 and 11 E1 mRNA expression. HaCaT cells transfected with the pCA control vector and the HPV E1 expressing plasmids were collected 24 h after transfection. Then RNA was extracted, cDNA synthesized, and PCR performed to evaluate E1 mRNA expression. Amplification of a fragment of the E1 mRNA indicates that all three plasmids were successfully expressed in HaCaT cells. (B) HA-tagged HPV E1 protein expression. HaCaT transfected cells were collected and protein expression ascertained by western blot using anti-HA antibody. HPV16, 18 and 11 E1 HA tagged proteins were detected at 72 KDa. Additional bands are part of the E1 protein processing. Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control (37 KDa).

of the E1 protein has been divided into three functional domains: the N-terminal domain, that contains a nuclear localization (NLS) and a nuclear export signal (NES); the central portion that harbors a DNA binding domain (DBD) and recognizes the replication origin within the LCR; and finally, the C-terminal domain, which has helicase/ATPase activity, as well as sequences involved in protein oligomerization<sup>9,10</sup>. The main function attributed to the E1 protein is its participation in viral DNA replication<sup>11</sup>. Viral genome replication depends on the ability of E1 to interact with several cellular proteins of the replication machinery such as  $\alpha$ -DNA polymerase, replication A proteins (RPA), topoisomerases I and II, nuclear proliferation cell antigen (PCNA) and the replication factor C (RFC)<sup>9</sup>. However, it has been shown that E1 also interacts with other cellular elements independently of their function in viral replication, mainly with those that regulate epigenetic processes, such as histone H1 and Ini1/hSNF5 which is a subunit of the chromatin remodeling complex SWI/SNF, favoring the viral replication<sup>12,13</sup>.

Previous studies identified the presence of the HPV18 E1 protein in HeLa cells<sup>14</sup>. Afterwards, it was demonstrated that knocking down the expression of E1 by siRNAs, de-regulates gene expression, particularly four sets of genes involved in host defense mechanisms against viral infections including TLR signaling, interferon signaling, antiviral interferon stimulated genes (ISG) and apoptosis signalling<sup>15</sup>. Therefore, the aim of this study was to further analyze if E1 proteins from low and high-risk HPVs affect gene expression profiles. RNA-seq analysis showed that E1 proteins from HPV16, 18 and 11 differentially regulate gene expression profiles. Particularly, E1 from these three viral types down-regulated genes associated with the immune response. In addition, all E1 proteins were able to inhibit the expression of IFN $\beta$ 1 and IFN $\lambda$ 1, two key components in the antiviral immune response. Our results suggest that E1 proteins regulate immune response gene expression which is shared among high- and low-risk HPV types.

## Results

**HPV E1 proteins regulate cellular gene expression.** In order to analyze the effect of HPV E1 from low and high-risk HPVs on cellular gene expression profiles, an RNA-Seq analysis was performed from HaCaT cells expressing the HPV E1 proteins from three viral types. E1 expression from HPV tested types was evaluated 24 h post-transfection by RT-PCR and western blot as shown in Fig. 1A,B, respectively. Western blot analysis detected the E1 protein at approximately 72 KDa as well as other bands produced by the E1 cleavage according to the reported by Moody *et al.*<sup>16</sup>. Complete blot of the membrane is displayed in Supplementary Fig. 1.

Once E1 expression was confirmed, RNA-Seq was carried out using RNA coming from HaCaT cells transfected with the different HPV E1 expressing plasmids, as well as the pCA vector. Data analysis was performed considering a  $p$ -value of  $\leq 0.05$  as significant. Based on the log 2-fold change values, we found that HPV16 E1 up-regulates 199 genes and down-regulates 103 genes while HPV18 E1 up-regulates 45 genes and down-regulates 41, and HPV11 E1 up-regulates 34 genes and down-regulates 38 (Additional files 1, 2 and 3). When analyzing the cellular process affected by the E1 deregulated genes, we found that HPV E1 affects genes involved mainly in immune response as well as viral genome regulation (Table 1). These results indicate that the E1 protein from both, high and low risk HPVs have an effect on different cellular processes but mainly associated with immune response.

To further dissect the effect of E1 on the expression of cellular genes, a second analysis was made to considering only the genes that were significant based on the adjusted  $p$ -value ( $p$ -adj) of  $\leq 0.05$ . The results

HPV16 E1		HPV18 E1		HPV11 E1	
Cellular process	% terms per group	Cellular process	% terms per group	Cellular process	% terms per group
Regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	27.78%**	Endothelial cell chemotaxis	29.95%**	Regulation of MHC class I biosynthetic process	31.82%**
Formation of primary germ layer	16.67%**	Negative regulation of viral genome replication	18.42%**	Melanosome localization	27.73%**
Cellular response to vascular endothelial growth factor stimulus	16.67%**	Negative regulation of viral genome transcription	15.79%**	MDA-5 signaling pathway	13.64%**
Negative regulation of viral genome replication	16.67%**	Positive regulation of epidermal cell differentiation	13.16%**	Regulation of natural killer cell chemotaxis	11.36%*
Defense response to virus	5.56%**	Regulation of toll-like receptor 9 signaling pathway	7.89%**	Viral genome replication	11.36%**
Cellular response to interferon-gamma	5.56%**	Monocyte differentiation	5.26%**	Type I interferon signaling pathway	4.55%**
Cytokine-mediated signaling pathway	5.56%**	MDA-5 signaling pathway	5.26%**	Pharyngeal system development	2.27%*
Regulation of bone mineralization	5.56%**	Cellular response to corticotropin-releasing hormone stimulus	2.63%**	Bile acid and bile salt transport	2.27%*
		Response to corticosterone	2.63%**		

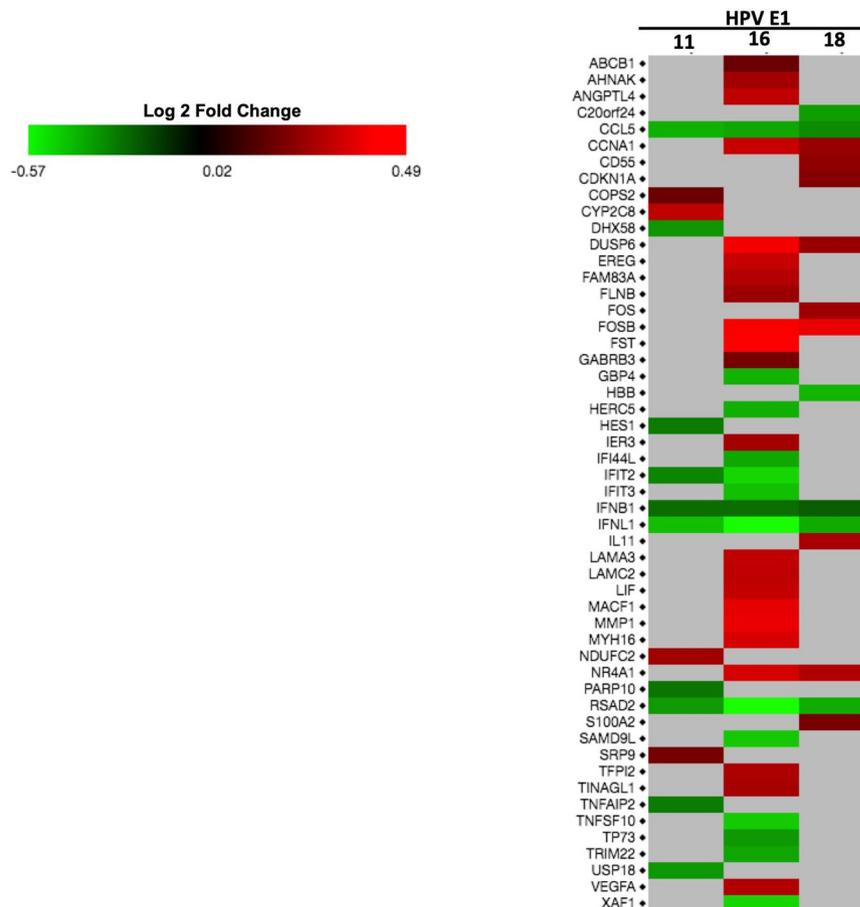
**Table 1.** Cellular processes affected by the deregulated genes induced by HPV E1 proteins. p-value  $\leq 0.05$ .

	Number of genes p-adj	Genes
HPV16 E1	36	<i>FST, FOSB, DUSP6, MMP1, MACF1, MYH16, NR4A1, CCNA1, EREG, LIF, LAMA3, ANGPTL4, LAMC2, FAM83A, VEGFA, TPPI2, TINAGL1, AHNAK, IER3, FLNB, GABRB3, ABCB1, IFNB1, TP73, TRIM22, IFI44L, CCL5, HERC5, GBP4, IFIT3, SAMD9L, TNFSF10, XAF1, IFIT2, IFNL1, RSAD2</i>
HPV18 E1	15	<i>FOSB, NR4A1, IL11, DUSP6, FOS, CCNA1, CD55, CDKN1A, S100A2, IFNB1, CCL5, C20orf24, IFNL1, RSAD2, HBB</i>
HPV11 E1	14	<i>CYP2C8, NDUFC2, SRP9, COPS2, IFNB1, PARP10, HES1, TNFAIP2, IFIT2, DHX58, USP18, RSAD2, CCL5, IFNL1</i>

**Table 2.** Differentially expressed genes by HPV E1 proteins. Cellular genes with differential expression detected by RNA-Seq from 24 h post-transfected HaCaT cells. Adjusted p-value  $\leq 0.05$ .

indicated that HPV16 E1 modulates 36 genes; while 15 and 14 genes were regulated by E1 HPV18 and HPV 11, respectively (Table 2). Based on the log 2-fold change values, we found that HPV16 E1 up-regulates 22 genes and down-regulates 14 genes, HPV18 E1 up-regulates 9 genes and down-regulates 6 genes; and HPV11 E1 up-regulates 4 genes and down-regulates 10 genes (Fig. 2). To analyze the cellular processes in which genes affected by E1 are involved, a Gene Ontology analysis (ClueGO) was performed. Supporting the previous results, our data revealed that HPV16 E1 up-regulated genes that participate in immune response, cell-substrate junction assembly and cell proliferation (Fig. 3A,C). Moreover, HPV16 E1 down-regulated genes involved in immune response processes such as response to type I interferon and regulation of type 2 immune response (Fig. 3B,D). Meanwhile, Gene Ontology analysis revealed that genes up-regulated by HPV18 E1 are involved in response to mineralocorticoid and corticosterone (Fig. 4A,C), whilst down-regulated genes are related to processes associated with regulation of type 2 immune response (Fig. 4B,D). Finally, when analyzing genes de-regulated by the HPV11 E1 protein, no cellular processes were associated to the up-regulated genes, probably because of the small number of genes (four genes) compared to those up-regulated by the high-risk HPVs. In contrast, the ClueGO program showed that down-regulated genes by HPV11 E1 are involved in processes such as the negative regulation of viral genome replication, tyrosine phosphorylation of the STAT protein, type I interferon signaling pathway and regulation of type 2 immune response (Fig. 5A,B).

**The E1 proteins from low- and high-risk HPVs regulate sets of genes in common.** We determined whether genes altered by E1 proteins are shared among the different HPV types evaluated. Venn diagram, from the obtained data shows that HPV16 and HPV18 E1 proteins deregulated four shared genes: *FOSB, DUSP6, NR4A* and *CCA1* (Fig. 6A). The expression of *FOSB* was verified by qRT-PCR (Fig. 6B), finding increased mRNA levels in the presence of E1 from HR-HPVs compared to the pCA expressing cells ( $p < 0.001$ ).



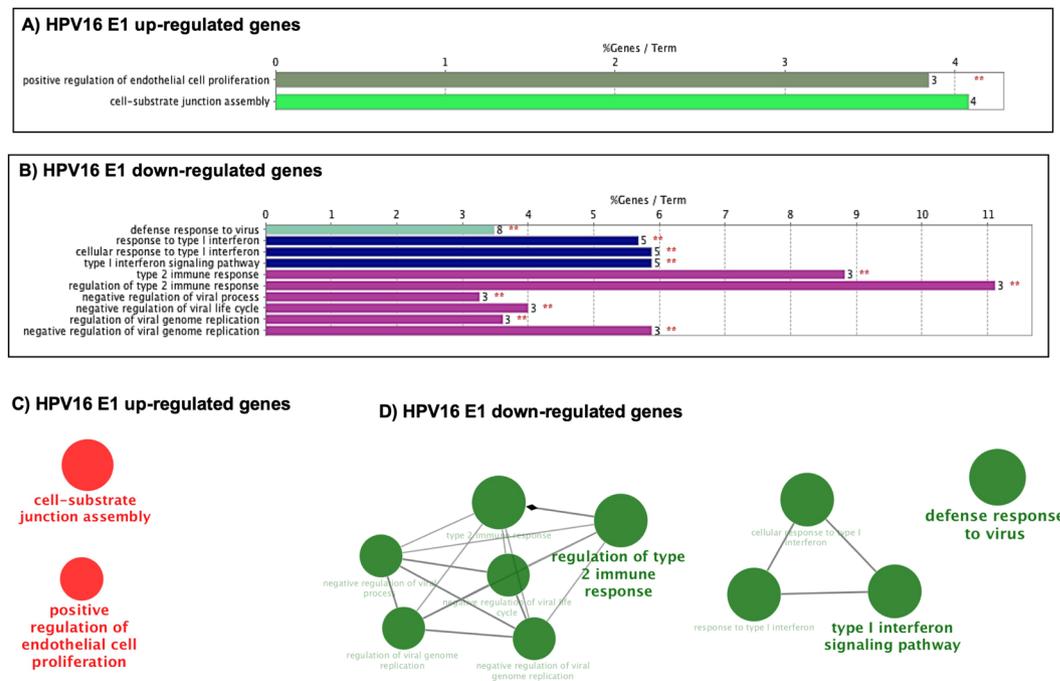
**Figure 2.** Genes differentially regulated by HPV E1 proteins. Heatmap showing genes differentially expressed in presence of HPV16, 18 and 11 E1 proteins based on the p-adj value ( $\leq 0.05$ ). The scale of Log 2-fold change indicates the expression level of the genes. Red indicates overexpressed genes (expression levels over the median), green indicates under-expressed genes (expression levels under the median; see legend), and grey indicates unchanged genes.

HPV16 and HPV11 types shared only one gene (*IFIT2*). It was also found that E1 from HPV18 and HPV11 do not share de-regulated genes. Interestingly, four immune response genes are deregulated by the three HPV types (*IFNB1*, *IFNL1*, *CCL5* or *RANTES*, and *RSAD2* or *Viperin*) (Fig. 6A). This suggests that the HPV E1 proteins might have a high impact on the expression of genes associated with the immune response. In addition, it shows that this effect is shared between high and low risk HPVs.

**E1 proteins from HPV16, 18 and 11 decrease IFN $\beta$ 1 and IFN $\lambda$ 1 expression.** As it was shown, HPV E1 proteins induced a down-regulation in the expression of four genes involved in immune response (*CCL5*, *RSAD2*, *IFNB1* and *IFNL1*). Due to their important role in the viral innate immune response<sup>17</sup>, both IFN $\beta$ 1 and IFN $\lambda$ 1, were selected to perform further analyses. IFN $\beta$ 1 and IFN $\lambda$ 1 promote the expression of ISG genes that help to control infectious processes allowing an efficient antiviral immune response<sup>18</sup>. Expression of IFN $\beta$ 1 and IFN $\lambda$ 1 was validated through qPCR assays in HaCaT cells expressing the different E1 proteins. Interestingly, E1 viral proteins decreased IFN $\beta$ 1 (Fig. 7A) and IFN $\lambda$ 1 (Fig. 7B) mRNA levels compared to the control vector ( $p < 0.001$ ). Since the all three HPV types affected the expression of ISGs, we next tested the mRNA levels of *CCL5* and *RSAD2* (*viperin*) finding a significant decrease in presence of the three E1 proteins compared to pCA expressing cells ( $p < 0.001$ ) (Fig. 8). Additionally, the mRNA levels of *IFIT2*, the only gene shared between HPV16 and HPV11 types, were significantly diminished ( $p < 0.001$ ) by both E1 proteins (Fig. 8).

Since HPV E1 proteins inhibit the expression of IFN, we wonder if E1 could interfere with the production of IFN after stimulating with an inducer of IFN $\beta$ . Poly I:C is a synthetic analog of viral dsRNA and it is a well-established inducer of the IFN $\beta$  production<sup>19,20</sup>. Increasing amounts of Poly I:C were transfected (0.01, 0.1, 1 and 3  $\mu$ g) in order to induce IFN $\beta$  expression in HaCaT cells. At 24h post-transfection, total RNA was extracted and levels of IFN $\beta$ 1 mRNA were evaluated by qPCR. Results indicate that IFN $\beta$ 1 expression significantly increases in cells transfected from 0.01 to 3  $\mu$ g of Poly I:C (Fig. 9A) ( $p < 0.0001$ ).

A previous report showed that 0.1  $\mu$ g of Poly I:C was effective for stimulation and those amounts did not affect the viability of HaCaT cells at 24 hours<sup>21</sup>; therefore, 0.1  $\mu$ g was selected to perform subsequent experiments. To determine whether E1 interferes with IFN $\beta$ 1 expression during Poly I:C treatment, HaCaT cells were co-transfected with 0.1  $\mu$ g of Poly I:C and 4  $\mu$ g of each HPV E1-expressing plasmid or the control plasmid. After



**Figure 3.** Immune response, cell-substrate junction assembly and cell proliferation networks are altered by the HPV16 E1 protein. HPV16 E1 significantly regulated genes were analyzed by ClueGO. (A) Gene ontology (GO) pathway terms obtained for up-regulated genes. (B) GO pathway terms obtained for down-regulated genes. The number of associated genes is depicted on the right of each bar and above is presented the percentage of altered genes. Significance ( $p \leq 0.05$ ) is represented by red asterisks. Clustered networks for up-regulated genes (Red color) (C) and downregulated genes (Green color) (D) in presence of HPV-16 E1 protein. The major term per group is displayed. Node size exposes the degree of enrichment. Organic layout algorithm introduced in Cytoscape supplied the obtained networks. Genes showing Padj changes with a significance of  $p < 0.05$  were analyzed.

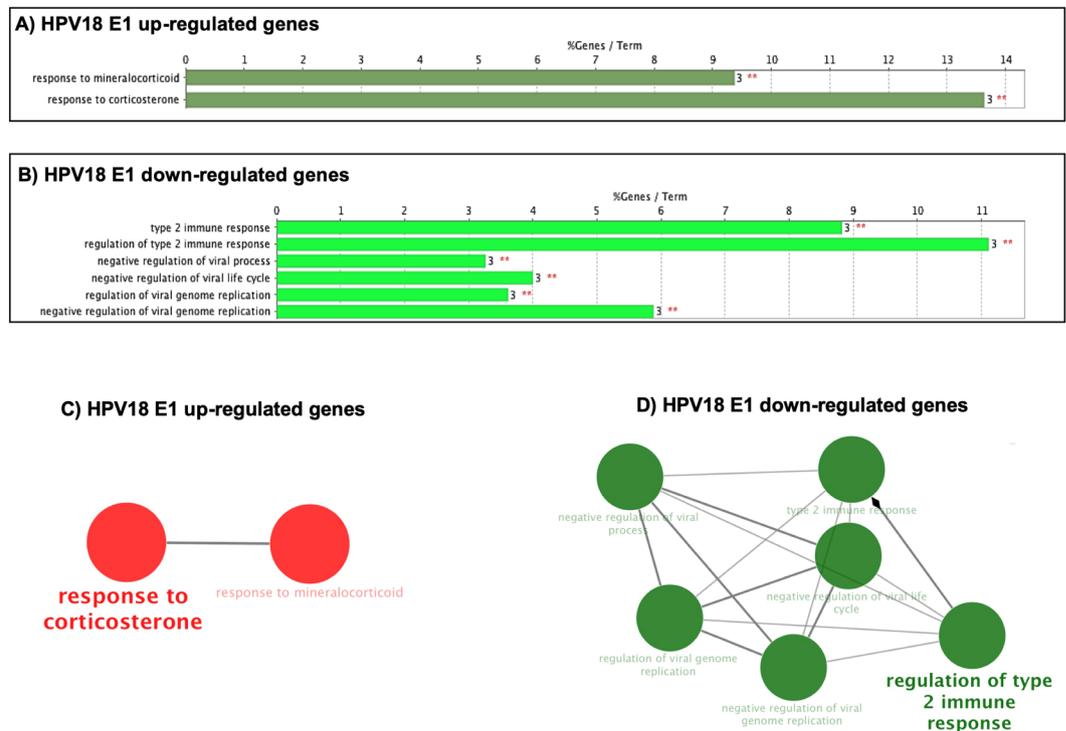
24 h post-transfection, expression of IFN $\beta$ 1 was evaluated by qPCR. Figure 9B shows that cells expressing HPV16, 18 and 11 E1 proteins exhibit a decrease in the levels of IFN $\beta$ 1 compared with cells transfected only with poly I:C plus the pCA vector ( $p < 0.0001$ ). Additionally, it was demonstrated that 0.1  $\mu$ g of Poly I:C promoted the expression of IFN $\lambda$ 1 mRNA in the presence of the control vector; while such expression decreased in E1-expressing cells ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 9C). Taken together, these results demonstrate that HPV E1 proteins from low- and high-risk decrease the expression of IFN even after stimulating IFN gene transcription, showing that HPV16, 18 and 11 E1 proteins downregulate the expression of two key components of the antiviral immune response.

In order to verify the possible mechanism implicated in the downregulation of IFNs induced by the HPV E1 proteins, we evaluated the levels of NF $\kappa$ B, a master regulator of immune related genes<sup>22</sup>, as well as the levels of I $\kappa$ B $\alpha$ , which is a negative regulator of NF $\kappa$ B. As shown in Fig. 9D, HPV E1 proteins increased p52 (NF $\kappa$ B) protein levels, which is mainly a positive regulator of the NF $\kappa$ B non-canonical pathway. Additionally, in the presence of E1 proteins, I $\kappa$ B $\alpha$  (NF $\kappa$ B canonical pathway negative regulator) protein levels decreased. These results indicate that HPV E1 activates not only the NF $\kappa$ B canonical pathway, but also the non-canonical pathway.

## Discussion

The function so far attributed to the HPV E1 protein has been its participation in the viral replication process, along with E2<sup>11</sup>. However, it has been shown that E1 also associates with other cellular proteins that regulate epigenetic processes<sup>12,13,23</sup>. Thus, the ability of E1 to interact with chromatin modifiers to regulate viral replication, suggests that this protein could also affect cellular processes in the host genome such as gene expression.

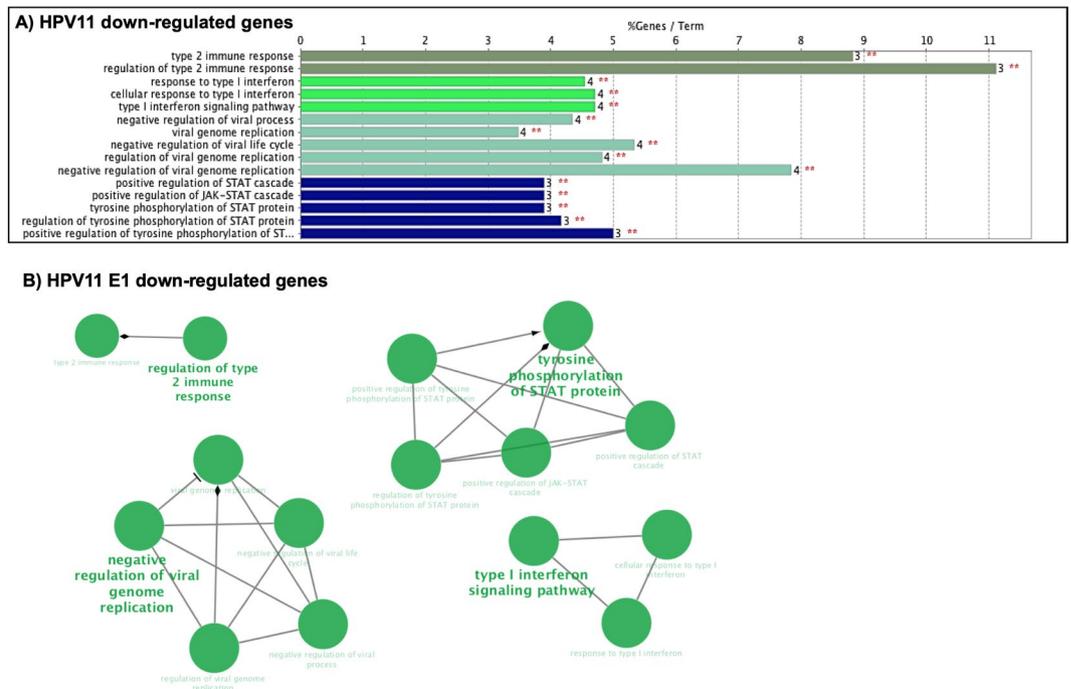
In the present study, we determined the effect of E1 from high and low risk HPVs on cellular gene expression analyzed by RNA-seq observing that E1 protein affects the expression of different cellular processes, however, a greater effect on cellular processes associated with immune response ( $p$ -value  $< 0.05$ ) was observed. More restricted analysis in which only genes with an adjusted  $p$ -value ( $p$ -adj  $< 0.05$ ) were selected, identified a smaller number of genes regulated by the presence of E1, which are involved in immune response more specifically in antiviral immune response. Our results are in agreement with those of Castillo *et al.*, (2014) who reported a change in the expression of genes associated with the innate immune response after the ablation of E1 expression in HeLa cells<sup>15</sup>. Furthermore, when comparing the three viral types tested, our results demonstrated that not only E1 from HPV18 promotes a change in gene expression but also E1 from HPV16 and from low-risk HPV11, suggesting a probable similar mechanism in the regulation of gene expression performed by the E1 proteins. Particularly, 4 genes were downregulated in common by the three HPV E1 proteins (IFN $\beta$ 1, IFN $\lambda$ 1, Viperin and CCL5), which participate in the antiviral immune response<sup>17,24-26</sup>.



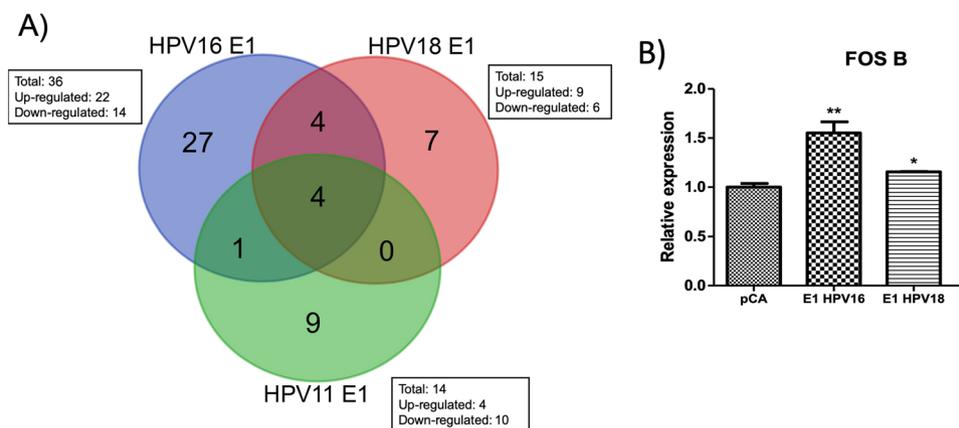
**Figure 4.** Immune response and response to corticosterone networks are altered by the HPV18 E1 protein. HPV18 E1 significantly regulated genes were analyzed by ClueGO. **(A)** Gene ontology (GO) pathway terms obtained for up-regulated genes. **(B)** GO pathway terms obtained for down-regulated genes. The number of associated genes is depicted on the right of each bar and above is presented the percentage of altered genes. Significance ( $p \leq 0.05$ ) is represented by red asterisks. Clustered networks for up-regulated genes (Red color) **(C)** and downregulated genes (Green color) **(D)** in presence of HPV-18 E1 protein. The major term per group is displayed. Node size exposes the degree of enrichment. Organic layout algorithm introduced in Cytoscape supplied the obtained networks. Genes showing Padj changes with a significance of  $p < 0.05$  were analyzed.

IFN $\beta$ 1 and IFN $\lambda$ 1, are key mediators of the antiviral immune response, which ultimately promote the expression of interferon-stimulated (ISG) genes, helping to control the infectious processes, through multiple mechanisms such as protein translation inhibition, viral RNA degradation as well as the activation and survival of innate and adaptive immune cells such as Dendritic cells (DCs), macrophages, NK cells, and T cells, activating both innate and adaptive immune response to inhibit viral infection<sup>18,27,28</sup>. Due to the relevance of such elements, IFN $\beta$ 1 and IFN $\lambda$ 1 were selected for further validation through qPCR, that demonstrated that mRNA levels decreased in the presence of the three viral types. Importantly, the E1 proteins blocked the IFN $\beta$  expression even after stimulating with Poly I:C which produces a similar effect than a viral infection, indicating that the downregulation induced by the E1 proteins at a transcriptional level has an impact during a normal challenge in immortalized keratinocytes. Similarly, when analyzing IFN $\lambda$ 1, we found that E1 also decreased its expression after Poly I:C treatment, suggesting that E1 could be acting as an immunosuppressive element in HPV infections. The fact that E1 decreases IFN $\beta$ 1 and IFN $\lambda$ 1 mRNA levels, lead us to evaluate the expression of some ISGs, finding a decrease in the expression of CCL5, RSAD2 (viperin) and IFIT2 in the presence of E1 of HPV16, 18 and 11. Such results support the data obtained by RNA-seq, in which these ISGs were also diminished, demonstrating that E1 affects the expression of IFNs, which in turn affects the expression of ISGs. Thus, suggesting that E1 may play an important role in the antiviral immune response.

We found a reduction of the negative regulator I $\kappa$ B $\alpha$  in the presence of the three HPV E1 proteins, indicating that the NF $\kappa$ B canonical pathway is active. These results are in agreement with those reported by Nakahara *et al.*, (2015) where HPV16 E1 induced the activation of NF $\kappa$ B in primary cervical keratinocytes<sup>29</sup>. To test whether E1 could activate the NF $\kappa$ B non-canonical pathway, we analyzed p52 levels, a product of NF $\kappa$ B2/p100 processing. It is known that p52 associates with RelB in the cytoplasm and the complex RelB:p52 is required for the induction of several pro-inflammatory genes<sup>30</sup>. Interestingly, we found an increase in p52 levels in the presence of the three HPV E1 proteins. These results suggest that HPV E1 protein is somehow activating the two NF $\kappa$ B pathways promoting the expression of genes such as cytokines, chemokines, adhesion molecules, enzymes that produce secondary inflammatory mediators, and inhibitors of apoptosis<sup>31</sup>. Nevertheless, while the activation of NF $\kappa$ B should promote the expression of IFN $\beta$  we found that E1 decreases its expression. This contradictory effect could be due to the fact that NF $\kappa$ B is not essential for IFN $\beta$  expression<sup>32</sup>, although E1 could favor the expression of other NF $\kappa$ B genes. So it would be interesting to determine whether E1 affects other transcriptional factors or cofactors, that could regulate the expression of IFN $\beta$ , such as IRFs, since it has been shown that the Interferon Regulatory Factor 3 (IRF-3) promotes the expression of IFN $\beta$ <sup>33</sup> as has been shown for E6 and E7 oncoproteins<sup>34–36</sup>.

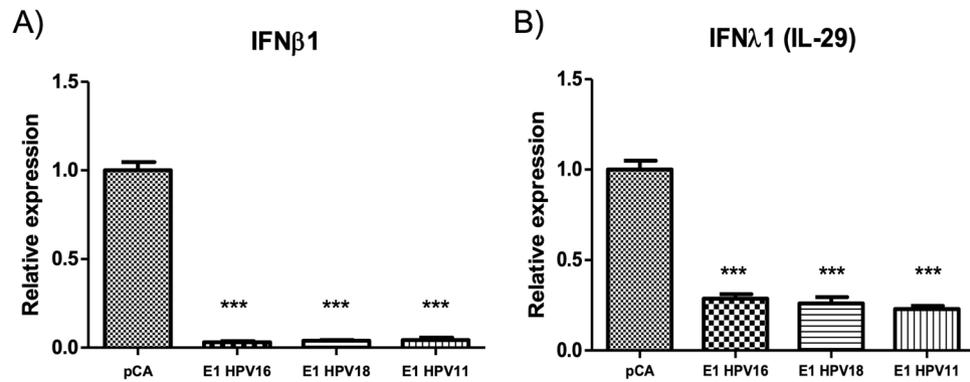


**Figure 5.** Immune response network is altered by the HPV11 E1 protein. HPV11 E1 significantly regulated genes were analyzed by ClueGO. (A) Gene ontology (GO) pathway terms obtained for down-regulated genes. The number of associated genes is depicted on the right of each bar and above is presented the percentage of altered genes. Significance ( $p \leq 0.05$ ) is represented by red asterisks. (B) GO pathway terms obtained for down-regulated genes. Clustered networks for downregulated genes (Green color) in presence of HPV-11 E1 protein. The major term per group is displayed. Node size exposes the degree of enrichment. Organic layout algorithm introduced in Cytoscape supplied the obtained networks. Genes showing Padj changes with a significance of  $p < 0.05$  were analyzed.

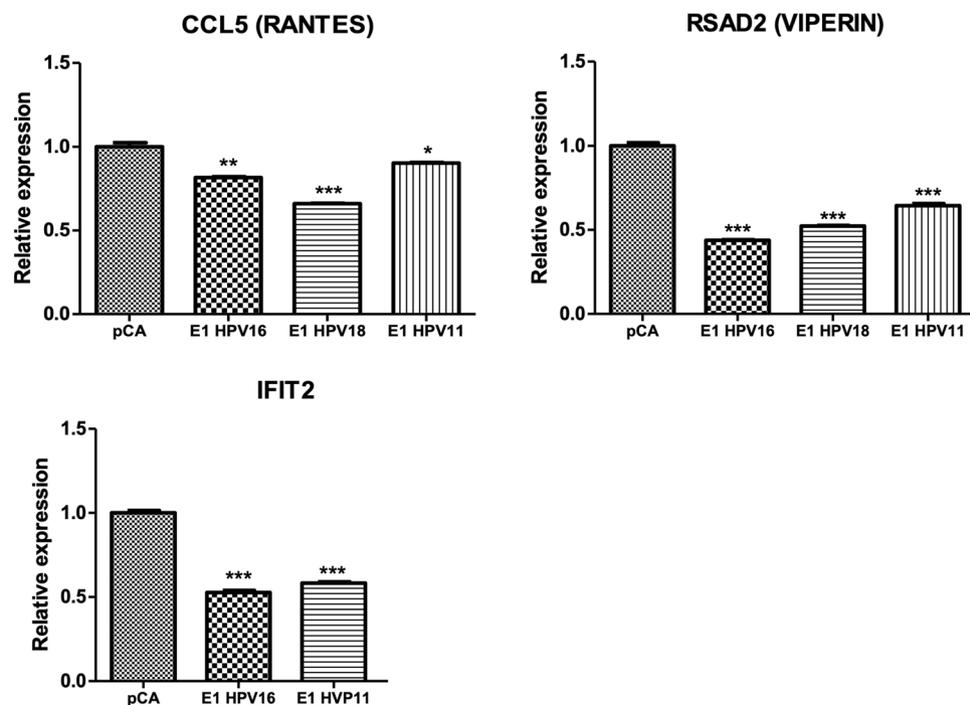


**Figure 6.** The HPV16, 18 and 11 E1 proteins alter similar genes. (A) Venn diagram summarizing the shared number of genes overlapping between differentially expressed genes altered by HPV E1 proteins. (B) HaCaT cells transfected with pCA vector control and HPV16 and HPV18 E1 expressing plasmids were collected and RNA extracted 24 h after transfection. Then, cDNA was synthesized and the mRNA levels of FOSB was measured using specific primers. Relative mRNA levels of FOSB showed an increase in presence of E1 from HPV16 and 18. Values are expressed as the difference in double delta-Ct compared with pCA control transfected cells. The expression of the housekeeping gene 18S was used for normalizing. Bars represent the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  vs control (pCA).

That E1 blocks the IFNs production indicates that in addition to its participation in HPV infection, E1 could act on HPV persistency; nevertheless, the particular role of E1 in such process needs to be addressed. Therefore, it would be interesting to analyze the mechanism by which E1 interferes with the expression and production of IFN, as well as its effect on the expression of ISG. Some studies have demonstrated that the HPV produces an

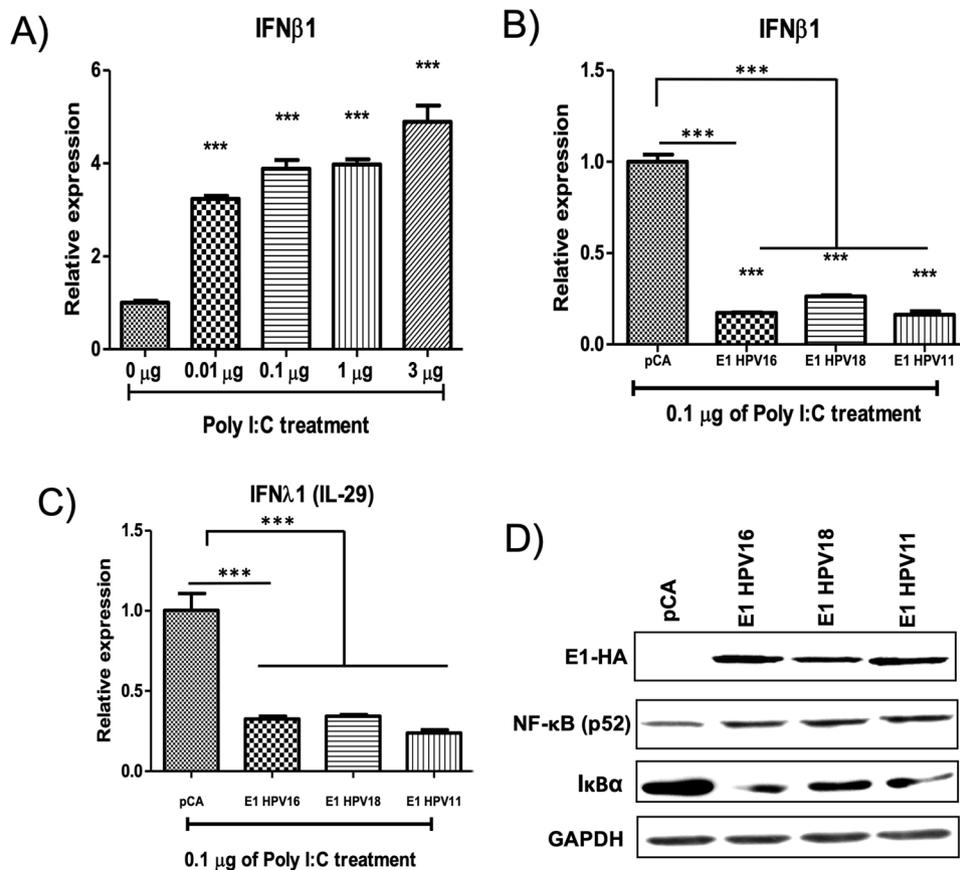


**Figure 7.** The E1 protein from HPV16, 18 and 11 downregulates IFNβ1 and IFNλ1 expression. HaCaT cells transfected with pCA control vector and HPV E1 expressing plasmids were collected and RNA extracted 24 h after transfection. Then, cDNA was synthesized and the mRNA levels of IFNβ1 and IFNλ1 genes were measured using specific primers (Supplementary Table 1). Relative mRNA levels of (A) IFNβ1 and (B) IFNλ1 genes showing a decrease in presence of the HPV-16, 18 and 11 E1. Values are expressed as the difference in double delta-Ct compared with pCA control transfected cells. The expression of the housekeeping gene 18S was used for normalizing. Bars represent the mean  $\pm$  SD. \*\*\* $p < 0.0001$  vs control (pCA).



**Figure 8.** The E1 protein from HPV16, 18 and 11 downregulates interferon-stimulated genes expression. HaCaT cells transfected with pCA vector control and HPV E1 expressing plasmids were collected and RNA extracted 24 h after transfection. Then, cDNA was synthesized and the mRNA levels of CCL5, RSAD2 (Viperin) and IFIT2 genes were measured using specific primers (Supplementary Table 1). Relative mRNA levels of CCL5, RSAD2 (Viperin) and IFIT2 genes showing a decrease in presence of the HPV-16, 18 and 11 E1. Values are expressed as the difference in double delta-Ct compared with pCA control transfected cells. The expression of the housekeeping gene 18S was used for normalizing. Bars represent the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs control (pCA).

alteration of key immunological elements either in primary keratinocytes in a context of whole genome as well as in cell lines. Several of the altered genes found in this study were confirmed by those studies including the analysis of IFNβ and RANTES<sup>37,38</sup>, and ISGs<sup>15</sup>. It is worth mentioning that the inhibition of INF expression has been observed in several viral infections such as Hepatitis, Herpesvirus and HTLV-1, where viruses use this strategy to evade the innate immune response favoring the infectious process<sup>39–41</sup>. Our results propose a novel mechanism in the modulation of the immune response induced by the HPV E1 protein, which could be associated to the replicative cycle and the viral persistence by evading the immune response.



**Figure 9.** HPV E1 protein decreases IFN $\beta$ 1 and IFN $\lambda$ 1 expression in the presence of the Poly I:C agonist. HaCaT cells were transfected using 0.01, 0.1, or 1  $\mu$ g of Poly I:C and pCA vector to a final amount of 4.5  $\mu$ g. After 24 h post transfection total RNA was extracted and the IFN $\beta$ 1 expression was evaluated by pPCR. (A) The Poly I:C increases the IFN $\beta$ 1 and IFN $\lambda$ 1 expression in HaCaT cells in all concentrations tested. The 0.1  $\mu$ g concentration was selected for further analyses. Bars represent the mean  $\pm$  SD. \*\*\* $p$  < 0.001 vs control (pCA). (B) IFN $\beta$ 1 and (C) IFN $\lambda$ 1 expression is repressed in the presence of HPV16, 18 and 11 E1 proteins. After 24 h of transfection with 0.1  $\mu$ g of Poly I:C and the indicated HPV E1 plasmid, total RNA was extracted, cDNA synthesized, and qPCR performed to evaluate the IFN $\beta$ 1 and IFN $\lambda$ 1 expression. In presence of the different HPV E1 proteins there is a decrease of IFN $\beta$ 1 and IFN $\lambda$ 1 expression. Values are expressed as the difference in double delta-Ct compared with cells transfected with the pCA vector. The expression of the housekeeping gene 18S was used for normalizing RNA expression. Bars represent the mean  $\pm$  SD. \*\*\* $p$  < 0.001 vs pCA control. (D) I $\kappa$ B $\alpha$  and p52-NF $\kappa$ B protein levels. HaCaT cells transfected with pCA vector and HPV E1 expressing plasmids were collected and total protein extracted 24 h after transfection. Levels of I $\kappa$ B $\alpha$  and p52-NF $\kappa$ B were ascertained by western blot. Proteins were separated in a 10% SDS-PAGE and membrane was probed with anti-phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser32/36)(5A5) (9246; Cell signaling Technology Europe, B.V) or anti-p52 (NF $\kappa$ B) (Santa Cruz Biotechnology, California) observing decreased levels of I $\kappa$ B $\alpha$  and an increase of p52-NF $\kappa$ B levels in the presence of HPV16, 18 and 11 E1 proteins. GAPDH was used as loading protein control (GAPDH, 37 KDa).

Among the processes associated with the development of cancer induced by HPV, viral persistence represents a leading key event at the beginning of this process<sup>42</sup>. Recently it was determined that E1 is expressed throughout the different stages of cervical cancer<sup>43</sup>. The authors analyzed the levels of HPV16 E1 mRNA in biopsies with different lesion degrees (CIN) as well as in cervical cancer, observing an increased expression of E1 as long as the lesion advances. In this regard, the analysis of genes differentially regulated by the E1 proteins, specifically those from the high-risk HPVs, revealed that E1 from both HPV16 and 18 types promote the expression of genes associated with cell proliferation, differentiation, cell viability and metabolism regulation (*FOSB*, *DUSP6*, *NR4A* and *CCNA1*)<sup>44–46</sup>, processes that could favor the replicative cycle. However, it has been demonstrated that overexpression of some of these genes play an important role in carcinogenesis associated with poor prognosis, resistance to treatment, recurrence and poor survival in some cancers (non-small-cell lung carcinoma, ovarian cancer)<sup>46–48</sup>. Moreover, E1 from HPV16 regulated the expression of genes such as *MMP1*, *EREG*, *ANGPTL4* which regulate cellular processes such as keratinocyte migration and re-epithelialization, proliferation and angiogenesis<sup>49,50</sup>, interestingly, the overexpression of those genes has been associated with the carcinogenesis process<sup>26,51–54</sup>. Taken together, these data suggest that E1 could play a role in the development of HPV-related cancers through the overexpression of certain cellular genes.

During the carcinogenic process there exists a deregulation of gene expression and epigenetic mechanisms, which play an important role at the different stages of cancer; these mechanisms are capable of altering the organization of chromatin, through chromatin modifiers, favoring or inhibiting the expression of genes<sup>55</sup>. It is known that the HPV genome organizes itself into a chromatin like structure<sup>56</sup>, regulating viral replication and transcription, which requires the participation of chromatin modifiers. Also, it has been shown that E1 interacts with the histone H1 and with the Ini1/hSNF5<sup>12,13</sup>, which are involved in the regulation of gene expression. Therefore, the ability of E1 to interact with those proteins, as well as with other chromatin modifiers as acetyltransferases (HATs) and deacetylases (HDACs), could be one of the mechanisms implicated in the regulation of gene expression performed by the E1 protein. In addition, this suggests that E1 could not only regulate the HPV genome, but also the host genome, promoting gene expression that could be favoring in part the infectious process and probably carcinogenesis.

It is also possible that E1 regulates gene expression by directly binding to the cellular genome on regulatory elements (promoters or enhancers), through its DNA binding domain<sup>57</sup>. This has been demonstrated for the Epstein-Barr virus (EBV) EBNA1 protein, which directly bind to cellular promoters, which was related to changes in gene expression profiles<sup>58</sup>. However, it is likely that an indirect interaction of E1 with DNA through its interaction with transcription factors or with chromatin modifiers could be happening. Therefore, it would be interesting to study new E1 interacting partners that allow the modulation of gene expression, including the modulation of other cellular processes, such as its participation in cell transformation.

## Conclusions

Our results demonstrate that HPV E1 proteins induces changes in cellular gene expression, which is a process that is conserved among high- and low-risk HPVs. E1 of HPV16 and 18 are capable of regulating the expression of genes involved in processes of proliferation, migration and metastasis which are associated with carcinogenesis. Otherwise, E1 of the three viral types were able to modulate the expression of genes associated with the antiviral immune response, and also avoided the IFN $\beta$ 1 and IFN $\lambda$ 1 expression, as well as of ISGs. Although the mechanism for such regulation remains unclear, our results suggest that both, the canonical, as well as the non-canonical NF $\kappa$ B pathways are affected by the HPV E1 proteins. Nevertheless, the participation of NF $\kappa$ B pathways in the regulation of IFN needs further investigation. Therefore, in addition to its well-known role in viral replication, the E1 protein may also play an important role in the evasion of the immune response to favor the replicative cycle, persistence and development of cancer.

## Materials and Methods

**Cell culture and transfections.** The HPV negative cell line HaCaT, was kindly provided by Dr. A. Garcia-Carrancá (INCan, México). Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) supplemented with 10% of foetal bovine serum (FBS). A total of 380,000 cells were plated in a 60 mm dish and transfected with the indicated plasmids using PolyFect<sup>®</sup> reagent (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. For IFN expression stimulation, HaCaT cells were transfected with different amounts of Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I:C) (Sigma, St. Louis, MO, USA) as indicated. In each case, cells were collected and used for RNA and protein extraction after 24 h post transfection.

**Plasmids.** HPV16 and HPV11 HA tagged E1 expressing plasmids were kindly provided from Dr. Mart Ustav (University of Tartu, Estonia). HPV18 HA tagged E1 expressing plasmid was previously described by our group<sup>59</sup>. The pCA vector was used as transfection control. All plasmids were verified by sequencing.

**RNA Isolation and cDNA synthesis.** HaCaT cells were seeded in a 60 mm culture dish and transfected with 4.5  $\mu$ g of each of the three viral types E1 plasmid in triplicate. After 24 h of transfection, total RNA was isolated from each condition using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's protocol. RNA was resuspended in 30  $\mu$ L of RNase-free H<sub>2</sub>O, the was treated with the DNase Free DNA removal kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and quantified. 400  $\mu$ g of RNA was reverse-transcribed with Oligo dT utilizing the GeneAmp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) The expression of E1 from the different HPVs were verified by RT-PCR using specific primers listed in Supplementary Table 1.

**RNA-Seq: Illumina library preparation and sequencing.** Total RNA was isolated from three independent transfections per condition as indicated. Total RNA was quantified spectrophotometrically using a NanoDrop ND-1000 spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA); integrity was analyzed by capillary electrophoresis using the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), all samples exhibited a high-quality RNA integrity number (RIN) > 9.0. RNA-seq libraries from all replicas and conditions (n = 12) were constructed using the TruSeq Stranded mRNA Library Preparation kit (Illumina, San Diego, CA) as 76-bp paired-end reads length. Samples were sequenced using an Illumina NextSeq 500 platform, generating at least 40 million reads per sample. Paired-end reads were assigned quality scores and aligned to the reference genome RefSeq (hg19) using bowtie and then count files were generate with Htseq-count, and differential expression performed with DESeq2 where *p*-value of < 0.05 and Adjusted *p*-value < 0.05 were consider as statistically significant. The pipeline was carried out using the tools provided in Illumina's BaseSpace. Biological processes analysis (GO category) was performed using differentially expressed genes and visualized with ClueGo, a Cytoscape plug-in. Ingenuity pathway analysis was performed to identify canonical signaling pathways and functional pathways affected by the differentially expressed genes. Fisher's exact test was done automatically by the software.

**Gene expression assay.** Total RNA was isolated using the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). The obtained RNA was treated with the DNase Free DNA removal kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,

USA). A total of 500 µg of RNA was reverse-transcribed with Oligo (dt) primers utilizing the GeneAmp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The expression of *FOSB*, *IFIT2*, *CCL5*, *RSAD2*, *IFNβ1* and *IFNλ1* genes was evaluated using specific primers listed in Supplementary Table 1. As a house keeping control, 18S gene expression was also evaluated. The results are presented as relative quantification using the  $\Delta\Delta C_t$  method.

**Western blot analysis.** After 24 h post-transfection, cells were collected, and protein extracts obtained by adding Leammli sample buffer (Bio Rad, Ca, USA). Equal amounts of proteins were loaded and separated by SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked using 7.5% milk in TBS/0.01% Tween buffer and then incubated with the indicated antibodies. Primary antibodies were prepared in TBS/0.01% Tween buffer as follows: anti-GAPDH (1:1000) (32233; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), anti-HA (1:1000) (C29F4; Cell Signaling Technology Europe, B.V), anti-p52NFκB (1:1000) (298; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), α-Actinin (1:1000) (17829; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) and Phospho-IκBα (Ser32/36)(5A5) (9246; Cell signaling Technology Europe, B.V) Membranes were washed three times with TBS/0.01% Tween buffer and incubated with HRP coupled secondary anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California). Finally, Proteins were visualized using the ChemoLuminiscent Reagent (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, U.S) according to the manufacturer's instructions.

**Statistical analysis.** Data showing the effects of HPV E1 protein in the different assays are presented as mean ± SD. *p* was calculated by Student's *t*-test or ANOVA Tukey's post-hoc analysis. Significant differences were accepted with  $p \leq 0.05$ , as indicated.

## References

- Colon-Lopez, V. *et al.* Awareness and knowledge of human papillomavirus (HPV) infection among high-risk men of Hispanic origin attending a sexually transmitted infection (STI) clinic. *BMC Infect. Dis.* **12**, 346 (2012).
- Bzhilava, D., Guan, P., Franceschi, S., Dillner, J. & Clifford, G. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* **445**, 224–231 (2013).
- Lacey, C. J. N., Lowndes, C. M. & Shah, K. V. Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease. *Vaccine* **24**(Suppl 3), S3/35–41 (2006).
- Parkin, D. M. & Bray, F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* **24**(Suppl 3), S3/11–25 (2006).
- Marur, S., D'Souza, G., Westra, W. H. & Forastiere, A. A. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet. Oncol.* **11**, 781–789 (2010).
- Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C. & Murakami, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol.* **25**(Suppl 1), 2–23 (2015).
- DiMaio, D. & Petti, L. M. The E5 proteins. *Virology* **445**, 99–114 (2013).
- Moody, C. A. & Laimins, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 550–560 (2010).
- Bergvall, M., Melendy, T. & Archambault, J. The E1 proteins. *Virology* **445**, 35–56 (2013).
- Cote-Martin, A. *et al.* Human papillomavirus E1 helicase interacts with the WD repeat protein p80 to promote maintenance of the viral genome in keratinocytes. *J. Virol.* **82**, 1271–1283 (2008).
- Egawa, N. *et al.* The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J. Virol.* **86**, 3276–3283 (2012).
- Swindle, C. S. & Engler, J. A. Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1. *J. Virol.* **72**, 1994–2001 (1998).
- Lee, D., Sohn, H., Kalpana, G. V. & Choe, J. Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature* **399**, 487–491 (1999).
- Seedorf, K., Oltersdorf, T., Krammer, G. & Rowekamp, W. Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16 (HPV 16) and type 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells. *EMBO J.* **6**, 139–144 (1987).
- Castillo, A. *et al.* A systems biology analysis of the changes in gene expression via silencing of HPV-18 E1 expression in HeLa cells. *Open Biol.* **4** (2014).
- Moody, C. A., Fradet-Turcotte, A., Archambault, J. & Laimins, L. A. Human papillomaviruses activate caspases upon epithelial differentiation to induce viral genome amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 19541–19546 (2007).
- Levy, D. E., Marie, I. J. & Durbin, J. E. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 476–486 (2011).
- Schoggins, J. W. & Rice, C. M. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 519–525 (2011).
- Raj, N. B. & Pitha, P. M. Analysis of interferon mRNA in human fibroblast cells induced to produce interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7426–7430 (1981).
- Dauletbaev, N., Cammisano, M., Herscovitch, K. & Lands, L. C. Stimulation of the RIG-I/MAVS Pathway by Polyinosinic:Polycytidylic Acid Upregulates IFN-beta in Airway Epithelial Cells with Minimal Costimulation of IL-8. *J. Immunol.* **195**, 2829–2841 (2015).
- Takada, K. *et al.* Poly I:C induces collective migration of HaCaT keratinocytes via IL-8. *BMC Immunol.* **18**, 19 (2017).
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.-C. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2** (2017).
- Das, D., Smith, N., Wang, X. & Morgan, I. M. The Deacetylase SIRT1 Regulates the Replication Properties of Human Papillomavirus 16 E1 and E2. *J. Virol.* **91** (2017).
- Elliott, M. B. *et al.* Inhibition of respiratory syncytial virus infection with the CC chemokine RANTES (CCL5). *J. Med. Virol.* **73**, 300–308 (2004).
- Culley, F. J. *et al.* Role of CCL5 (RANTES) in viral lung disease. *J. Virol.* **80**, 8151–8157 (2006).
- Helbig, K. J. & Beard, M. R. The role of viperin in the innate antiviral response. *J. Mol. Biol.* **426**, 1210–1219 (2014).
- Zuniga, E. I., Macal, M., Lewis, G. M. & Harker, J. A. Innate and Adaptive Immune Regulation During Chronic Viral Infections. *Annu. Rev. Virol.* **2**, 573–597 (2015).
- Schoggins, J. W. Recent advances in antiviral interferon-stimulated gene biology. *F1000Research* **7**, 309 (2018).
- Nakahara, T. *et al.* Activation of NF-kappaB by human papillomavirus 16 E1 limits E1-dependent viral replication through degradation of E1. *J. Virol.* **89**, 5040–5059 (2015).
- Bonizzi, G. *et al.* Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *EMBO J.* **23**, 4202–4210 (2004).

31. Bonizzi, G. & Karin, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**, 280–288 (2004).
32. Wang, J. *et al.* NF-kappa B RelA subunit is crucial for early IFN-beta expression and resistance to RNA virus replication. *J. Immunol.* **185**, 1720–1729 (2010).
33. Sato, M. *et al.* Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* **13**, 539–548 (2000).
34. Ronco, L. V., Karpova, A. Y., Vidal, M. & Howley, P. M. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* **12**, 2061–2072 (1998).
35. Park, J. S. *et al.* Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* **275**, 6764–6769 (2000).
36. Barnard, P. & McMillan, N. A. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology* **259**, 305–313 (1999).
37. Karim, R. *et al.* Human papillomavirus (HPV) upregulates the cellular deubiquitinase UCHL1 to suppress the keratinocyte's innate immune response. *PLoS Pathog.* **9**, e1003384 (2013).
38. Karim, R. *et al.* Human papillomavirus deregulates the response of a cellular network comprising of chemotactic and proinflammatory genes. *PLoS One* **6**, e17848 (2011).
39. Hou, Z. *et al.* Hepatitis B virus inhibits intrinsic RIG-I and RIG-G immune signaling via inducing miR146a. *Sci. Rep.* **6**, 26150 (2016).
40. Zhang, D., Su, C. & Zheng, C. Herpes Simplex Virus 1 Serine Protease VP24 Blocks the DNA-Sensing Signal Pathway by Abrogating Activation of Interferon Regulatory Factor 3. *J. Virol.* **90**, 5824–5829 (2016).
41. Hyun, J. *et al.* Oncogenic human T-cell lymphotropic virus type 1 tax suppression of primary innate immune signaling pathways. *J. Virol.* **89**, 4880–4893 (2015).
42. Ref. C. [Nobel prize in medicine or physiology 2008. The discovery of HIV and cancerogenic human papilloma viruses]. *Unfallchirurg* **111**, 1037–1040 (2008).
43. Baedyananda, F., Chaiwongkot, A. & Bhattarakosol, P. Elevated HPV16 E1 Expression Is Associated with Cervical Cancer Progression. *Intervirology* **60**, 171–180 (2017).
44. Yang, R. *et al.* Functions of cyclin A1 in the cell cycle and its interactions with transcription factor E2F-1 and the Rb family of proteins. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2400–2407 (1999).
45. Zhao, Y. & Bruemmer, D. NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1535–1541 (2010).
46. Ahmad, M. K., Abdollah, N. A., Shafie, N. H., Yusof, N. M. & Razak, S. R. A. Dual-specificity phosphatase 6 (DUSP6): a review of its molecular characteristics and clinical relevance in cancer. *Cancer Biol. Med.* **15**, 14–28 (2018).
47. Huang, K.-C. *et al.* Cyclin A1 expression and paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Eur. J. Cancer* **67**, 152–163 (2016).
48. Zhu, B. *et al.* Overexpression of NR4A1 is associated with tumor recurrence and poor survival in non-small-cell lung carcinoma. *Oncotarget* **8**, 113977–113986 (2017).
49. Shirakata, Y. *et al.* Epiregulin, a novel member of the epidermal growth factor family, is an autocrine growth factor in normal human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 5748–5753 (2000).
50. Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* **69**, 562–573 (2006).
51. Yotsumoto, F. *et al.* Molecular hierarchy of heparin-binding EGF-like growth factor-regulated angiogenesis in triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer Res.* **11**, 506–517 (2013).
52. Hu, K. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 upregulation of both VEGF and ANGPTL4 is required to promote the angiogenic phenotype in uveal melanoma. *Oncotarget* **7**, 7816–7828 (2016).
53. Beard, J. A., Tenga, A. & Chen, T. The interplay of NR4A receptors and the oncogene-tumor suppressor networks in cancer. *Cell. Signal.* **27**, 257–266 (2015).
54. Sigismund, S., Avanzato, D. & Lanzetti, L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol. Oncol.* **12**, 3–20 (2018).
55. Henikoff, S. & Greally, J. M. Epigenetics, cellular memory and gene regulation. *Curr. Biol.* **26**, R644–8 (2016).
56. Favre, M., Breitburd, F., Croissant, O. & Orth, G. Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J. Virol.* **21**, 1205–1209 (1977).
57. Auster, A. S. & Joshua-Tor, L. The DNA-binding domain of human papillomavirus type 18 E1. Crystal structure, dimerization, and DNA binding. *J. Biol. Chem.* **279**, 3733–3742 (2004).
58. Canaan, A. *et al.* EBNA1 regulates cellular gene expression by binding cellular promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 22421–22426 (2009).
59. Amador-Molina, A. *et al.* Vaccination with human papillomavirus-18 E1 protein plus alpha-galactosyl-ceramide induces CD8(+) cytotoxic response and impairs the growth of E1-expressing tumors. *Vaccine* **37**, 1219–1228 (2019).

## Acknowledgements

Leonardo Josué Castro-Muñoz is a Ph.D. student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and wants to acknowledge CONACyT for a doctoral fellowship CONACyT: 282303. We are grateful to Patricia de la Torre from Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM for technical assistance. This work was partially supported by Instituto Nacional de Cancerología, México grants: (018/037/IBI)(CEI/1284/18), (017/048/IBI)(CEI/1227/17).

## Author Contributions

All of the authors listed made substantial contributions to the manuscript and qualify for authorship, and no authors have been omitted. Conception and design: ML; development of methodology and acquisition of data: L.J.C.-M., J.M.-M., J.O.M.-B., L.O.-N., A.C.-T., L.A.A.-R.; analysis and interpretation of data: L.J.C.-M., J.M.-M., V.M.-M., A.H.-M., M.L.; writing and revision of the manuscript: L.J.C.-M, J.M.-M., M.L.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49886-4>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019