



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Identificación de mecanismos moleculares implicados en la activación de la vía de NF- κ B por la proteína E1 del Virus del Papiloma Humano tipo 16 y 11”

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias**

**PRESENTA:
Biomédica Alicia Beltrán Soto**

**TUTOR PRINCIPAL
Dra. Marcela Lizano Soberón
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Vicente Madrid Marina
Instituto Nacional de Salud Pública**

**Dra. Leticia Rocha Zavaleta
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.**

Ciudad de México. Enero 2023



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.

BELTRÁN SOTO ALICIA
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **10 de octubre de 2022**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestra en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Identificación de mecanismos moleculares implicados en la activación de la vía de NF-kB por la proteína E1 del Virus del Papiloma Humano tipo 16 y 11**", dirigida por el/la Dr(a). **LIZANO SOBERÓN MARCELA**.

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

MACIAS SILVA MARINA	PMDCBQ	PRESIDENTE
GONSEBATT BONAPARTE MARÍA EUGENIA	PMDCBQ	SECRETARIO
GÓMORA MARTÍNEZ JUAN CARLOS	PMDCBQ	VOCAL
IBARRA RUBIO MARÍA ELENA	PMDCBQ	VOCAL
ELIZABETH LANGLEY MCCARRON	NO ACREDITADO	VOCAL

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de octubre de 2022



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM por enriquecer mi formación académica y personal. Así como al Instituto Nacional de Cancerología en donde realicé este trabajo de maestría, así como también un verano científico y el servicio social. Una institución donde adquirí grandes amigos y experiencias.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado a través el programa de becarios (CVU 956876)

Agradezco a Conacyt PRONAI-7-Virus y Cáncer 303044

A mi tutora la Dra. Marcela Lizano por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, por haber confiado en mí y aceptarme desde ya hace varios años. Gracias por el apoyo que me ha brindado y por su calidez humana que la distinguen.

A mi comité tutor conformado por Dr. Vicente Madrid y Dra. Leticia Rocha Zabaleta por los aportes y sugerencias para la realización y enriquecimiento de este proyecto.

Al Dr. Leonardo Josué Castro Muñoz, porque desde que nos conocimos formamos un vínculo de amistad y te agradezco por todo lo que el apoyo que me brindaste. Al Dr. Joaquín Manzo Merino por ser brindarme tu apoyo y tu amistad.

A los miembros del jurado de tesis, Dra. Marina Macias Silva, Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, Dra. María Elena Ibarra Rubio y Dra. Elizabeth Langley McCarron por sus valiosas observaciones en la tesis escrita.

A la M. en C. Adela Carrillo García, a la Dra. Adriana Contreras Paredes y a la Dra. Imelda Martínez Ramírez por su trabajo en el para que el laboratorio funcione correctamente.

A mi amiga Iris, porque puedo confiar en ti, por todo tu cariño y apoyo.

A mis amigos de laboratorio y que he conservado: Katys, isme, Arantxa, Silvia, Omar, Leslie, Diego, Adrianita, Jimena, Joel, Katia y Liz por el increíble ambiente de trabajo y por sus aportes invaluable para el correcto desarrollo de este proyecto.

Dedicatoria

A ti, oh Dios de mis padres, te doy gracias y te alabo, porque me has dado sabiduría y fuerza, y ahora me has revelado lo que te pedimos; pues nos has dado a conocer el asunto del rey. Daniel 2:10

A mi esposo, gracias por ser esa fuerza y apoyo cuando más lo llegue a necesitar, TE AMO.

Mamá gracias por que tu junto con mi abuela me inspiran a seguir a delante, por ser esas mujeres guerreras, porque me han demostrado que siempre se puede dar más de lo que tenemos, por tu amor de mamá. A mi papá, te honro por ser mi padre.

A mis hermanos Luis enrique y Diego, porque siempre han confiado en mí y me alientan a seguir adelante.

A mi princesa Valentina, porque la inocencia de tu niñez me ha hecho muy feliz, tú me has dado más de lo que yo a ti.



Índice

Índice de figuras	IV
Índice de tablas.....	V
Abreviaturas	VI
Resumen.....	IX
1. Introducción.....	1
1.1 Generalidades de NF- κ B.....	1
1.2 Activación de la vía canónica de NF- κ B	3
1.3 Activación de la vía no canónica NF- κ B	5
1.4 Regulación de la activación de la vía de NF- κ B mediada por virus	5
1.5 Virus del papiloma Humano (VPH).....	8
1.6 Clasificación de los VPHs	8
1.7 Estructura.....	8
1.8 Genoma	8
1.9 Proteína E1 del VPH.....	11
1.10 Función de la proteína E1	12
2. Antecedentes	15
3. Justificación.....	17
4. Hipótesis	17
5. Objetivos	17
6. Materiales y Métodos.....	19
6.1 Diseño experimental	19
6.2 Línea celular.....	19
6.3 Plásmidos	19
6.4 Transformación bacteriana	20



6.5	Transfección.....	20
6.6	Obtención de RNA y síntesis de cDNA.....	20
6.7	Western Blot.....	21
6.8	Extracción de proteína totales.....	21
6.9	Fraccionamiento celular.....	22
6.10	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE).....	22
7.	Transferencia.....	23
7.1	Bloqueo de membrana e incubación de anticuerpos primarios y secundarios	23
7.2	Anticuerpos.....	23
7.3	Análisis estadístico.....	24
7.4	Ensayo de inmunofluorescencia.....	24
7.5	Análisis bioinformático.....	25
8.	Resultados.....	26
8.1	Niveles de la proteína E1 del VPH16 y 11 en células HaCaT.....	26
8.2	La expresión de la proteína E1 del Virus del Papiloma Humano aumenta los niveles de las proteínas p65, p50 y p52.	27
8.3	La proteína E1 del VPH16 promueve la translocación nuclear de las proteínas p50 y p52.	29
8.4	La proteína E1 del VPH16 aumenta los niveles de la proteína IKK α/β	30
8.5	La proteína E1 VPH16 promueve la translocación nuclear de IKK α/β	31
8.6	La proteína E1 del VPH 16 aumenta los niveles de la cinasa NIK.....	33
8.7	E1 del VPH16 aumenta los niveles de TLR-9.....	34
8.8	Identificación de genes blanco del factor transcripcional NF-kB desregulados en presencia de E1 del VPH16.....	35
8.9	E1 de VPH16 regula procesos asociados a la activación de NF-kB.....	37
9.	Discusión.....	40
10.	Conclusiones.....	51



11.	Perspectivas.....	53
12.	Anexo	54
13.	Referencias	56



Índice de figuras

Figura 1. Componentes de la activación de la vía NF- κ B.....	2
Figura 2. Procesos celulares y genes regulados por NF- κ B.....	3
Figura 3. Descripción de las vías canónica y no canónica de activación de NF- κ B.....	4
Figura 4. Organización del genoma del Virus del Papiloma Humano.....	9
Figura 5. Estructura de la proteína E1 del VPH.	12
Figura 6. La proteína E1 durante la replicación del genoma viral.	14
Figura 7. Niveles de E1 del VPH16 y 11 en línea celular HaCaT.....	26
Figura 8. La proteína E1 del VPH16 aumenta los niveles de p65, p50 y p52.	28
Figura 9. E1 del VPH16 promueve la translocación nuclear de NF- κ B.....	30
Figura 10. La proteína E1 del VPH16 aumenta los niveles de IKK α	31
Figura 11. La proteína E1 VPH16 promueve la translocación nuclear de IKK α / β	32
Figura 12. La proteína E1 del VPH16 aumenta los niveles de NIK.....	33
Figura 13. E1 del VPH16 aumenta los niveles de TLR-9.....	34
Figura 14. Genes desregulados en presencia de E1 del VPH16 asociados a la vía de señalización de NF- κ B.....	36
Figura 15. E1 de VPH 16 regula procesos celulares asociados a NF- κ B.....	39
Figura 16. E1 induce la vía de activación de NF- κ B (imagen de conclusiones)	52



Índice de tablas

Tabla 1. Otros ejemplos de activación de NF- κ B por proteínas virales (Modificado de Rahman, <i>et al</i> , 2011).	7
Tabla 2. Clasificación de los VPH según su potencial oncogénico (Muñoz, <i>et al</i> , 2013).	8
Tabla 3. Función de las proteínas del VPH.....	10
Tabla 4. Lista de <i>primers</i> usados.....	21
Tabla 5. Lista de anticuerpos usados.....	23
Tabla 6. Genes desregulados en presencia de E1 del VPH16 asociados a la vía de señalización de NF- κ B.....	37



Abreviaturas

°C Grados centígrados

μL Microlitro

ATP Adenosintrifosfato

cIAP Inhibidor celular de la proteína apoptosis

DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol

DBD Dominio de unión al DNA

DMEM-F12 Medio Eagle de Dulbecco modificado F12

DNA Ácido desoxirribonucleico

EBV Epstein- Barr

EBV Virus de Epstein-Barr

GAPDH Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

H3 Histona 3

HA Hemaglutinina

HaCaT Células de queratinocitos humanos

HAT Histona acetil transferasas

HDAC Las histonas desacetilasas

HTLV-1 Virus linfotrópico humano de células T tipo 1

ICAM-1 Molécula de Adhesión Intercelular

IF Inmunofluorescencia

IF Inmunofluorescencia indirecta

IKK Quinasa IκB



IL Interleucina

INCAN Instituto Nacional de Cancerología

I κ B α Inhibidor de NF- κ B

LCR Región larga de control

LT β linfotoxina- β

LT β R receptor de linfotoxina- β

MEF Fibroblastos de embriones de ratón

Min Minutos

mL Mililitros

MyD88 Factor de diferenciación mieloide 88

NF- κ B Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NLS Señal de Localización Nuclear

NLS Señal de Localización Nuclear

ORF Marco abierto de lectura

PAMP Patrones moleculares asociados a patógenos

PBS Solución salina amortiguador de fosfatos.

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

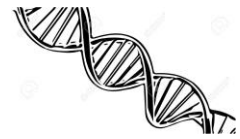
Poly IC Polyinosinic:polycytidylic acid

PRR Receptores de reconocimiento de patógenos

qPCR Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RNA Ácido Ribonucleico

rpm Revoluciones por minuto



SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SeV Virus Sendai

SFB Suero fetal bovino

TAD Dominio de transactivación

TAD Dominio de transactivación

TANK Activador de NF- κ B asociado a miembros de la familia TRAF

TBK1 TANK vinculante quinasa 1

TBS-T Solución salina tamponada con tris

TLR Receptores tipo Toll

TLR Toll like receptor

TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa

TRAF Factor asociado a TNFR

TRAF3 TNF Receptor Associated Factor 3

VCAM-1 Molécula de Adhesión Celular Vascular

VHB Hepatitis B

VIH Virus de la inmunodeficiencia humana

VPH- AR Virus del papiloma humano de alto riesgo

VPH- BR Virus del papiloma humano de bajo riesgo

VPH Virus del papiloma humano

VSV Virus de la estomatitis vascular

ISGs Genes estimulados por interferón



Resumen

Introducción: La familia de factores de transcripción del factor nuclear kappa B (NF- κ B) son reguladores clave de la respuesta inflamatoria, así como de la progresión a cáncer. Se sabe que el Virus del Papiloma humano (VPH) modula la activación de la vía de NF- κ B a través de sus oncoproteínas E6 y E7. Asimismo, se ha demostrado que la proteína E1 del VPH también puede regular la vía de NF- κ B. E1 es la única proteína viral con actividad enzimática cuya función principal es en el inicio de la replicación del genoma viral. Sin embargo, se han descrito nuevas funciones para esta proteína. Nakahara y colaboradores (2015), demostraron que E1 del VPH16 activa la vía canónica y no canónica de NF- κ B, ya que aumenta los niveles y la traslocación al núcleo de p65; además de la disminución de los niveles del inhibidor I κ B α . Por otra parte, Castro y colaboradores (2019) demostraron que la expresión ectópica de la proteína E1 de diversos VPH disminuye los niveles de I κ B α y aumenta los niveles de p52, aunque a la fecha poco se ha investigado sobre los mecanismos moleculares por los cuales la proteína E1 del VPH induce la activación de las vías canónica y no canónica de NF- κ B.

Objetivo: Identificar mecanismos de vías de activación canónica y no canónica de NF- κ B inducido por las proteínas E1 de VPH de alto (VPH16) y bajo riesgo (VPH11).

Metodología: Se realizó la expresión transitoria de E1 de los VPH16 y 11 en queratinocitos humanos inmortalizados (células HaCaT). Los niveles de proteína y la localización celular de elementos de la vía canónica y no canónica de NF- κ B se evaluaron mediante Western Blot e inmunofluorescencia. Mediante análisis *in silico*, se determinaron los procesos celulares y genes asociados a este factor de transcripción NF- κ B regulados diferencialmente por E1.

Resultados: La proteína E1 del VPH16 induce aumento de los niveles elementos proteicos de la vía canónica y no canónica de NF- κ B a través de la regulación de



varios elementos, aumentando los niveles de las proteínas de activación canónica p50, p65 y no canónica p52 e induce la translocación nuclear de p50 y p52 (factores de transcripción de NF- κ B). Además, E1 induce un aumento en las cinasas activadoras de la vía no canónica NIK, y de la cinasa componente de las tanto canónica como no canónica IKK. Por otra parte, el análisis *in silico* indicó que E1 induce la desregulación de 35 genes diana de NF- κ B asociados a procesos involucrados en cáncer como evasión de la respuesta inmune, transición epitelio mesénquima y apoptosis.

Conclusión: Las proteínas E1 de los VPH16 y 11 activan las vías canónica y no canónica de NF- κ B, a través de la regulación de p50, p52, p65, IKK α y NIK, y así pudiera promover la expresión de genes que modulan procesos celulares que podrían favorecer la replicación viral, la supervivencia celular, la evasión de la respuesta inmune y la transición epitelio- mesénquima, procesos que están implicados en la carcinogénesis.



Abstract

The nuclear factor kappa B (NF- κ B) family of transcription factors are key regulators of the inflammatory response, as well as progression to cancer. Human Papillomavirus (HPV) is known to modulate the NF- κ B pathway through its E6 and E7 oncoproteins. Furthermore, it has been shown that the HPV E1 protein can also regulate the NF- κ B pathway. E1 is the only viral protein with enzymatic activity whose main function is the replication of the viral genome. However, new functions for this protein have recently been described. Nakahara, *et al* (2015) demonstrated that E1 of HPV16 activates the NF- κ B, by increasing the levels and nuclear translocation of p65, as well as decreasing the levels of the I κ B α inhibitor. Furthermore, Castro, *et al* (2019) demonstrated that the ectopic expression of the E1 protein from high and low-risk HPVs decreases the levels of I κ B α and increases p52 levels. However, to date, little has been investigated on the molecular mechanisms by which the HPV E1 protein induces activation of the NF- κ B pathway. Our goal was to analyze the molecular mechanisms by which HPV16 and 11 E1 proteins activate the NF- κ B. The methodology involved the transitory expression of HPV16 and 11 E1 in immortalized human keratinocytes (HaCaT cells). Protein levels and cellular localization of canonical and non-canonical NF- κ B pathway elements were assessed by Western Blot and immunofluorescence. Using *in silico* analysis, we determined the cellular processes and genes associated with the NF- κ B pathway that were differentially regulated by E1. our results show that the HPV16 E1 protein induces the activation of the NF- κ B pathway through the regulation of several elements, increasing the levels of p50, p52, p65 proteins and inducing the nuclear translocation of p50 and p52 (key transcription factors for NF- κ B activation). In addition, E1 induces an increase in the activating kinases, NIK and IKK. Furthermore, *the in silico* analysis indicated that E1 induces the deregulation of 35 target genes of the NF- κ B pathway associated with processes involved in cancer, such as evasion of the immune response, epithelial-mesenchymal transition and apoptosis. In conclusion, the E1 proteins of HPV16 and 11 activate the NF- κ B pathway through the regulation of



p50, p52, p65 IKK α and NIK, might promoting gene expression and thus modulating cellular processes that could favor viral replication, survival immune response, evasion, and epithelial-to-mesenchymal transition, processes that are implicated in carcinogenesis.



1. Introducción

1.1 Generalidades de NF- κ B

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) es un factor de transcripción, que controla las respuestas inmunitarias innata y adquirida (Zhang Q, *et al*, 2017). Por lo tanto, la actividad alterada de NF- κ B está implicada en diversas enfermedades, incluyendo distintos tipos de cáncer, el síndrome metabólico y las enfermedades inflamatorias, autoinmunes y neurodegenerativas (Oikawa D, *et al*, 2020). Diversos estímulos extracelulares pueden inducir la vía de activación de NF- κ B, incluyendo productos bacterianos y virales, citocinas inflamatorias, especies reactivas de oxígeno, luz ultravioleta, daño al DNA e incluso neurotransmisores (Kaltschmidt, *et al*, 2021). La familia del NF- κ B está compuesta por quince subtipos (anexo 1), incluidos RelA (p65), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p50) y NF- κ B2 (p52/p100) (Fig.1) (Lyu, *et al*, 2020). Las subunidades de NF- κ B comparten una secuencia N-terminal estructuralmente conservada, que abarca 300 residuos de aminoácidos, denominado dominio de homología Rel (RHD), que es responsable de su unión al DNA, dimerización y translocación nuclear (Lin, *et al*, 2017).

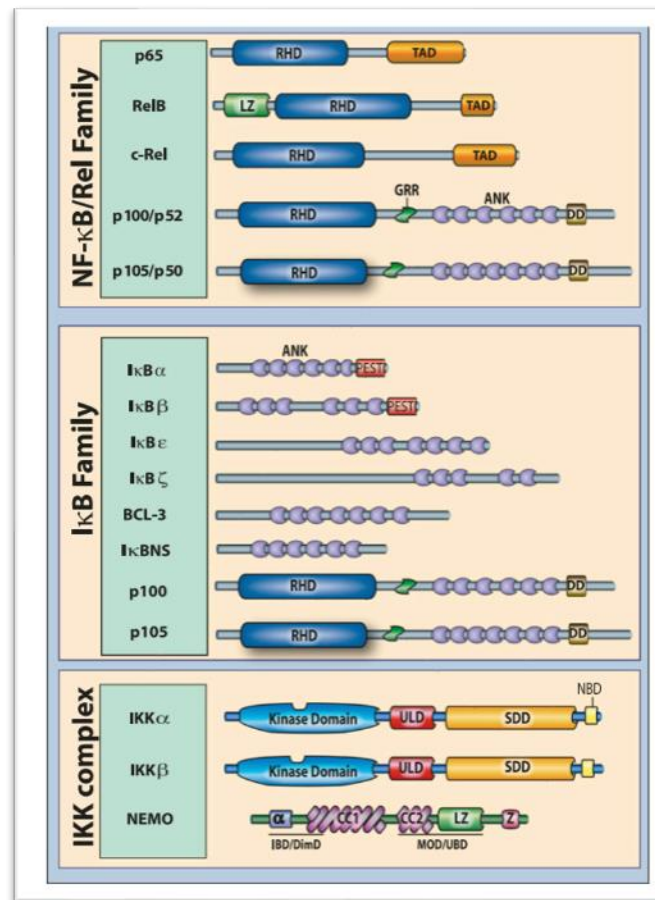


Figura 1. Componentes de la activación de la vía NF-κB

La familia de NF-κB se compone de 5 miembros RelA, RelB, C- Rel y de las proteínas precursoras p100 (p52) y p105 (p50). La familia de inhibidores IκB está conformada por IκBa, IκBb, IκBe, IκBz, BCL-3, IκBNS, p100 y p105, que se caracterizan por la presencia de múltiples dominios repetidos de anquirina. El complejo IKK consta de IKKα (IKK1 o CHUK), IKKβ (IKK2) y NEMO (IKKγ) (Tomado de Hayden, *et al*, 2012, TD Gilmore, 2006).

La vía de activación de NF-κB está implicada en la regulación de una amplia variedad de respuestas biológicas en células del sistema inmune, así como en células epiteliales (Sun, *et al* 2017). Esta promueve la expresión de más de 200 genes, los cuales están involucrados en diversos procesos celulares como supervivencia, proliferación celular, angiogénesis, respuesta inmune innata y adaptativa e inflamación (Pramanik, K. C., *et al*, 2018). La desregulación de varios



de estos procesos esta relacionados con carcinogénesis, debido a que se promueve la expresión de genes asociados con migración, invasión y metástasis (Fig. 2) (Park MH, *et al*, 2016). La activación de NF- κ B se produce a través de dos vías de señalización principales: la vía canónica y la no canónica de NF- κ B (Fig. 3) (Sun S. C. 2017).

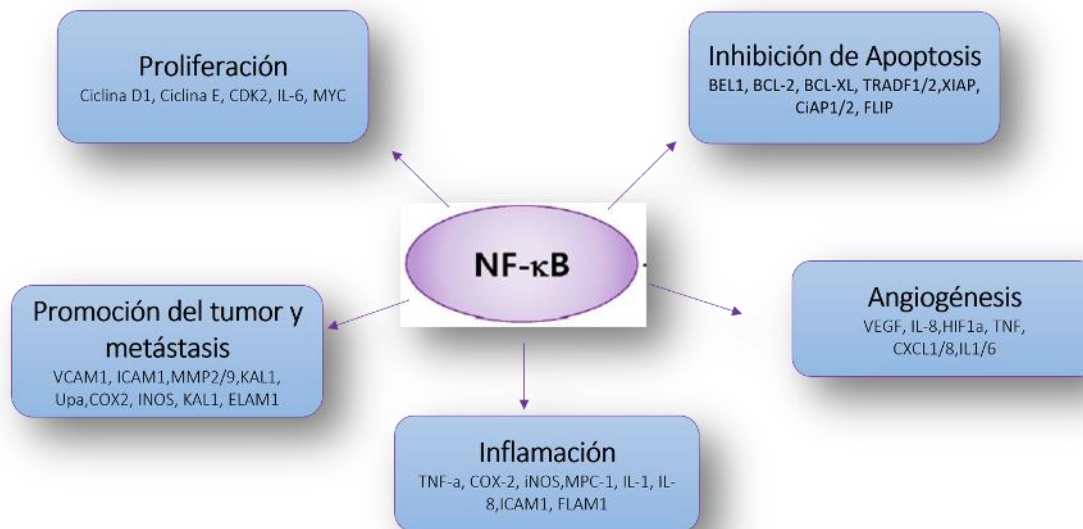


Figura 2. Procesos celulares y genes regulados por NF- κ B.

(Modificado de Chen, *et al*, 2011).

1.2 Activación de la vía canónica de NF- κ B

La activación de la vía de señalización canónica de NF- κ B (Fig. 3A) se activa mediante diversos receptores como el factor de necrosis tumoral (TNFR), receptor de interleucina 1 (IL-1R) Toll like receptors (TLR), los receptores de células B y T (BCR y TCR), entre otros (Sun S. C. 2012). La activación empieza cuando los ligandos se unen a su correspondiente receptor, lo cual desencadena la fosforilación del inhibidor de la vía (I κ B α), mediada por el complejo trimérico IKK (Demchenko YN, *et al*, 2010). Este está compuesto por dos subunidades catalíticas, IKK α e IKK β , y una subunidad reguladora, IKK γ (también denominada modulador esencial de NF- κ B o NEMO) (Williams, *et al*, 2020). IKK α induce una fosforilación de la proteína inhibidora I κ B α lo cual procede a su ubiquitinación por



SCF β -TRCP y su consecuente degradación vía proteosoma. La degradación del inhibidor I κ B ocasiona la liberación y translocación nuclear del dímero p50/p65 (RelA) permitiéndoles unirse al DNA, este complejo p50/p65 reconoce secuencias consenso en el DNA denominados κ B 5' GGGRNNWYYCC 3'. Cuando el dímero p50/RelA se acumula en el núcleo, se promueve la expresión de genes como IL8, HIF-1 α , ciclina D1, ciclina E, IL1, ICAM-1 y COX2 asociados a diversos procesos celulares como angiogénesis, proliferación e inflamación (Sun S. C. *et al*, 2001, Mitchell, *et al*, 2016, Baud V, *et al*, 2009).

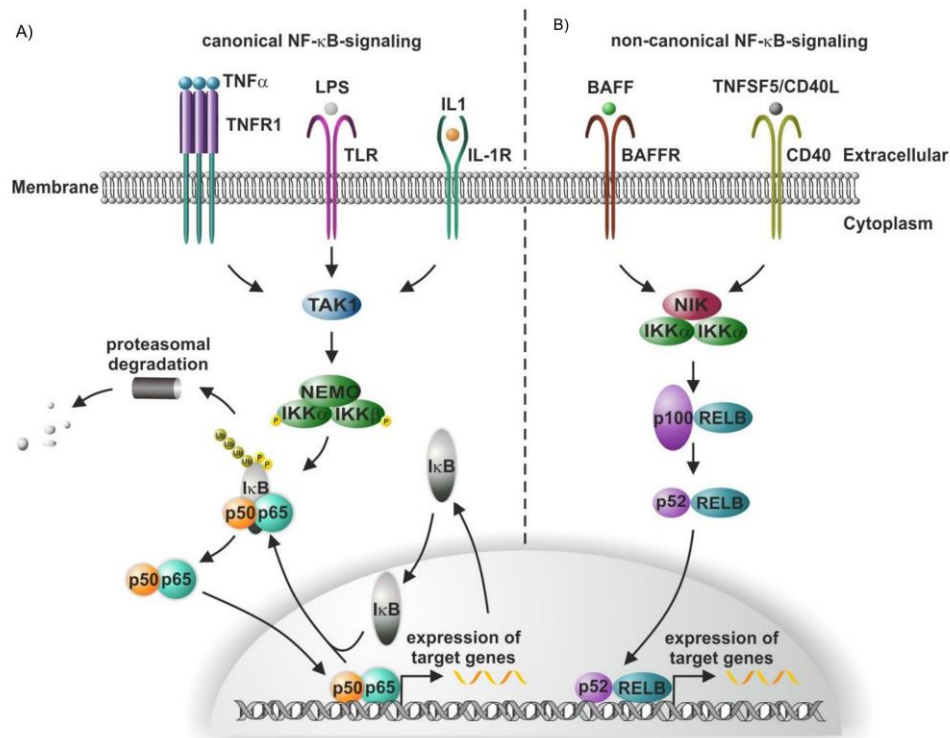


Figura 3. Descripción de las vías canónica y no canónica de activación de NF- κ B.

A) En la activación de la vía canónica se activa el complejo IKK (NEMO, IKK α , IKK β), lo que da como resultado la fosforilación y la ubiquitinación de I κ B asociado al heterodímero (p50/p65). La rápida degradación proteosomal de I κ B, la disociación de este complejo permite la translocación al núcleo de p50/p65 y con esto la unión a promotores de diversos genes diana. B) En la activación de la vía no canónica, la unión de ligandos a sus respectivos receptores, como BAFFR o CD40, conduce a la fosforilación de IKK α mediada por la cinasa inductora NIK, lo que da como resultado el procesamiento de p100 a p52, p52 y RELB se translocan al núcleo y permite el inicio de la transcripción de los genes diana (Tomado de Kaltschmidt, *et al*, 2021).



1.3 Activación de la vía no canónica NF- κ B

La activación de la vía no canónica de NF- κ B (Fig. 3B) regula la expresión de genes asociados a la organogénesis linfoide y a la activación de la respuesta inmune adaptativa (Lin, *et al*, 2017, Nogueira, *et al*, 2011). Algunos de los receptores que están descritos para la activación de la vía no canónica son el receptor activador del factor nuclear κ B (RANK), el receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2), factor inducible por factor de crecimiento de fibroblastos 14 (FN14), miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (CD27), receptores del factor de necrosis tumoral (CD30), OX40 (también conocido como CD134), Es miembro de la superfamilia del receptor TNF (CD40) y BAFFR (receptor del factor BAFF activador de células B), entre otros (Sun S. C. *et al*, 2017). La activación de la vía no canónica inicia cuando el ligando se une al receptor, lo que desencadena la fosforilación de NIK (Zarnegar, *et al*, 2007); posteriormente, NIK fosforila a IKK α e IKK β (Richmond A, *et al*, 2002, Salinas, *et al*, 2014, Miraghazadeh B, *et al*, 2018), ocasionando que fosforilen a la proteína p100 que está unida a RelB en el citoplasma (Mauro C, *et al*, 2009). La fosforilación de p100 es seguida por su ubiquitinación y esto indica su procesamiento proteolítico, liberando a p52, la cual forma un complejo heterodimérico con RelB que se transloca al núcleo en donde se unirá a su secuencia consenso 5'GGGRNNWYYCC 3' en el DNA (Nancy P. *et al*, 2008).

1.4 Regulación de la activación de la vía de NF- κ B mediada por virus

NF- κ B es un regulador esencial en la respuesta inmediata contra diversos patógenos como los virus, ya que ayuda a la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa para controlar el proceso infeccioso (Santoro, *et al* 2003). Sin embargo, se ha observado que NF- κ B se encuentra activada en distintos tumores asociados a infecciones virales (Tabla 1). Por ejemplo, el virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 (HTLV-1), a través de su proteína TAX, activa a NF- κ B mediante su interacción con la cinasa IKK y su constante autofosforilación de IKK a través de MEKK1, ocasionando la constante degradación del inhibidor de la vía (I κ B α) (HUA LI, *et al*, 1999: Xiao, 2001). Es así como TAX promueve la activación



de las vías canónica y no canónica de NF- κ B, favoreciendo la supervivencia celular y la transformación de los linfocitos T (Ducasa N, *et al*, 2021).

Por otro lado, el virus de Epstein Barr (EBV), induce la activación de NF- κ B a través de su proteína LMP1 (Greenfeld, H, *et al*, 2015). LMP1 es una proteína transmembranal que tiene 2 dominios conocidos como sitios efectores de transformación (TES) 1 y 2. Estos dominios interactúan con factores asociados al receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), y así inducen la activación de NF- κ B. A partir de análisis proteómicos de los complejos TRAF1 (Tumor necrosis factor receptor) inmunopurificados de células HEK-293 inducidas y no inducidas con LMP1, se encontró que la proteína LMP1, específicamente el dominio TES1, induce la unión de la cadena de poliubiquitina K63 a los complejos TRAF1 y TRAF2 dando como resultado la activación de la vía canónica de NF- κ B. Las proteínas TRAF son adaptadores que median la oligomerización con otras proteínas TRAF, así como su asociación con receptores o adaptadores río arriba y proteínas efectoras río abajo de la vía de NF- κ B. El grupo de trabajo Greenfeld, H. Además, reporta que la sobreexpresión de TRAF1 ocurre en múltiples tumores malignos asociados a EBV. TRAF1 es uno de los genes inducidos por LMP1 y está relacionado con la transformación primaria de células B mediada por EBV (Greenfeld, H, *et al*, 2015).

Asimismo, se ha demostrado que el VPH activa a NF- κ B. Xu y colaboradores (2010) demostraron que la oncoproteína E6 del VPH16 induce la vía de activación de NF- κ B a través de la degradación de NFX1-91 (represor de la expresión de hTERT). NFX1-91 induce la expresión de p105 (molécula inhibidora de NF- κ B); por consiguiente, cuando el complejo E6/E6AP induce la degradación de NFX1-91 se reduce la expresión del inhibidor de la proteína p105, favoreciendo la vía de activación de NF- κ B y de sus genes blanco, lo que repercute en el ciclo replicativo viral y/o en la carcinogénesis (Xu, *et al*, 2010).



Paralelamente, Boulabiar M y colaboradores (2011) analizaron, en células HaCaT la activación de NF- κ B mediada por las proteínas E2 de los VPH cutáneos α (VPH3), los tipos de bajo riesgo (HPV6 y 11) y de alto riesgo (HPV16, 18, 33 y 39), así como los β (VPH5, 8 y 9) y μ (VPH1). Los autores encontraron que la proteína viral E2 de los tres géneros de virus promueve la ubiquitinación K63 de TRAF5 y la subsecuente activación de NF- κ B mediada por TNF. Además, observaron que la proteína E2 interactúa directamente con TRAF5 y 6 facilitando su interacción con ligasas de ubiquitina o incrementando la accesibilidad de sus grupos lisina a través de cambios conformacionales, lo cual es necesario para favorecer la activación de dicha vía. La activación de NF- κ B se conservó en 11 genotipos de diversos tropismos y patogenicidad de VPH, lo que indica que es un proceso básico en la infección por VPH. Por lo que Boulabiar y colaboradores especularon que este efecto probablemente esté involucrado en la incapacidad de los queratinocitos infectados para detener la proliferación y la diferenciación, que se sabe que son necesarias para la implementación del ciclo viral reproductivo. (Boulabiar M, *et al*, 2011).

Tabla 1. Otros ejemplos de activación de NF- κ B por proteínas virales (Modificado de Rahman, *et al*, 2011).

Virus	Proteína viral	Mecanismo de modulación
Virus de la hepatitis B	HBx	Incrementa la actividad transcripcional de NF- κ B interactuando con p65, promoviendo la unión en el promotor MTA1.
Virus de Epstein Barr	gp350	Activa NF- κ B a través de gp350 la unión los receptores CD21 y TLR2, induciendo la expresión de citocinas inflamatorias.
Herpes Saimiri	HVS13	Activación de NF- κ B por señalización de vIL17R



1.5 Virus del papiloma Humano (VPH)

1.6 Clasificación de los VPHs

Se han descrito más de 240 tipos del VPH, de los cuales 40 son capaces de infectar las regiones ano genital y la región de cabeza y cuello (Egawa, *et al*, 2017, Bzhalava *et al.*, 2015)

Los VPH se han clasificado con base en su potencial oncogénico en dos grupos: los VPH de alto riesgo (VPH-AR) y los VPH de bajo riesgo (VPH-BR) (Saito, *et al* 2007) (tabla 2). Los VPH de bajo riesgo o no oncogénicos se asocian con el desarrollo de verrugas anogenitales y papilomatosis respiratoria recurrente (PRR), siendo los tipos VPH 6 y 11 los más prevalentes (Doorbar, 2017). Por otra parte, los tipos de VPH-AR se asocian con el desarrollo de diversos tipos de cáncer (Cansory, *et al*, 2006) incluidos el cáncer cervicouterino, de pene, ano, vagina, vulva y orofaríngeo siendo los tipos VPH16 y 18 los más asociados con la carcinogénesis (Yang, A, *et al*, 2016).

Tabla 2. Clasificación de los VPH según su potencial oncogénico (Muñoz, et al, 2013).

Potencial oncogénico	Características	Tipo de VPH
Bajo riesgo	Verrugas genitales benignas	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81
Alto riesgo	Cáncer de ano, pene, orofaríngeo, cervicouterino, vulva y vagina.	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82

1.7 Estructura

Los VPH pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, sin envoltura, que tienen un diámetro de aproximadamente de 55 nm y presentan una cápside con estructura icosaédrica constituida por 72 capsómeros (Crosbie, *et al*, 2013).

1.8 Genoma

El genoma de los VPH está compuesto por DNA bicatenario de aproximadamente 8000 pb, dividido en tres regiones: la región larga de control (LCR), la región de



genes que se expresan tempranamente (E) y la región de genes de expresión tardía (L) (Fig.4) (Pinatti, *et al*, 2018).

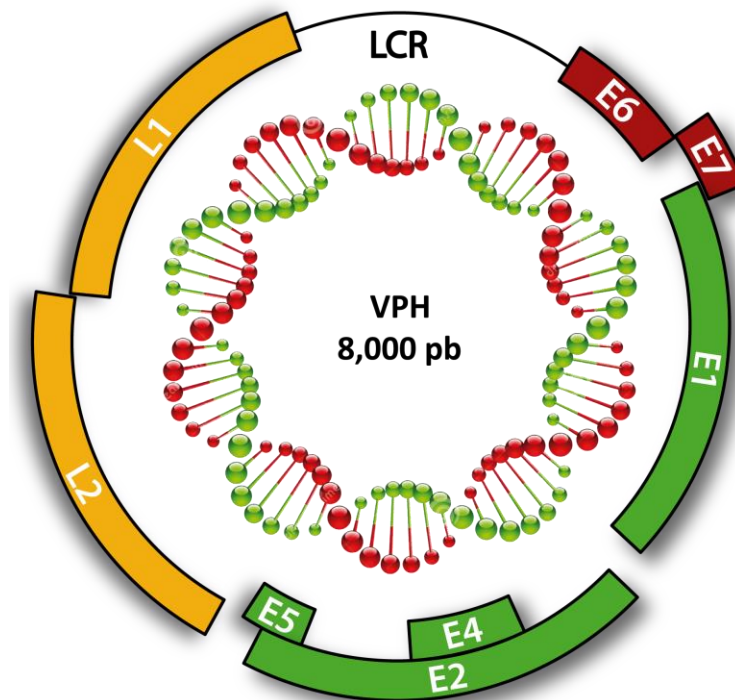


Figura 4. Organización del genoma del Virus del Papiloma Humano

Se muestran los genes de expresión temprana E6 y E7 (rojo) y E1, E2, E4 y E5 (verde), los genes de expresión tardía L1 y L2 (naranja), así como muestra la región larga de control LCR o URR (Upstream regulation region) (Nagayasu, *et al*, 2015).

La región larga de control (LCR) es una región no codificante, que contiene elementos necesarios para favorecer la replicación viral (Ori) y la transcripción (McBride, *et al*, 2008). Esta región cuenta con un promotor temprano, *enhancer*, un promotor tardío y sitios de unión a factores de transcripción celulares y virales como AP-1, NF-1, Oct-1, TFIID, Sp1, MSPF, GR y TEF-1, E2 y E1 (Martínez-Ramírez, *et al*, 2017).

La región de genes tempranos (E) codifica para seis proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (tabla 3), que son necesarias para favorecer el ciclo replicativo del virus y algunas de ellas están involucradas en la carcinogénesis (Szymonowicz, *et al*, 2020).



Finalmente, la región de genes tardíos que codifica para las proteínas estructurales L1 y L2 que forman la cápside viral y participan en la generación de nuevos viriones (Buck, *et al*, 2013).

Tabla 3. Función de las proteínas del VPH.

Proteína	Función
L1	Proteína que forma parte de la cápside viral en menor proporción que L2, está involucrada en la internalización del virus, así como también facilita la formación de la cápside del genoma viral (Joshua W. Wang, <i>et al</i> , 2013).
L2	La principal proteína de la cápside del VPH, la cual está involucrada en la internalización del virus y también media su importación al núcleo (Christopher B. Bucka, <i>et al</i> , 2013).
E1	Es una DNA helicasa hexamérica, la cual inicia la replicación del genoma viral. E1 se requiere a lo largo del ciclo de replicación viral (Monika Bergvalla, <i>et al</i> , 2013). Esta proteína tiene participación fundamental en la regulación de la expresión de genes celulares (Castro Muñoz, <i>et al</i> , 2019).
E2	Es una proteína multifuncional, entre sus principales funciones esta la transcripción y replicación del genoma viral. Además, actúa como represor transcripcional de los oncogenes E6 y E7 (Alison A. McBride, 2013).
E4	Facilita la liberación de los viriones colapsando el citoesqueleto de actina de la célula huésped. También retarda la progresión del ciclo celular en la fase G2 (Doorbar. 2013).
E5	Regula la inhibición de la expresión del complejo mayor histocompatibilidad I (MHC I) y su retención (Aldo, <i>et al</i> , 2011). Interrumpe la maduración del MHC de clase II al inhibir el procesamiento endosomal del componente de cadena invariable de MHC II (Daniel, <i>et al</i> , 2013). E5 interactúa con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), para estimular la proliferación celular (Daniel, <i>et al</i> , 2013).
E6	Promueve la degradación de p53 a través de su interacción con la proteína celular E6AP (Ketaki Ganti, <i>et al</i> , 2015). Además, E6 puede mediar la apoptosis de las por BAK y TNF, Así mismo, puede inducir proliferación a través de la vía MAPK, además de que E6 puede activar al promotor hTERT de forma constitutiva (Pal A, <i>et al</i> , 2019).
E7	Induce la degradación de pRb por lo que se libera el factor E2F y se activa la transcripción de los genes regulados por dicho factor, estimulando la transición de la célula de la fase G0 a G1, y posteriormente a la fase S (Arushi, <i>et al</i> , 2021) E6 y E7, inducen transición epitelio mesénquima (Pal A, <i>et al</i> , 2019). E7 interactúa con proteínas como p107 y p130 a través de una secuencia LXCXE, estas proteínas controlan ciclo celular, así, como otras funciones celulares, por otro lado, también se ha reportado que E7, interactúa con HDACs y HATs (Liu, <i>et al</i> , 2008).



1.9 Proteína E1 del VPH

Una de las proteínas de los VPH que participa durante su ciclo replicativo es la proteína E1, la cual es la proteína más grande y conservada de estos virus (Hughes, *et al*, 1993, Blitz, *et al*, 1991). Está compuesta por 593 a 681 aminoácidos, presentado un peso molecular de alrededor de 67 a 72 kDa dependiendo del tipo viral (Wilson, *et al*, 2002).

Esta proteína está dividida en 3 segmentos funcionales (fig.5): la región amino terminal (N-terminal), el dominio de unión a DNA y la región carboxilo terminal.

La región N-terminal está compuesta por aproximadamente 200 aminoácidos y es el segmento menos conservado de la proteína (Enemark, *et al*, 2000). Contiene una señal de localización nuclear (NLS) bipartita y una señal de exporte nuclear (NES) dependiente de Crm1, un motivo de unión a ciclina (CBM), que interactúa con las ciclinas A y E en conjunto con la cinasa 2 dependiente de ciclina (Cdk2). Además, el N-terminal contiene los sitios de fosforilación para Cdk2 y otras cinasas (Bergvall, *et al*, 2013).

El dominio de unión al DNA (DBD por sus siglas en inglés) reconoce secuencias específicas en el origen de replicación "Ori" de la LCR, la cual es una secuencia palindrómica consenso, 5'-ATTGTT-3', rica en AT posicionada en la LCR (Bergvall, *et al*, 2013, Deng, *et al*, 2004, Ishii, *et al*, 2020)

El extremo carboxilo terminal (C-terminal) es el más conservado de las proteínas E1 y el de mayor tamaño. Contiene un dominio de helicasa (DH) dependiente de ATP, necesaria para la replicación, un dominio de oligomerización (O) necesario para oligomerizarse ya sea en un doble trímero o hexámero (Côté-Martin *et al*, 2008, Erick J. Enemark, *et al*, 2006). Como parte final, la proteína E1 contiene una porción llamada brazo, la cual es una secuencia corta flexible que juega un papel en el montaje de la proteína E1 y proporciona estabilización del hexámero E1 sobre el DNA (Hughes, *et al*, 1993).

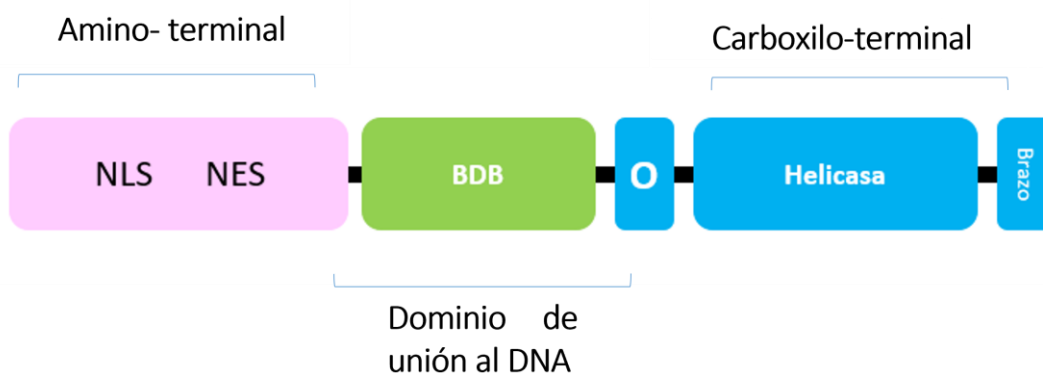


Figura 5. Estructura de la proteína E1 del VPH.

La proteína E1 se encuentra conformada por tres dominios. En el dominio amino terminal se encuentra la secuencia de importación que permite el ingreso de E1 en el núcleo de la célula infectada y exportación. El dominio de unión al DNA (DBD) con una estructura de asa y una de hélice de unión al DNA cargadas positivamente. Finalmente, se encuentra el dominio carboxilo terminal que se puede dividir en tres regiones: la región de oligomerización (O), la región con actividad enzimática helicasa y la región de unión e hidrólisis de ATP, al final se encuentra una región conocida como brazo que estabiliza el oligómero de E1. Bergvall, *et al*, 2013.

1.10 Función de la proteína E1

Hasta el momento la función más descrita de la proteína E1 es en inicio la replicación del genoma viral (fig. 6) (Bonne, *et al*.1995). El proceso de replicación del genoma viral se inicia cuando la proteína E1 se une a la región ori en la LCR (Rangasamy, *et al*, 2000). Para que E1 se posicione establemente necesita de la proteína E2, tras lo cual se induce el ensamblaje de la proteína E1 formando el complejo ternario E2-E1-origen de replicación (Chiang, *et al*, 1992; Bergvall *et al*, 2013.). El complejo ternario permite el reclutamiento de más unidades de proteína E1 y también de una molécula de ATP, esto permite que se forme un doble trímero de las proteínas E1. Posteriormente se reclutan más proteínas E1 formándose un hexámero que se localiza en cada una de las cadenas de DNA; finalmente, se lleva a cabo la hidrólisis del ATP para la formación de la horquilla de replicación y el reclutamiento de proteínas de la maquinaria de replicación donde E1 interactúa directamente con el complejo de DNA, la polimerasa α -primasa (Pol α -prim), la proteína A de replicación de unión al DNA de cadena sencilla (RPA) y la



topoisomerasa I (Topo I) (Auster, *et al*, 2004, Bonne, *et al*, 1995). Se ha descrito, además, que E1 interactúa con proteínas asociadas a procesos epigenéticos. Por ejemplo, se demostró que E1 del VPH11 interactúa con la histona H1 (Scott Swindle, *et al*, 1998). Por otro lado, también se observó que E1 del VPH18 interactúa con hSNF5, subunidad del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF, necesario para favorecer la replicación del genoma viral (Lee, *et al*, 1999).

Además de su papel en la replicación del genoma viral, en los últimos años se ha reportado que E1 puede presentar otras funciones, como la regulación de la expresión de genes celulares (castillo, *et al*, 2014, Castro-Muñoz *et al*, 2019, Baedyananda, *et al*, 2022) y que podría estar involucrada también en la carcinogénesis (Baedyananda, *et al*, 2017). Se ha observado que el mensajero de E1 se expresa a lo largo de la historia natural de la infección por VPH, alcanzando sus niveles más altos en cáncer cérvico uterino en comparación con lesiones premalignas, lo cual podría indicar un posible papel en la carcinogénesis cervical (Baedyananda, *et al*, 2017). Sin embargo, a la fecha no hay más estudios que profundicen acerca del posible papel de la proteína E1 en la carcinogénesis.

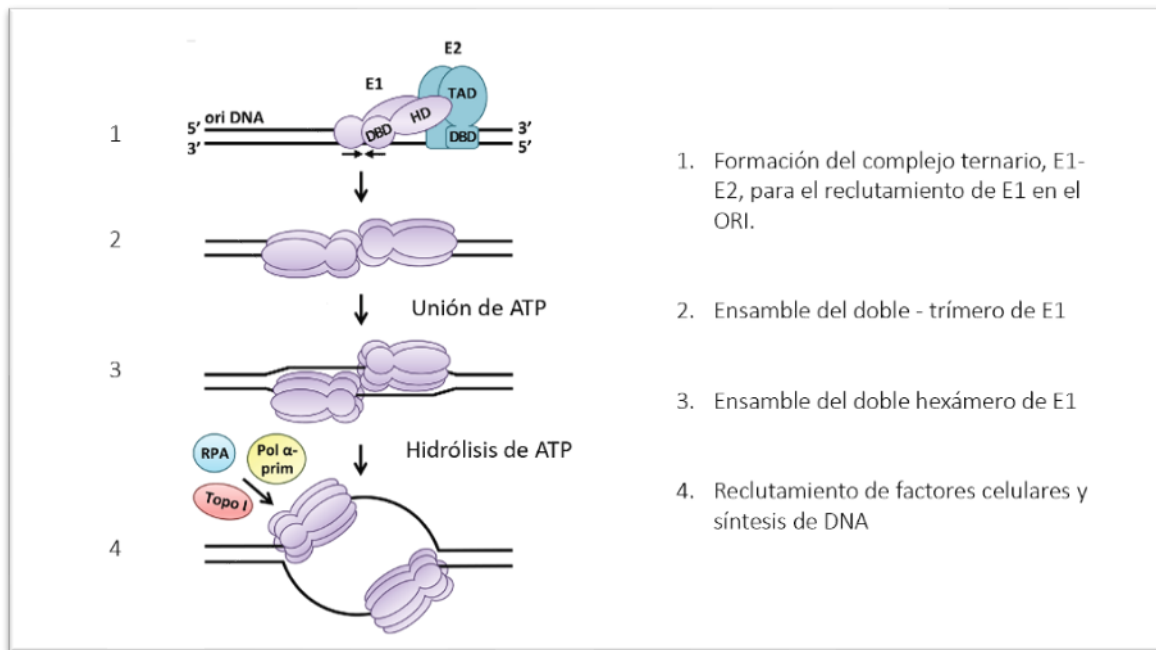


Figura 6. La proteína E1 durante la replicación del genoma viral.

La replicación del genoma viral inicia con el reclutamiento de la proteína E1 al sitio de origen en la LCR con ayuda de la proteína E2, resultando la formación 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 moléculas 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 (Modificado de Bergvall *et al*, 2013)



2. Antecedentes

Anteriormente se pensaba que la única función de E1 del VPH era en el inicio de la replicación del genoma viral; sin embargo, diversos reportes han indicado que E1 interactúa con modificadores de la cromatina, lo cual sugiere que pudiera estar involucrado en otros procesos como la regulación de la transcripción de genes celulares (Lee D, *et al*, 1999, Das D, *et al* 2019). En este sentido, Castillo y colaboradores (2014), demostraron el papel de E1 en la regulación de la expresión de genes celulares, mediante el silenciamiento del RNAm de E1 en las células HeLa positivas VPH18, examinando los cambios en los niveles de los RNAm a través de un análisis de microarreglos. De esta manera identificaron 2669 genes expresados diferencialmente tras el silenciamiento de E1, de los cuales 1718 genes celulares fueron regulados al alza y 951 regulados a la baja. Además, identificaron que los genes desregulados están involucrados en la señalización de TLR, la vía de señalización de IFN, el ISG antiviral y la apoptosis. De esta manera, sus resultados demuestran que E1 también tiene un efecto sobre la disminución de elementos de la respuesta inmune antiviral (Castillo, *et al*, 2014).

Por otro lado, Nakahara y colaboradores (2015) transfectaron E1 del VPH16 en una línea celular de queratinocitos cervicales humanos, observando que E1 reduce los niveles proteicos de I κ B α , inhibidor de la vía de NF- κ B, y aumenta los niveles proteicos y la translocación de p65, posterior a la activación de NF- κ B. Asimismo, se había reportado que E1 promueve el daño al DNA (Moody, *et al*, 2009), y Nakahara y colaboradores observaron que E1 induce la activación de NF- κ B al activar vías de respuesta de daño al DNA (DDR) a través de las proteínas ART/ATM (del inglés Ataxia telangiectasia mutated/ATM and RAD3-related). Además, sus resultados sugieren que la actividad de NF- κ B está involucrada con la regulación de la expresión de E1 con el fin de mantener un número limitado de copias del genoma del virus, y a su vez la activación de NF- κ B es inducida por E1 del VPH16 indicando que existe una retroalimentación negativa (Nakahara, *et al*, 2015).



Recientemente, nuestro grupo de investigación analizó el efecto de la expresión ectópica de E1 de los VPH16, 18 y 11 en la línea celular de queratinocitos inmortalizados HaCaT. Mediante RNAseq, se demostró que las proteínas E1 de los VPH16, 18 y 11 inducen cambios en la expresión de genes celulares, donde E1 del VPH16 desregula a un mayor número de genes (302 genes), en comparación con E1 del VPH18 (86 genes) y del VPH11 (72 genes). También se encontró que las proteínas E1 de los diferentes tipos virales pueden modular genes implicados en la respuesta inmune antiviral tales como IFN β 1 e IFN λ 1, así como de los ISGs. Además, interesantemente encontraron que E1 del VPH16 y E1 del VPH18 regularon la expresión de genes asociados a la transformación celular (*FOSB*, *DUSP6*, *NR4A* y *CCNA1*). Para entender la disminución de la expresión IFN por E1 se analizó si la vía de NF- κ B podría verse afectada por E1 y así alterar los niveles de IFN. Adicionalmente, se reportó que las proteínas E1 del VPH de alto y bajo riesgo disminuyen los niveles del inhibidor I κ B α , elemento clave en la vía de activación canónica de NF- κ B. Por otra parte, se demostró que los niveles de la proteína p52, producto del procesamiento de la proteína p100, aumenta sus niveles en presencia de tres tipos virales, E1 de VPH16, 18 y 11; estos resultados indican que NF- κ B se encuentra activa (Castro-Muñoz, *et al*, 2019). Sin embargo, los mecanismos por los cuales E1 induce la activación de la vía de NF- κ B y la función que tiene en el ciclo replicativo y/o en la carcinogénesis han sido poco explorados (Castro Muñoz, *et al*, 2019).



3. Justificación

Diversos virus oncogénicos son capaces de activar las vías canónica y no canónica de NF- κ B, favoreciendo tanto su ciclo replicativo viral como la carcinogénesis, esto debido a su capacidad de regular diversos componentes de la vía. Se ha determinado que la proteína E1 del VPH es capaz de activar tanto la vía canónica y posiblemente la no canónica de NF- κ B; sin embargo, los mecanismos por los que E1 del VPH activa las vías canónica y no canónica NF- κ B han sido poco estudiados. Por ello resulta importante comprender los mecanismos involucrados en la activación de NF- κ B, así como qué genes y procesos celulares asociados a la vía de activación NF- κ B se regulan en presencia de la proteína E1 del VPH16, los cuales podrían impactar tanto en ciclo replicativo viral como en la carcinogénesis.

4. Hipótesis

La proteína E1 del VPH16 y 11 activa las vías canónica y no canónica de NF- κ B a través del aumento de proteínas activadoras, lo cual favorecerá la expresión de genes involucrados en procesos celulares asociados a proliferación, migración y apoptosis.

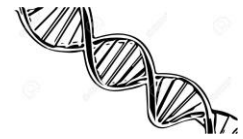
5. Objetivos

General:

Identificar mecanismos de vías de activación canónica y no canónica de NF- κ B inducido por las proteínas E1 de VPH de alto (VPH16) y bajo riesgo (VPH11).

Específicos:

1. Evaluar los niveles y localización de las proteínas p50, p52 y p65 en presencia de la proteína E1 del VPH16 y 11.
2. Analizar los niveles de la cinasa IKK α/β y de NIK en presencia de E1 del VPH16 y 11.
3. Evaluar la localización de la proteína cinasa IKK α/β en presencia de E1 del VPH16 y 11.

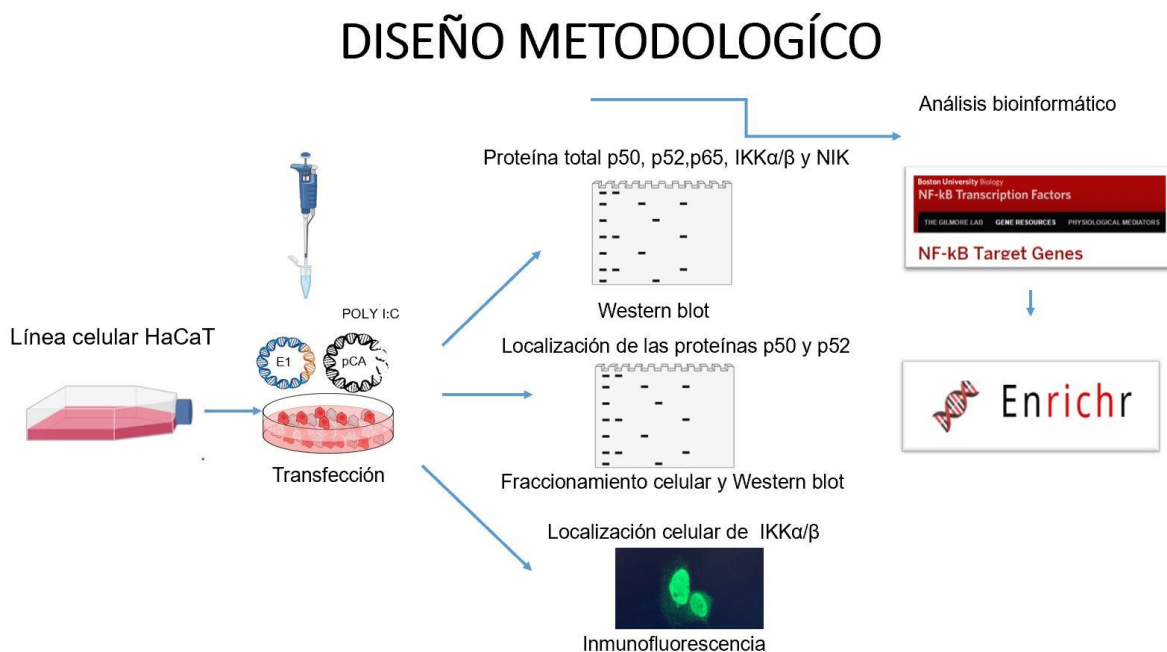


4. Identificar posibles genes blanco y los procesos celulares del factor transcripcional NF- κ B desregulados en presencia de E1 del VPH16 (*in silico*).



6. Materiales y Métodos

6.1 Diseño experimental



6.2 Línea celular

Se empleó la línea celular HaCaT, que es una línea celular adherente de queratinocitos humanos immortalizados. Las células se mantuvieron en medio Eagle de Dulbecco modificado F12 (DMEM-F12) enriquecido con suero fetal bovino al 10%. Las células fueron incubadas a 37° C en una atmosfera húmeda con 5% de CO².

6.3 Plásmidos

Se emplearon los plásmidos para la expresión de la proteína E1 pMHPV16 E1HA y E1 pMHPV16 E1HA, el fragmento clonado de E1 contiene en su extremo amino un tag-HA para la identificación de la proteína recombinante. El plásmido fue donado amablemente por el Dr. Mart Ustav, Institute of Molecular and Cell Biology, Institute of Technology, University of Tartu, Estonia. Como control negativo de la transfección empleamos el plásmido pCA, la característica de este plásmido es que no contiene secuencias codificantes para E1.



6.4 Transformación bacteriana

Para esta técnica se emplearon células competentes de la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. El método de transformación utilizado fue mediante choque térmico. En tubos eppendorf de 1.5 se agregaron 100 ng del plásmido de E1 del VPH16 y se le agregaron 200 μ l de las bacterias competentes DH5 α , se incubaron durante 30 min en hielo para posteriormente dar el choque térmico al pasarlo a una temperatura de 42 °C por 2 Min para finalmente pasarlo a hielo durante 5 min. Al tubo se le añadieron 800 μ l de medio LB estéril y se incubó 1 h a 37 °C en agitación a 300 rpm. Para verificar que la transformación celular se haya realizado de manera correcta, las bacterias fueron sembradas en placas de agar LB suplementadas con 100 μ g/mL de ampicilina como medio de selección y se incubaron a 37 °C toda la noche para la obtención de las colonias transformantes.

6.5 Transfección

Después de obtener los plásmidos purificados, estos fueron cuantificados mediante el espectrofotómetro NANODROP 2000 de Thermo Fisher. Dependiendo del experimento a realizar (extracción de RNA, extracción de proteínas totales, fraccionamiento nuclear) se estandarizaron distintas cantidades de plásmido. Para validar la transfección mediante WB, primero se sembraron 350,000 células HaCaT en una placa de 60 mm (P60), se incubaron 24 h para permitir la adherencia y una confluencia aproximadamente del 70%. Una vez en estas condiciones se preparó una mezcla con 100 μ l medio sin suero, 4.5 ug del plásmido (PCA y E1 VPH16 y11) y 8 μ l de Polyfectamina (QIAGEN) el cual es un dendrímero activado que permite la transfección. Esta mezcla se incubó durante 25 min para posteriormente agregarla sobre la placa 60 mm con las células HaCaT al 70 % de confluencia con medio fresco. Se realizó la extracción de proteínas totales 24 h post-transfección.

6.6 Obtención de RNA y síntesis de cDNA

Se transfectaron 4.5 ng de los plásmidos pCA, E1VPH16 y E1VPH11 en 1 placa de 60 mm con células HaCaT a una confluencia del 70%. Después de las 24 h postransfección se obtuvo el RNA total de cada condición empleando el RNeasy



mini kit (QIAGEN). El RNA obtenido de la extracción se resuspendió en 30 μ l de H₂O libre de RNAsas, posteriormente fue tratado para asegurar la eliminación del DNA con el kit DNase Free DNA removal kit (Thermo Fisher Scientific). Se utilizaron 400 ng de RNA para la reverso transcripción (RT) empleando Oligo dT utilizando el kit GeneAmp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems, Foster City). La expresión de E1 del VPH 16 fue verificada por PCR punto final y observada en geles de agarosa. Los *primers* utilizados se presentan en la tabla 4.

Tabla 4.Lista de *primers* usados.

Gen	Forward 5'	Reverse 3'
E1 VPH16	GGTTACAACCATTAGCAGAT	ACCAATGGTCTATGCTTTAC
E1 VPH11	GTGTACAGGATGGTTTATGG	TGTCATCAATAAAGTCCACC
18S	AACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

6.7 Western Blot

Para evaluar cambios en los niveles de proteína en las distintas condiciones se obtuvieron las proteínas a partir de las células HaCaT transfectadas. Dependiendo del objetivo se realizó extracción de proteínas totales, o fraccionamiento celular.

6.8 Extracción de proteína totales

Para la obtención de proteínas totales se aspiró el sobrenadante de las placas de las diferentes condiciones, se realizó un lavado con PBS y se retiró el sobrenadante, finalmente se le agregó 500 μ l de Laemli 2X con β -mercaptoetanol y con ayuda de un raspador se raspó la monocapa de células para despegarlas de la placa, finalmente se tomó todo el líquido con las células resuspendidas y se agregaron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Para favorecer la lisis se agitó por intervalo de 10 min; además el volumen total se hizo pasar por una jeringa de 1 mL 10 veces y se dio un choque térmico al exponerlos a 60 °C durante 10 min para posteriormente ponerlos en hielo. Los tubos se resguardaron a -20 °C hasta su análisis.



6.9 Fraccionamiento celular

Para la obtención y análisis de proteínas nucleares se empleó un protocolo de fraccionamiento celular. Para ello empleamos placas P100 con células HaCaT aproximadamente al 70% de confluencia, a partir de las 24 h post-transfección, se procedió a lavar las células con PBS y posteriormente se resuspendieron en 300 μ l de buffer de lisis (Tris 10 mM pH 6.5, Na₂S₂O₅ 27 mM, Triton X-100 al 1%, MgCl₂ 10 mM, sacarosa 25 mM y cóctel de inhibidores de proteasas) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml donde se incubaron durante 10 min en hielo, dando ligeros golpes cada 3 min. Pasando el tiempo las muestras se centrifugaron a 3500 rpm a 4 °C durante 10 min, al final se obtuvieron dos fases, el sobrenadante correspondía a la fracción citoplasmática, mientras que la pastilla correspondía a la fracción nuclear. La pastilla se lavó 2 veces con PBS para eliminar las posibles trazas de citoplasma, posteriormente dicha pastilla se resuspendió en un buffer de extracción (HEPES 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM pH 8.0, EGTA 0.1 mM pH 8.0 y cóctel de inhibidores de proteasas) se centrifugó usando un gradiente de sacarosa a 0.34M para la obtención de núcleos. Los núcleos obtenidos fueron empleados para obtener un extracto nuclear o bien para obtener un extracto enriquecido con histonas. Para obtener el extracto nuclear la pastilla se resuspendió en 50 μ l de buffer RIPA (Tris 100 mM pH 8.0, NaCl 250 mM, Nonidet P40 al 0.5% y cóctel de inhibidores de proteasas) y se incubó durante 30 min, durante este tiempo se agitó la muestra cada 3 min para favorecer la lisis.

6.10 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE)

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



7. Transferencia

Después de la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de nitrocelulosa con poros de 0.2 μm (BioRad) en una cámara de transferencia húmeda con buffer de transferencia al 10x (glicina 72.1 g, Tris 15.15g y H₂O 500 mL, agregándole el 20% de metanol al aforarlo al 1X) frío a 100 V durante 1 hora 30 min. Para verificar que la transferencia ocurrió de manera correcta teñimos la membrana con rojo de Ponceau, esta solución se une al extremo amino de las proteínas, una vez visualizado el patrón de las proteínas en la membrana se lavó con TBS-T (Tris 30.3 g, NaCl 87.7 g, KCL, 2.0 g y Tween 20 10 mL) hasta eliminar el colorante.

7.1 Bloqueo de membrana e incubación de anticuerpos primarios y secundarios

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

7.2 Anticuerpos

En la siguiente tabla se muestran los anticuerpos primarios y secundarios que se utilizaron, marca/catálogo, así como la especie y diluciones que se utilizaron:

Tabla 5. Lista de anticuerpos usados.

Anticuerpo	Marca comercial	Especie	Dilución
NIK	Santa Cruz-8417	Mouse	1:500
IKK	Sigma Aldrich	Rabbit	1:250
I κ B α	Santa Cruz-1643	Mouse	1:500
P50	Santa Cruz-8414	Mouse	1:500
P65	Abcam 28856	Rabbit	1:500



P52	Santa Cruz-7386	Mouse	1:500
HA	Cell signalling C29F4	Rabbit	1:100
HA	Roche 12CA5 030220	Mouse	1:50
GAPDH	Santa Cruz	Mouse	1:1000
H3 total	Abcam ab1791	Rabbit	1:50,000

7.3 Análisis estadístico

Los datos que muestran los efectos de E1 del VPH16 y 11 en los diferentes ensayos, son presentados como promedios \pm DE. El valor de p se calculó mediante la prueba ANOVA. Las diferencias fueron consideradas significativas con el valor de $p \leq 0.05$, para determinar si existe cambio estadístico significativo de la condición experimental frente al control.

7.4 Ensayo de inmunofluorescencia

La línea celular HaCaT fue cultivada sobre cubreobjetos esterilizados y transfectada, según el experimento. Post-transfección a las 24 h las células fueron lavadas con PBS y fijadas con una solución al 2% de paraformaldehído en PBS durante 15 min a temperatura ambiente en agitación y cubiertas de la luz. Después de 3 lavados de 5 min en agitación con PBS, las células se permeabilizaron con una solución de tritón al 0.25% en PBS por 10 min a temperatura ambiente en agitación, tras lo cual se lavaron nuevamente tres veces con PBS durante 5 min en agitación seguido de tres lavados con glicina 0.1 M. Al finalizar los lavados, se incubaron las células con los anticuerpos primarios a una dilución 1:50 en PBS en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios acoplados a los fluoróforos Alexa 488, Rodamina, Alexa 555 y Alexa 647 en una dilución 1:700 en PBS, en cámara húmeda por 0.5 h a 37°C tapadas de la luz. Transcurrido el tiempo, se realizaron 3 lavados de 5 min c/u en agitación con PBS y un lavado de 5 min c/u en agitación con agua. Finalmente, para el montaje de las inmunofluorescencias, se retiró el exceso de agua de los cubreobjetos, se montaron sobre portaobjetos con una gota



de medio de montaje con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, ProLong® Diamond Antifade Mountant with DAPI, Molecular Probes, P36962), tras lo cual se guardaron a 4°C tapadas de la luz hasta su observación en el microscopio. Las microfotografías fueron capturadas con un microscopio de epifluorescencia EVOS FL (Thermo Fisher Scientific). Las inmunofluorescencias se realizaron para detectar la expresión y co-expresión de E1 e IKK.

7.5 Análisis bioinformático

El análisis bioinformático se llevó a cabo utilizando la base de datos bioinformática NF- κ B *target* genes (<https://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>) utilizando la base de datos del RNASEQ de E1 de VPH16 publicados por Castro *et al.*, 2019, una vez que teníamos los genes estadísticamente significativos, $P < 0.05$, utilizamos la base de datos Enrich (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) que recopila todos los genes asociados a la vía de, que fueron 397 genes. De estos, 35 fueron desregulados por E1 del VPH 16 (26 sobreexpresados y 9 subexpresados).



8. Resultados

8.1 Niveles de la proteína E1 del VPH16 y 11 en células HaCaT

Para evaluar los mecanismos por los que E1 del VPH16 y 11 activan la vía de NF- κ B en la línea celular HaCaT, se estableció un sistema de expresión exógena transitoria. Las células HaCaT se transfectaron con plásmidos que codifican para la proteína E1 del VPH16 o VPH11, así como el vector pCA (control). Como control positivo para la activación de la vía NF- κ B, se empleó la transfección con Poly I:C.

Para identificar a la proteína E1, se utilizó el anticuerpo contra -HA, debido a que actualmente no existe un anticuerpo comercial contra la proteína E1; el plásmido que utilizamos contiene una cola de HA el cual nos permite la identificación de E1. 24 h post transfección se obtuvieron extractos totales y se evaluaron los niveles de la proteína E1 del VPH16 y 11 mediante WB. En la fig.7 se muestra la presencia de las bandas de aproximadamente 72 kDa correspondiente al peso molecular de la proteína E1, mientras que esta banda está ausente en el control (pCA) (Fig.7).

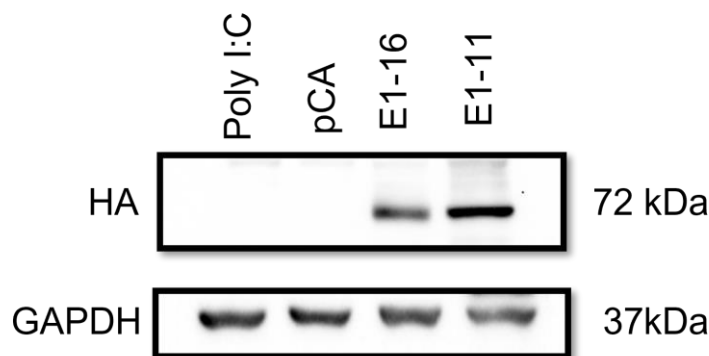


Figura 7. Niveles de E1 del VPH16 y 11 en línea celular HaCaT

(Verificación del sistema: transfección transitoria)

Células HaCaT transfectadas con E1 del VPH16, 11 y plásmido control pCA. 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 72kDa que corresponde al peso de E1 la cual se no observa en el control (pCA). La expresión de GAPDH fue empleada como control de carga, se realizó por triplicado.



8.2 La expresión de la proteína E1 del Virus del Papiloma Humano aumenta los niveles de las proteínas p65, p50 y p52.

Una vez establecido nuestro sistema y verificando que la proteína E1 del VPH16 y 11 se expresa adecuadamente, se procedió a analizar los niveles de las proteínas de los elementos del factor transcripcional canónico p65, p50 y el no canónico p52 p65, p52 y p50 mediante Western blot. Para lo cual se obtuvieron extractos totales de células HaCaT transfectadas con E1 del VPH16,11, pCA y Poly I:C durante 24 h. Se observa que en presencia de E1, existe un aumento de los niveles de p65, p50 y el no p52 en comparación con el control pCA, indicando que la proteína E1 del VPH16 activa la vía canónica y la no canónica de NF- κ B (Fig.8A). Además, usamos un control positivo que es Poly I:C el cual favorece la vía de activación de de NF- κ B a través de su unión con el receptor TLR-3, dado que es un análogo de RNA viral. Como se puede observar en la figura, que existe un aumento en los elementos proteicos analizados en relación con el control pCA. La Fig.8B muestra los gráficos del promedio del dos experimentos, donde observamos una tendencia al aumento de p65 y p52 en presencia de E1 del VPH 16, sin embargo, el experimento deberá repetirse una vez más para poder tener la significancia estadística. En el caso de p50, se lograron realizar 3 experimentos, con lo que se observa un aumento significativo en presencia tanto de E1 de VPH 16 como de VPH 11, comparado con el control pCA, inclusive el aumento es mayor que con el control positivo poly I:C. Con esto aportamos evidencia de que E1, particularmente E1 del VPH16 podría activar la vía tanto canónica como no canónica de NF-kB.

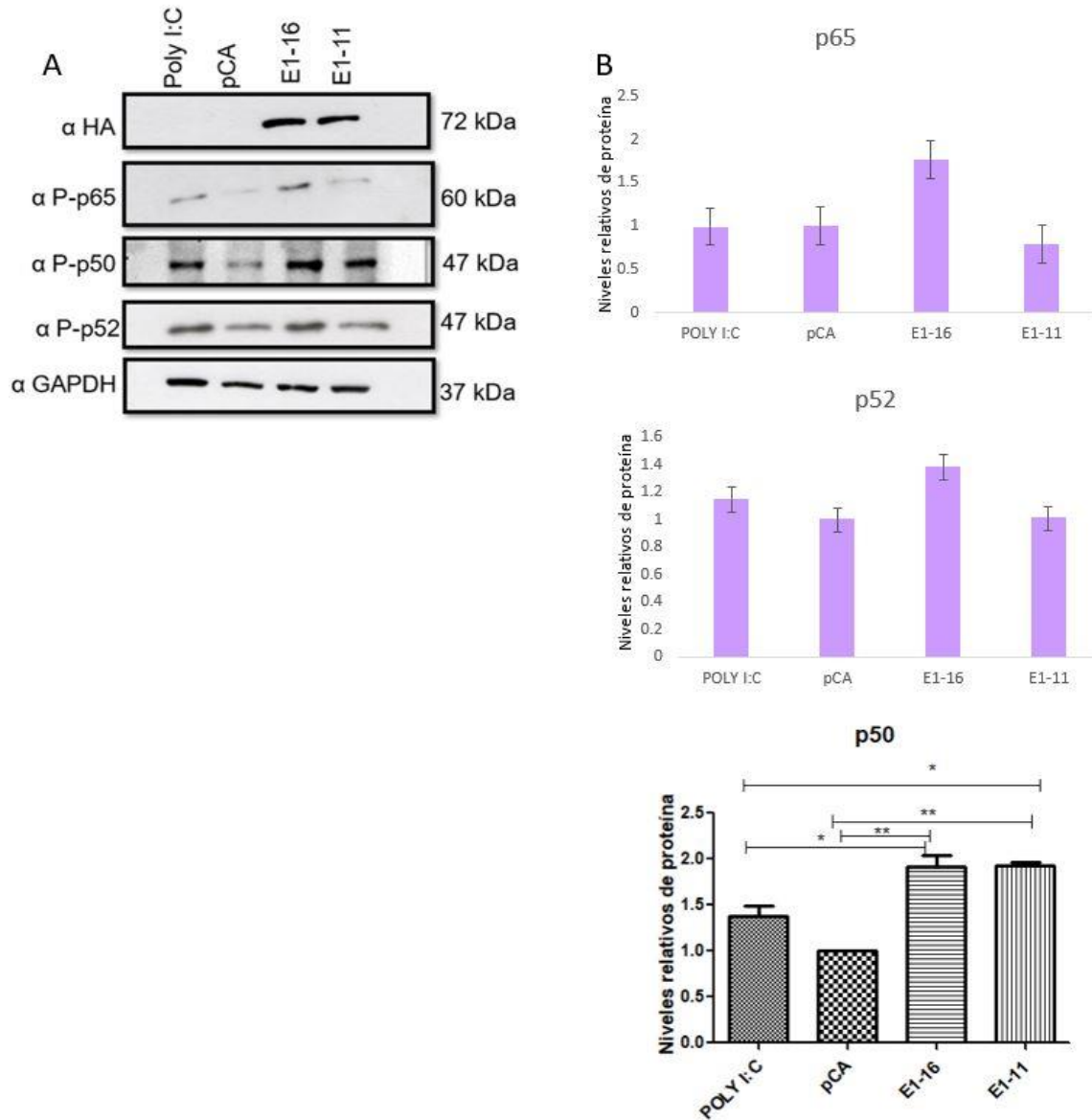


Figura 8. La proteína E1 del VPH16 aumenta los niveles de p65, p50 y p52.

Las células HaCaT transfectadas con el vector pCA y los plásmidos que expresan E1 del VPH16 y 11 se recolectaron y se obtuvo un extracto de proteínas totales, 24 h después de la transfección. A) Los niveles fosforilados de NF-κB se determinaron mediante transferencia Western blot. Las proteínas se separaron en una SDS-PAGE al 10% y la membrana se incubó con anti-NF-κB(p65) anti-NF-κB(p50) y anti-NF-κB(p52) observando un aumento de los niveles de NF-κB y en presencia de proteínas E1 del VPH16 y 11. Se usó GAPDH como control de carga. B) densitometría de los niveles P-p65, P-p50 y P-p52. Los experimentos de p50 se realizaron por triplicado, los experimentos de p65 y p52 se realizaron por duplicado. Prueba Anova * $p < .05$ y ** $p < .01$.



8.3 La proteína E1 del VPH16 promueve la translocación nuclear de las proteínas p50 y p52.

Una vez que observamos que E1 del VPH16 aumenta las proteínas del factor transcripcional de NF- κ B, se procedió a investigar el mecanismo molecular por el cual E1 del VPH16 es capaz de inducir cambios en la localización celular de los factores de transcripción de NF- κ B. Para determinar la localización subcelular de NF- κ B, se realizó un fraccionamiento celular, donde se obtuvo extracto citoplásmico y nuclear. Se evaluó el efecto de E1 del VPH16 sobre la localización de estas proteínas encontrando en la fig.9 que E1, aumenta los niveles de p50 y p52 en el núcleo, donde podemos observar que estas bandas se encuentran prácticamente ausentes en el control pCA, además podemos observar que los niveles proteicos de la proteína E1 del VPH16 aumentan a nivel nuclear, esto en comparación con citoplasma, lo cual concuerda con la literatura de que E1, es una proteína que se encuentra mayormente en núcleo (Bergvall *et al*, 2013). De esta manera se demuestra que E1 de los VPH de alto riesgo aumenta los niveles nucleares de p50 y p52, con lo que podrían inducir la activación tanto de la vía canónica como no canónica de NF- κ B. Las gráficas en la fig.9B no muestran resultados significativos entre los niveles nucleares de las proteínas entre el control pCA y E1 de VPH 16 probablemente debido a la variabilidad entre los experimentos; sin embargo, la tendencia es muy clara. Aunque visualmente no se observan niveles proteicos de las proteínas p50 y p52 en citoplasma ni en núcleo en presencia del control pCA, no se puede descartar que existan trazas de estas y que estas pudieran observarse con una mayor exposición del film o una mayor cantidad de proteína.

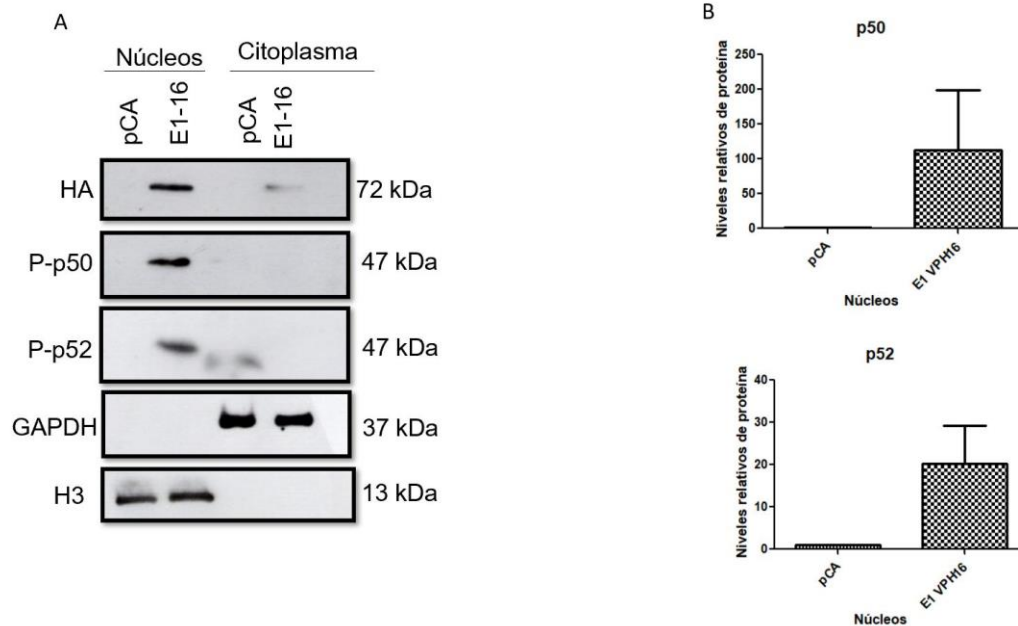


Figura 9.E1 del VPH16 promueve la translocación nuclear de NF-κB.

Las células HaCaT transfectadas con el vector pCA y los plásmidos que expresan E1 del VPH se recolectaron y se separaron en regiones citoplasmáticas y nucleares, 24 h después de la transfección. A) Los niveles fosforilados de NF-κB se determinaron mediante transferencia Western blot. Las proteínas se separaron en una SDS-PAGE al 10% y la membrana se incubó con anti-NF-κB (p50) y anti-NF-κB (p52) observando un aumento de los niveles nucleares de NF-κB y en presencia de proteínas E1 del VPH16 y 11. Se utilizaron como controles un anticuerpo contra H3 específico del núcleo y un anticuerpo contra la GAPDH específico del citoplasma. B) Se observan las densitometrías de las proteínas p50 y p52 del ensayo de Wb. Los experimentos se realizaron por triplicado.

8.4 La proteína E1 del VPH16 aumenta los niveles de la proteína IKKα/β

Al observar que E1 induce el aumento y traslocación nuclear de los factores de transcripción de NF-κB nos preguntamos si la proteína E1 afectaba a otros componentes río arriba claves para la activación de NF-κB como la cinasa IKKα. La activación de IKKα resulta de suma importancia pues actúa como un activador tanto de la vía canónica como de la no canónica; fosforilando al inhibidor IκBα para su posterior ubiquitinación. De esta manera se produce la degradación y posterior liberación de las proteínas p50 y p65 provocando su translocación a núcleo. Por lo tanto, se realizó un WB para evaluar los niveles de la forma fosforilada de IKKα en



células HaCaT transfectadas con E1 del VPH16 y 11, observando que solo en presencia de E1 VPH16 hay un aumento de los niveles de proteína IKK α de manera similar al inducido por el control positivo Poly I:C, aunque no fue estadísticamente significativo, si existe una tendencia. Interesantemente, para E1 del VPH11 no se observó ningún efecto sobre la cinasa P-IKK α / β (Fig. 10).

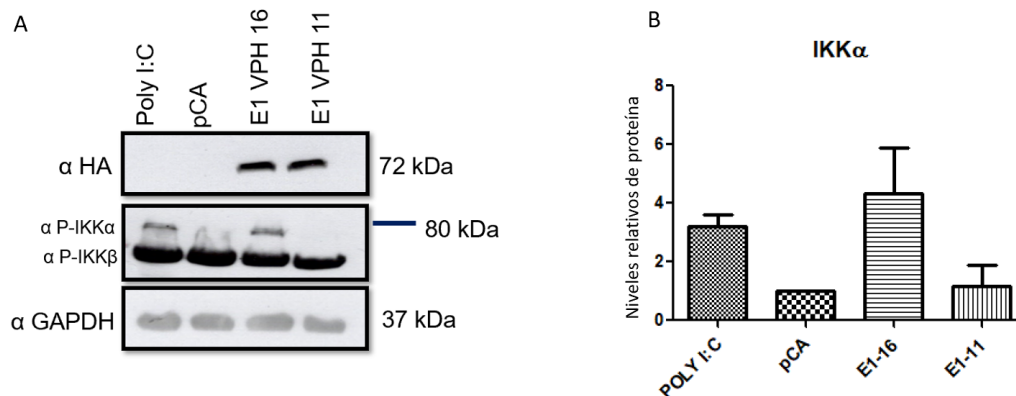


Figura 10. La proteína E1 del VPH16 aumenta los niveles de IKK α .

Las células HaCaT transfectadas con el vector pCA y los plásmidos que expresan E1 del VPH16 y 11 se recolectaron y se obtuvo un extracto de proteínas totales, 24 h después de la transfección. A) Los niveles fosforilados de IKK α se determinaron mediante Western blot. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE al 10% y la membrana se incubó con anti- IKK α / β observando un aumento de los niveles de IKK α y en presencia de proteínas E1 del VPH16 y el control Poly I:C. Se usó GAPDH como control de carga. B) densitometría de los niveles de IKK α . Se realizó por triplicado

8.5 La proteína E1 VPH16 promueve la translocación nuclear de IKK α / β

Se ha descrito que el complejo IKK tiene funciones importantes en el núcleo, como reclutar coactivadores de la transcripción (Liu, *et al*, 2013). Este hecho llevó a analizar si E1 del VPH16 promueve la translocación nuclear de IKK α / β . Para ello se realizó una inmunofluorescencia indirecta (IF) a través de microscopía de epifluorescencia. En la figura 11, se puede observar en el canal azul (DAPI) a los núcleos celulares y la señal verde corresponde a la presencia de E1, la cual es mayoritariamente nuclear. Finalmente, el canal rojo corresponde a la señal de la forma fosforilada de IKK α / β la cual también podemos observar en el núcleo co-



localizando con E1. Se observó que la co-localización de E1 de VPH16 e IKK α / β es nuclear; en contraste con las células que carecen de la señal para E1, donde la señal de IKK α / β es difusa y se observa preponderantemente en células en mitosis. Esto indica que E1 de VPH16 promueve el aumento en los niveles proteicos de IKK α / β y su traslocación nuclear, por lo que será interesante explorar el papel de IKK en el núcleo en presencia de E1 del VPH. .

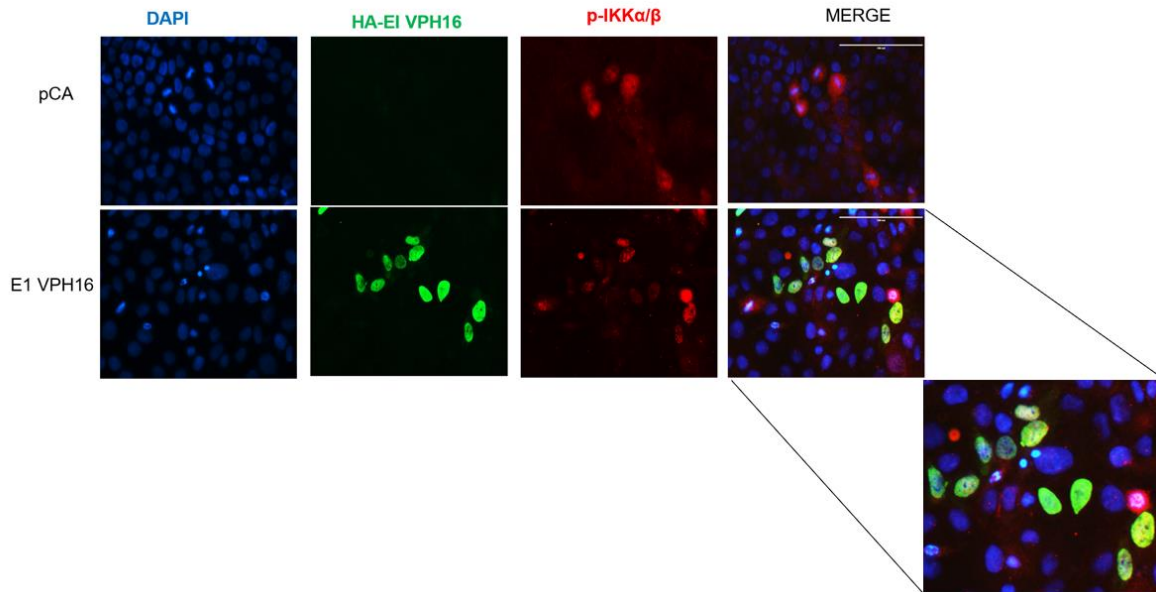


Figura 11. La proteína E1 VPH16 promueve la translocación nuclear de IKK α / β .

Ensayo de IF en la línea celular HaCaT transfectadas con el plasmido que expresa E1 VPH16, DAPI (color azul que tiñe núcleos) color verde HA E1 VPH16 y en color rojo IKK α / β , en donde se observa que presenta un patrón de señal puntiforme a nivel nuclear en las células transfectadas con E1 del VPH 16, en comparación con el control, también podemos observar un acercamiento que nos muestra con mayor claridad la co-localizando de E1 con IKK α / β .



8.6 La proteína E1 del VPH 16 aumenta los niveles de la cinasa NIK

Uno de los componentes clave en la regulación de la vía de señalización no canónica de NF- κ B es la cinasa NIK. Todos los inductores de NF- κ B no canónicos identificados hasta ahora emiten señales a través de NIK. Es por eso por ello que nos preguntamos cual sería el efecto que tiene E1 del VPH16 y 11 sobre los niveles de NIK. Mediante WB, encontramos que solo E1 del VPH16 aumenta estadísticamente significativo los niveles de NIK en comparación con el control pCA, del mismo modo podemos observar que aumenta los niveles de NIK en presencia de E1 del VPH11 aunque no fue estadísticamente significativo, si se puede observar un aumento en comparación con el control, al igual que el control poly I:C. Esto nos habla de que E1 de VPH16 no solamente activa la vía canónica, sino que también a la no canónica de NF- κ B mediante la regulación de componentes en diferentes componentes de la vía.

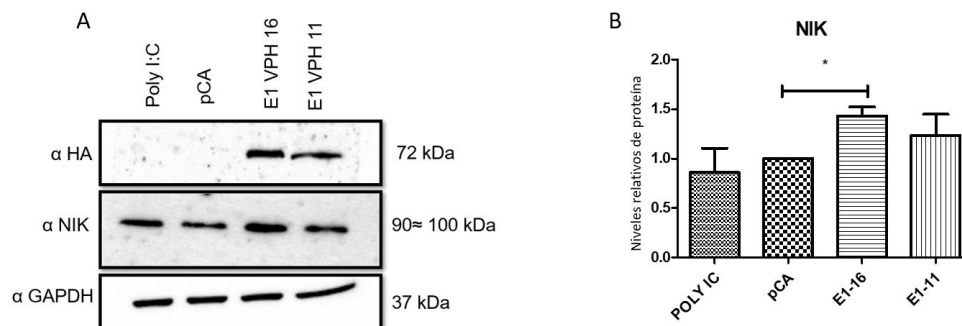


Figura 12. La proteína E1 del VPH16 aumenta los niveles de NIK.

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. A) Los niveles de la cinasa NIK se determinaron mediante transferencia Western blot. Las proteínas se separaron en una SDS-PAGE al 10% y la membrana se incubó con anti-NIK observando un aumento de los niveles de la cinasa NIK en presencia de las proteínas E1 del VPH16 y 11. Se uso GAPDH como control de carga. B) Densitometría de los niveles proteicos de NIK. Los experimentos se realizaron por triplicado. Prueba Anova $p < .05$.



8.7 E1 del VPH16 aumenta los niveles de TLR-9

TLR-9 es un receptor que detecta la presencia de DNA viral, por lo que es capaz de reconocer la presencia del VPH en las células infectadas, además, es capaz de inducir la vía de activación de NF- κ B, por lo que se analizó si E1 tenía algún efecto sobre el receptor TLR-9. Mediante WB se evaluaron los niveles de este receptor en presencia de E1 de alto y bajo riesgo, encontrando que existe un aumento de TLR-9 en presencia de E1 del VPH16 en comparación con el control pCA, aunque el resultado no fue significativo, si podemos concluir que hubo una tendencia. Por lo tanto, la regulación del receptor TLR-9 podría ser otro mecanismo mediante el cual E1 del VPH16 induce la vía de activación de NF- κ B.

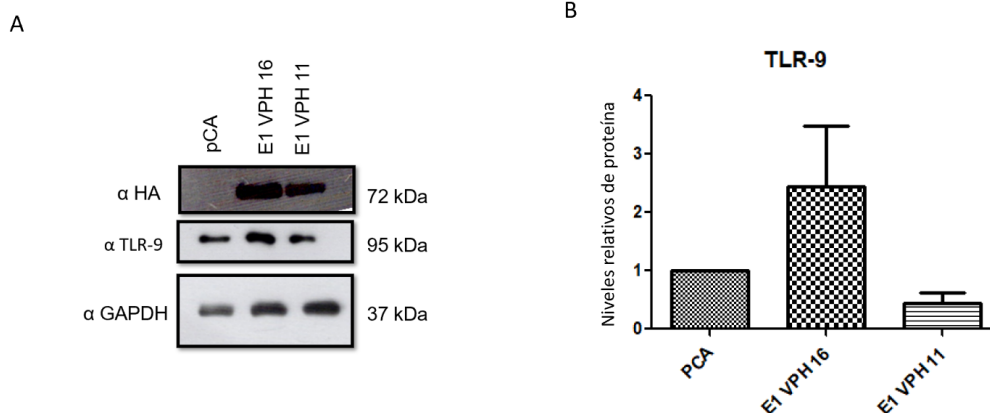


Figura 13. E1 del VPH16 aumenta los niveles de TLR-9.

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. A) Los niveles del receptor TLR-9 se determinaron mediante Western blot. Las proteínas se separaron en geles de SDS-PAGE al 10% y la membrana se incubó con anti- TLR-9 observando un aumento los niveles del receptor TLR-9 en presencia de proteínas E1 del VPH16. Se usó GAPDH como control de carga. B) Densitometría de los niveles de TLR-9. Se realizó por triplicado.



8.8 Identificación de genes blanco del factor transcripcional NF- κ B desregulados en presencia de E1 del VPH16

Todos los resultados mostrados indican que E1 induce la vía de activación de NF- κ B a través de diversos mecanismos. Con esto en mente nos preguntamos si hay cambios en la expresión de genes blanco de NF- κ B en presencia de E1, para lo cual se realizó un análisis bioinformático usando los genes desregulados en presencia de E1 del VPH16 ($p < 0.005$) obtenidos del análisis de RNA-seq de Castro y col. (2019). Para identificar cambios en el conjunto de genes, los datos se representaron en una gráfica de Volcáno, la cual nos da información de la dispersión de los datos, cada punto en el gráfico representa un gen. En la figura 14A, se muestra en el eje de las x las diferencias de las veces de cambio en logaritmo base 2 entre los grupos y en el eje de las y las diferencias del valor p en $-\log_{10}$. En el Volcáno podemos observar la distribución de los genes regulados por E1 del VPH16 de color rojo los 199 genes sobre expresados y de color verde 103 los genes sub expresados (figura 14A).

Utilizamos el programa NF- κ B Transcription Factor Boston University, el cual es una base de datos que recopila los genes blanco de NF- κ B que se han descrito hasta la fecha. En esta base encontramos 432 genes blanco de NF- κ B. Posteriormente insertamos los genes regulados por E1 del VPH16 en esta base de datos y obtuvimos que de los 199 genes que previamente se observaron sobre expresados por E1 de VPH16, 26 genes están asociados a la vía de NF- κ B, mientras que de los genes sub expresados por E1 de VPH16, solo 9 genes se asociaron a NF- κ B (Fig. 14B). Dichos genes se muestran en la Tabla 7. Este resultado demuestra que E1 podría estar induciendo la vía de activación de NF- κ B y está favoreciendo así la expresión de genes blanco.

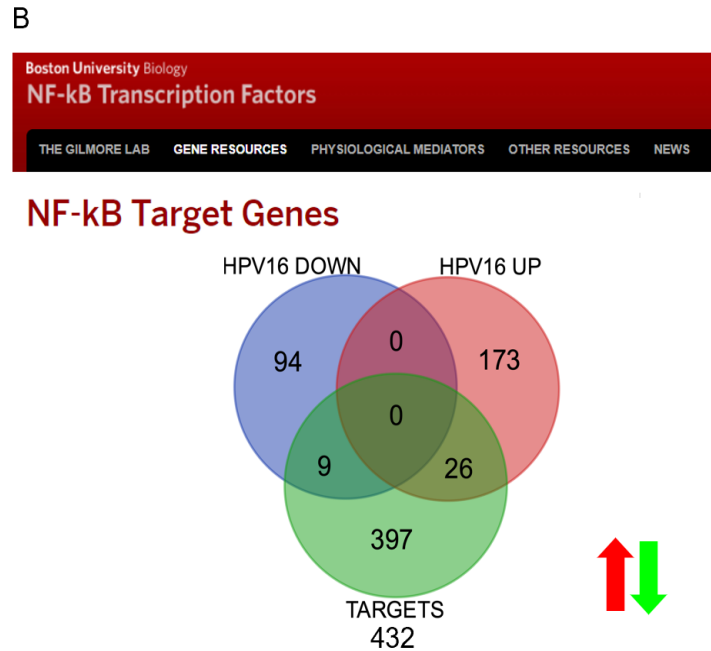
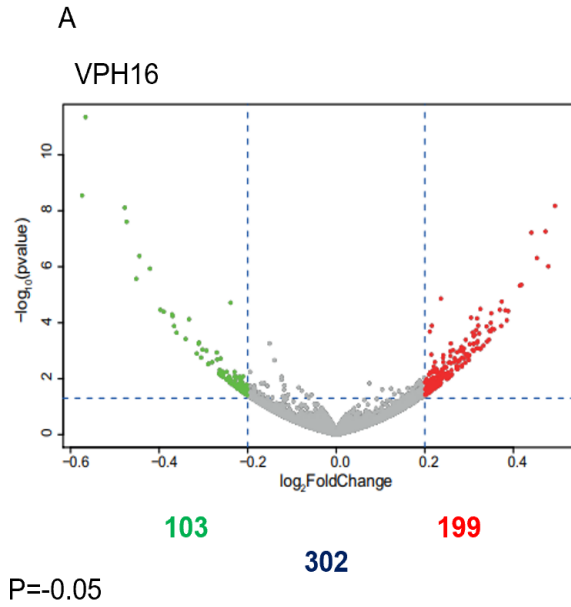


Figura 14. Genes desregulados en presencia de E1 del VPH16 asociados a la vía de señalización de NF- κ B.

A) En la gráfica del volcán nos muestra los genes que están desregulados en presencia de E1 del VPH16. Se seleccionaron los genes que tuvieron un valor de p de ≤ 0.05 y con base en los valores de cambio del \log_2 -fold change, se encontró que E1 VPH16 reguló un total de 302 genes de los cuales 199 estuvieron sobre expresados se muestran en rojo y 103 sub-expresados se muestran en verde. B) Diagrama de Venn que muestra el número de genes expresados diferencialmente por las proteínas E1 del VPH y que se comparten con los genes blanco de la vía NF- κ B.



Tabla 6. Genes desregulados en presencia de E1 del VPH16 asociados a la vía de señalización de NF- κ B.

HPV16 UP/TARGETS	log2FoldChange	pvalue
CD44	0.22225031	0.00573247
XDH	0.22430657	0.01961292
NR4A2	0.21307156	0.01633791
TGM2	0.29170317	0.00269463
TGM2	0.29170317	0.00269463
SERPINE2	0.27422928	0.00370344
PLK3	0.31032497	0.00102641
CYP27B1	0.30077092	0.00144104
EGFR	0.25764103	0.00104451
FOS	0.32637127	0.00082801
NFKB2	0.23426021	0.00991969
ADAM19	0.31606130	0.00018459
BCL2L1	0.24330851	0.00417020
GZMB	0.21474961	0.00137719
FN1	0.25883680	0.00054860
ABCB1	0.21608692	0.00012799
PIM1	0.26647117	0.00253027
SERPINE1	0.21039865	0.01320326
PTAFR	0.21578821	0.02500693
IER3	0.31814556	0.00007033
IL23A	0.28320993	0.00347760
SDC4	0.22054252	0.01283400
DUSP1	0.22270688	0.02249072
IL11	0.34494664	0.00040380
TFP12	0.33959094	0.00013561
NRG1	0.20347451	0.02052644
MMP1	0.45317442	0.00000049



HPV16 DOW/TARGETS	log2FoldChange	pvalue
MYLK	-0.26400217	0.00659037
IFI44L	-0.36929928	0.00005782
TNFSF10	-0.45152171	0.00000271
GBP1	-0.26301100	0.00489202
CXCL10	-0.31086067	0.00055856
CCL5	-0.37063610	0.00005073
IFNB1	-0.23843650	0.00001933
CCL2	-0.23061497	0.01501074



8.9 E1 de VPH16 regula procesos asociados a la activación de NF- κ B

Una vez que identificamos los genes asociados a la vía de NF- κ B que son regulados por E1, nos preguntamos a que procesos celulares se asociaban esos genes, para lo cual utilizamos el programa Enrichr, el cual identifica las vías de señalización asociadas a los 26 genes que están sobre-expresados. En general, los eventos celulares identificados se asociaron a los procesos celulares tales como hipoxia, transición epitelio mesénquima y señalización de STAT5, entre otros (Fig. 15A). En la figura 15B se describen los genes específicos asociados a cada una de las vías identificadas. Por su parte los 9 genes sub-expresados se asociaron con procesos celulares como respuesta a interferón gamma, respuesta

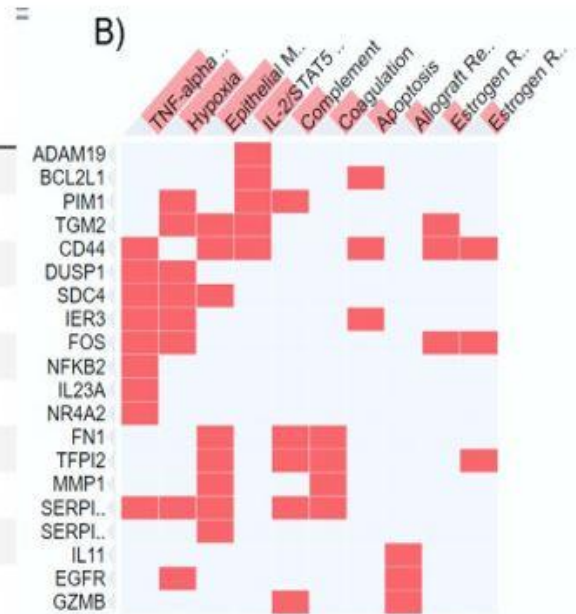


inflamatoria y respuesta interferón Alpha (Figura 15C). En la figura 15D se observa la distribución de estos genes en cada proceso celular. Esto nos indica que la presencia de la proteína E1 está favoreciendo la activación de la vía y la expresión de genes blanco de NF- κ B, los cuales podrían estar participando en diversos procesos celulares involucrados tanto en el ciclo replicativo viral como en la carcinogénesis.



A) Sobre-expresados

Index	Name	P-value
1	TNF-alpha Signaling via NF-kB	2.251e-12
2	Hypoxia	1.163e-10
3	Epithelial Mesenchymal Transition	1.163e-10
4	IL-2/STAT5 Signaling	1.755e-7
5	Complement	0.000005274
6	Coagulation	0.00002883
7	Apoptosis	0.001162
8	IL-6/JAK/STAT3 Signaling	0.005681
9	Estrogen Response Early	0.002162
10	Estrogen Response Late	0.002162



A) Sub-expresados

Index	Name	P-value
1	Interferon Gamma Response	7.599e-11
2	Inflammatory Response	1.160e-8
3	Interferon Alpha Response	0.000009095
4	TNF-alpha Signaling via NF-kB	0.000001176
5	IL-6/JAK/STAT3 Signaling	0.0006602
6	Apoptosis	0.002234
7	IL-2/STAT5 Signaling	0.003387
8	Allograft Rejection	0.003420
9	Unfolded Protein Response	0.04973
10	Adipogenesis	0.08650

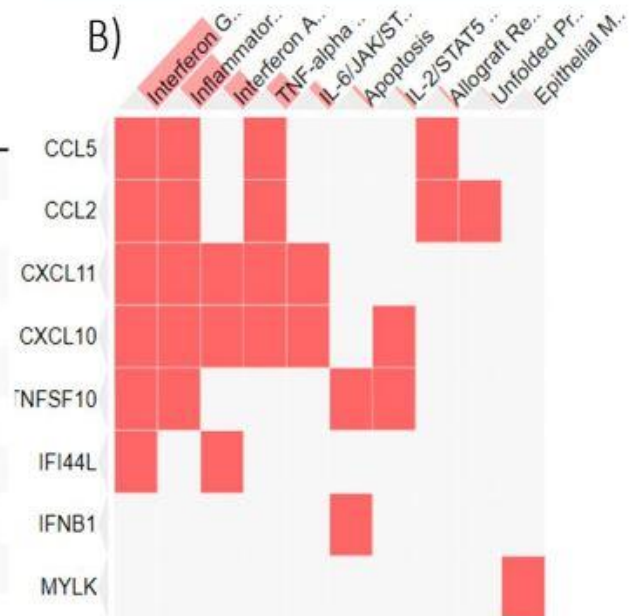


Figura 15. E1 de VPH 16 regula procesos celulares asociados a NF-kB

Procesos celulares que se asocian con NF-κB presencia de E1. Se utilizo el programa bioinformático GSEA, el cual permite identificar o hacer asociaciones de vías de señalización, obteniendo que 26 genes se asociaron a estos procesos celulares.



9. Discusión

El factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) se descubrió por primera vez en los linfocitos B. Este se une específicamente a la secuencia potenciadora κ B del gen de la cadena ligera kappa de la inmunoglobulina y participa en las respuestas inflamatorias (Li S, *et al*, 2019).

La vía de activación de NF- κ B está involucrada en distintos tipos de cáncer, tanto en el desarrollo como en la progresión. Esto lo hace mediante el control de la expresión de distintos genes diana, incluyendo *TNF α* , *IL6*, *BCLXL*, *BCL2*, *BCLXS*, *XIAP* y *VEGF*, favoreciendo distintos procesos biológicos como la proliferación, supervivencia y angiogénesis de las células cancerosas (Xia L, *et al*, 2018).

La vía activación de NF- κ B se produce a través de dos vías de señalización principales: la vía canónica y la no canónica (Sun S. C. 2017). La forma más abundante de la vía de activación canónica es el complejo proteico p65 unido a p50. La unión de p65 al DNA estimula varios componentes de la maquinaria de transcripción, como TFIIB, factores asociados a TBP y varios coactivadores, incluidos p300 y Tip60 lo que culmina en la expresión de genes como la interleucina IL-8 y la quimiocina Cxcl2 (Giridharan S, *et al*, 2018, Buss H, *et al*, 2004, O'Shea, J, *et al*, 2010).

Resulta interesante el papel de p65, ya que se ha demostrado su participación en distintos tipos de cáncer. Por ejemplo, en células de cáncer de ovario p65 regula la expresión de mortalina que en consecuencia promueve la proliferación y migración celular (Li S, *et al*, 2019). Este efecto también ha sido estudiado en cáncer de mama, donde la localización nuclear de p65 del complejo NF- κ B promueve la proliferación celular y a su vez evita la apoptosis (Biswas DK, *et al*, 2004).

En 2015, Nakahara y cols. demostraron que la proteína no oncogénica E1 del VPH16 aumenta los niveles de la proteína p65 y promueve su translocación a núcleo. Tomando en consideración estos antecedentes, decidimos evaluar el



efecto de E1 del VPH de alto (16) y bajo riesgo (11) en los niveles proteicos de p65. Encontramos que E1 del VPH, tanto de alto como de bajo riesgo, aumentan los niveles proteicos del factor transcripcional p65. Es probable que cuando E1 aumenta los niveles proteicos de p65 se promueva la proliferación celular y se inhiba la apoptosis, lo que finalmente favorecería el aumento de la replicación viral, o bien, contribuiría en el proceso carcinogénico pues trabajos recientes demuestran que E1 se expresa durante las diferentes etapas del cáncer de cervix (Baedyananda F, *et al*, 2018), postulando así una nueva acción potencial para esta proteína.

En el presente trabajo encontramos que la proteína E1 de los VPH, tanto de alto como de bajo riesgo, aumenta los niveles proteicos fosforilados del factor transcripcional p65, lo cual indica que favorece la activación de la vía. Este mecanismo es similar a lo observado con otros virus como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Thieblemont N, *et al*, 1995) el virus de Epstein-Barr (EBV), el de Hepatitis entre otros (Ersing I, *et al*, 2013), los cuales favorecen la vía activación de NF- κ B para inducir la expresión de genes necesarios para el ciclo replicativo viral. Más aún, existe evidencia que esto también ocasiona la expresión de genes asociados a la carcinogénesis en diferentes tipos de cáncer como mama, ovario, vejiga, cáncer de huesos y cáncer de cabeza y cuello, donde altos niveles de la proteína p65 favorecen una sobre activación de NF- κ B, aumentando la proliferación, migración y evasión de la apoptosis (Biswas DK, *et al*, 2004; Li S, *et al*, 2019, Zhu J, *et al*, 2017, Buss H, *et al*, 2012, Arun P, *et al*, 2009). Esto sugiere que tal vez la activación de p65 por parte de E1 podría favorecer la expresión de genes necesarios para el ciclo replicativo viral, así como genes involucrados en la promoción de la carcinogénesis, por lo que resulta necesario seguir explorando el posible papel que pueda tener E1 en la carcinogénesis.

En el presente trabajo demostramos que E1 del VPH aumenta los niveles de proteínas que favorecen la transcripción génica, en particular al p52 y p65 de la vía NF- κ B, por lo que nos planteamos analizar si E1 también aumenta a p50 otro



factor importante en la regulación de la transcripción asociada al factor transcripción NF- κ B (Figura 16). p50 es otra proteína de la familia de NF- κ B que se genera por el corte proteolítico de p105 y corresponde a su extremo N terminal, el cual se denomina dominio de homología Rel (RHD) (Yu Y, *et al*, 2009) (Lin L, *et al*, 1998). p50 puede reclutar activadores de la transcripción como p300, CBP, RelA, RelB y C-Rel, pero también a inhibidores de la transcripción como HDAC1 (Guan H, *et al*, 2005, Elsharkawy AM, *et al*, 2010, Cao S, *et al*, 2006).

Se observamos que los niveles de la proteína p50 aumentaron significativamente en presencia de E1 del VPH16, en comparación con el vector vacío. Sería interesante analizar si la proteína E1 es capaz de interactuar con p50 para favorecer la transcripción de algunos genes diana, ya que se ha reportado que existen modificaciones postraduccionales de las subunidades de unión de NF- κ B en el DNA, las cuales no tienen efectos globales sobre la transcripción, si no que sirven para controlar la expresión génica de manera específica para el gen diana (Buss H, *et al*, 2012), así también la capacidad de reclutar factores transcripcionales o co-reguladores transcripcionales para regular la expresión de genes necesarios para favorecer el ciclo replicativo viral y/o la carcinogénesis.

Por otra parte, p52 es un componente de la vía no canónica de NF- κ B, la cual es producto de la proteólisis de p100 (Giardino ML, *et al*, 2012). Una vez que p52 se encuentra en el citoplasma se une con RelB, estos heterodímeros p52/RelB se translocan al núcleo donde activan la transcripción de genes diana. Castro-Muñoz y cols. (2019) encontraron un aumento de la proteína p52 en células que expresaban E1 de los VPH 16, 18 y 11, por lo cual esperaban un incremento en la expresión del gen de IFN β , pues la vía de NF- κ B participa en la regulación de este gen; sin embargo, encontraron una disminución en la expresión de IFN β . Si bien estos resultados podrían considerarse contradictorios, los autores sugirieron que p52 podría estar actuando como represor transcripcional para este gen. En el presente proyecto de investigación realizamos la evaluación de p52 en células transfectadas con E1 del VPH 16 y corroboramos que sus niveles incrementan, lo cual resulta muy interesante ya que confirma que E1 también activa la vía no



canónica de NF- κ B. No obstante, debido al efecto dual que se ha descrito para p52 como activador y represor de la transcripción, es importante dilucidar la función específica que estaría realizando junto con la proteína E1. A este respecto, estudios previos en células de mieloma múltiple indican que p52/RelB puede formar un complejo represor junto con HDAC4 (Vallabhapurapu, *et al*, 2015) por otro lado, se ha identificado que proteína réquiem humana (REQ/DPF2) actúa como una molécula adaptadora para p52/RelB y el complejo SWI/SNF, lo cual favorece la transcripción mediada por el factor transcripcional NF- κ B (Tando, *et al*, 2010)

Por lo anterior, resulta de interés estudiar la relación de E1 con otros factores transcripcionales o cofactores que interactúan con p52, para entender de qué manera regula la expresión de genes que pudieran participar en el ciclo replicativo viral o/y carcinogénesis.

Se ha descrito que p50 y p52 tienen un efecto dual en la transcripción; por un lado, pueden interactuar con represores transcripcionales, mientras que también pueden favorecer la actividad transcripcional. Por lo que es interesante analizar si E1, a través del aumento de la proteína p65, p50 y p52, puede estar regulando la expresión de genes blanco de NF- κ B, ya sea activando o reprimiendo la transcripción de ciertos genes celulares que favorezcan procesos que ayuden a la replicación viral o al establecimiento del cáncer. Además, se sabe que la proteína E1 puede interactuar con componentes epigenéticos que regulan la transcripción (SIRT1, SWISNF H1), por lo que resulta relevante determinar la interacción de E1 de VPH de alto y bajo riesgo con p50 o p52 y su relación con moduladores epigenéticos (HDACs, HATs), que pudieran de esta forma regular la expresión de genes.

Como se mencionó anteriormente, la translocación nuclear de p50 y p52 se requiere para llevar a cabo la transcripción de sus genes blanco. Por otra parte, algunas proteínas virales favorecen la translocación al núcleo de dichas proteínas con el fin de culminar su ciclo replicativo, como lo es el caso del virus de la



estomatitis vascular (VSV) y el virus Sendai (SeV) cuya infección en células MEF (Fibroblastos Embrionarios de ratón) aumenta los niveles nucleares de p52 y RelB (Jin J, *et al*, 2014). Es importante destacar que la vía no canónica de NF- κ B (p52) es un mecanismo clave que controla la inducción de IFN-I y la inmunidad antiviral (Jin J, *et al*, 2014). Anteriormente no se había examinado si E1 de VPH16 pudiera estar aumentando o translocando estas proteínas p50 y p52 al núcleo, por lo que nos pareció fundamental analizar dicho efecto. Nuestros resultados demuestran que E1 del VPH16 induce el aumento de los niveles de p50 y p52 en el núcleo, con lo que posiblemente se favorece la transcripción de genes celulares para promover supervivencia e inhibición de la apoptosis necesarios para el establecimiento de la infección viral y la carcinogénesis como efecto colateral de la persistencia de la infección.

Por otro lado, el complejo de cinasas IKK, es un elemento central de la cascada de la vía de activación NF- κ B; Este complejo se compone por dos cinasas (IKK α e IKK β) y una subunidad reguladora IKK γ , también llamada NEMO (Adli, *et al*, 2010). Estas cinasas son responsables de la fosforilación de los inhibidores de la vía I κ B. IKK α y β tienen una estructura similar (50% de identidad de secuencia), contienen un dominio de cinasa amino-terminal, una hélice-bucle-hélice (HLH) que funciona en la modulación de la actividad de la cinasa IKK y una cremallera de leucina (LZ), cuyo papel es permitir la homo o heterodimerización de las cinasas (Israel A, *et al*, 2010). La activación de NF- κ B esta mediada por el complejo IKK el cual depende de la fosforilación de la subunidad IKK α / β . La mayoría de los virus como VIH-1, el virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1) y el virus Sendai convergen en activar a la cinasa IKK α / β con el fin de culminar su ciclo replicativo (Amaya, *et al*, 2014, Algarté, *et al*, 1999, Harhaj, *et al*, 1999, Asin, *et al*, 1999). Previamente, se había reportado el efecto que tiene E1 de los VPH16 y 11 en otras proteínas que componen la vía de NF- κ B, como p65 y p52 (Castro-Muñoz, *et al*, 2019, Nakahara, *et al*, 2015); no obstante, al momento no se ha descrito el papel que E1 pudiera tener sobre otros elementos que componen la vía. Por esta razón, se analizó el efecto de E1 del VPH 16 y 11 sobre IKK α / β . De



manera interesante encontramos que la expresión de E1 del VPH16 incrementa la forma fosforilada de IKK α/β , del mismo modo como se observó con el activador de la vía, Poly I:C. De acuerdo con la literatura revisada, dichos resultados indican que hay una activación de la vía canónica y no canónica a este nivel.

Se ha reportado que IKK α muestra una señal de localización nuclear (Sil, *et al*, 2004), por lo que además de su papel en el citoplasma en el control de la vía de NF- κ B, podría tener otras funciones, como la de inducir la expresión de genes. Por ejemplo, se ha observado que, en el núcleo, IKK α favorece la acetilación de histonas (Huang, *et al*, 2013) además de unirse a los promotores de genes sensibles a estrógenos, como la ciclina D1 y c-myc, activando su transcripción al formar un complejo de transcripción con el receptor de estrógenos ER α y el coactivador AIB1/SRC-3 (Park KJ, *et al*, 2005, Hinz M, *et al*, 1999, Ledoux AC, *et al*, 2014, Park, *et al*, 2014). De manera interesante, en esta investigación encontramos que E1 del VPH16 aumenta los niveles nucleares de la proteína IKK α , lo que podría representar otro posible mecanismo de regulación por E1 para promover la expresión de genes celulares. Dado que ya se sabe que IKK α favorece la acetilación de histonas, resulta interesante saber si es posible que la proteína E1 de VPH pueda favorecer la acetilación de histonas en diferentes genes con ayuda de IKK y así inducir la expresión de distintos genes que pudieran tener un papel en el ciclo replicativo y/o carcinogénesis.

Se sabe que IKK tiene una función clave en cáncer debido a su papel en la regulación de la expresión de distintas citocinas, factores angiogénicos, proteínas anti apoptóticas y moléculas de adhesión celular (Lee DF, *et al*, 2008). Por ejemplo, en cáncer de mama la cinasa IKK fosforila a FOXO3a inhibiendo su interacción con Akt, lo cual causa su ubiquitinación y degradación vía proteasoma. De este modo promueve la proliferación celular y en consecuencia la tumorigénesis (Hu, *et al*, 2008). En contraste, la baja expresión de IKK α en ratones conduce a la formación de papilomas y también al desarrollo de carcinomas, encontrando que la pérdida de la expresión de IKK α promueve la expresión de VEGF-A. Además, se informó que la pérdida de IKK α promueve la expresión de



citocinas, como TNF α (Park, *et al*, 2007), por tanto, la investigación de la función de IKK en cáncer y su asociación con la proteína E1 sigue siendo relevante.

De manera similar analizamos a la cinasa NIK, un activador central de la vía no canónica de NF- κ B. La estabilización de NIK en el citoplasma conlleva a la fosforilación y activación de IKK α (Pflug, *et al*, 2020). Rita Das y su grupo de trabajo encontraron que en muestras de pacientes y en líneas celulares de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello se sobreexpresaban LT β , LT β R, NIK y RELB. En las líneas celulares, LT β indujo la activación de la vía no canónica NF- κ B a través de NIK, lo cual promueve la migración (Das R, *et al*, 2019). Por otro lado, en una muestra de 151 pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) se encontró una sobreexpresión significativa de las proteínas NF- κ B2 y RelB en comparación con los tejidos no neoplásicos. Adicionalmente, se detectó un aumento de las proteínas Bcl3 y NIK en la mayoría de los casos de NSCLC en un 100 % y un 92.5 % respectivamente. Un hallazgo importante fue que se observó una sobreexpresión de NIK y RelB, los cuales correlacionaron con la tasa de alta recurrencia de los pacientes. De igual forma, NIK y NF- κ B2 estaban relacionados con la infiltración de los ganglios linfáticos regionales. Estos hallazgos demuestran la participación de NIK en la progresión de NSCLC a través de la activación de la vía no canónica de NF- κ B (Dimitrakopoulos, *et al*, 2019). Hasta el momento ese es uno de los primeros trabajos que demuestran la participación de NIK en muestras de pacientes de NSCLC, por lo cual continúa siendo relevante el estudio de la función de NIK en cáncer. Especialmente en el presente proyecto nos enfocamos en la evaluación del efecto de la proteína E1 de los VPH16 y 11 en los niveles proteicos de NIK. Nuestros resultados demuestran que la presencia de E1 VPH16 aumenta los niveles proteicos de NIK tal como lo hace el Poly I:C. Esto comprueba que E1 es capaz de activar a NF- κ B a distintos niveles, en este caso río arriba de p50, p52 y p65. Asimismo, algunos virus como HTLV1, herpesvirus humano 8 y Epstein-Barr (Sun, *et al*, 2011) utilizan esta vía para sus diversas funciones biológicas, favoreciendo la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis, evasión de



mecanismos de defensa del huésped, asegurando así la culminación de su ciclo replicativo.

Dentro de los receptores que regulan a la vía de activación de NF- κ B se encuentran los TLRs (Wagner H. 2014) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Chiang CY, *et al*, 2012). Los TLRs pueden interactuar con péptidos antimicrobianos y material genético (DNA y RNA); este receptor detecta motivos CpG no metilados del DNA, se ha reportado que TLR-9 es un sensor de DNA viral, y los TLR pueden activar a la vía canónica de NF- κ B (Kawasaki, *et al*, 2019). Esto derivó en el estudio de los efectos de la proteína E1 sobre TLR-9, donde se pudo observar que en presencia de E1 del VPH16 los niveles de TLR-9 aumentaron, hecho que no se observó con E1 del VPH 11. Estos hallazgos son similares a los reportados para otros virus. Por ejemplo, citomegalovirus murino puede unirse a los TLRs y de esa forma activar la vía de activación de NF- κ B favoreciendo la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-12 necesarias para su ciclo replicativo (Hsiao, *et al*, 2014, Sartorius, *et al*, 2021).

En la actualidad los avances científicos han permitido conocer más acerca del cáncer asociado al VPH; no obstante, existen muchos procesos celulares afectados por el virus que aún son desconocidos. En este trabajo nos enfocamos en investigar la importancia de la proteína E1 del VPH, la cual ha sido descrita como la única proteína con actividad enzimática ya que contiene un dominio de helicasa ATPasa, implicada en la replicación del genoma viral (Bergvall, *et al*, 2013). Se ha reportado el efecto de la proteína E1 con proteínas celulares que no solo participan en la replicación del genoma viral. En este sentido, Castillo y col. (2014) demostraron que el silenciamiento de E1 del VPH18 en células HeLa aumentaba la expresión de genes asociados principalmente a la respuesta inmune y apoptosis (Castillo, *et al*, 2014). Tomando estos antecedentes en consideración en nuestro laboratorio Castro Muñoz y col (2019) indagaron más acerca del efecto de la proteína E1 de VPHs de alto y bajo riesgo sobre la expresión de genes celulares. En dicha investigación se empleó la línea celular inmortalizada HaCat



transfectada con E1 del VPH16, 18 y 11 y mediante la técnica de RNA-seq se demostró que E1 regula la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune, así como en la carcinogénesis (Castro-Muñoz, *et al*, 2019).

De este modo, el interés de la presente investigación se centró en la evaluación de la regulación de E1 sobre genes blanco de vía de NF- κ B. Por lo que a partir de los datos obtenidos por Castro-Muñoz (2019) realizamos un análisis *in silico* para buscar genes que estuvieran asociados a este factor transcripcional y que se encontraran desregulados en presencia de E1 del VPH16. Se encontró que E1 del VPH16 regula 9 genes a la baja y 26 genes a la alta asociados a la vía de activación NF- κ B. Posteriormente se evaluaron los procesos celulares asociados a este grupo de genes, e interesantemente encontramos que son genes asociados a la respuesta inmune antiviral y a la progresión del cáncer. Algunos de los procesos celulares de los genes sobreexpresados fueron los de señalización de TNF-alpha, hipoxia, y la señalización IL-2/STAT5, procesos que tienen un papel importante en cáncer. De manera sorprendente encontramos que E1 del VPH16 también regula genes como TGM2, CD44, SDC4 y MMP1 que están involucrados en el proceso de transición epitelio-mesénquima, lo cual estaría indicando que la presencia de E1 del VPH induce la expresión de genes que pudieran repercutir en la carcinogénesis; sin embargo, es necesario validar estos resultados mediante ensayos biológicos para determinar el papel de E1 en el desarrollo de cáncer. En contraste, los genes blanco de NF- κ B que están regulados a la baja por E1 se asociaron a la respuesta interferón gamma, respuesta inflamatoria, apoptosis y la respuesta interferón Alpha, estos procesos son afectados por otros virus para facilitar su replicación, favoreciendo así la supervivencia celular y la evasión del sistema inmune, características importantes durante la infección por VPH.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos, postulamos que E1 del VPH16 altera procesos celulares que podrían favorecer el establecimiento del ciclo replicativo viral, la evasión de la respuesta inmune favoreciendo la persistencia de la infección y el posterior desarrollo de cáncer. Cabe mencionar que se ha reportado la presencia del mensajero de E1 del VPH16 tanto en lesiones



pre malignas como en cáncer invasor del cérvix (Baedyananda F, *et al*, 2018); sin embargo, a la fecha no se ha determinado si la proteína E1 del VPH se encuentra presente en cáncer. Además, la participación conjunta de los oncogenes E6 y E7 con la proteína E1 en la contribución al cáncer aún no se ha dilucidado por lo que es necesario realizar más investigaciones al respecto. Recientemente se reportó que E1 del VPH16, activa distintas vías que promueven la carcinogénesis de cuello uterino, algunas de estas vías son MAPK, PI3K-Akt, FoxO, NF- κ B y algunas vías de señalización de la apoptosis. Además, E1 alteró genes que están involucrados en la supervivencia y crecimiento celular (Baedyananda, *et al*, 2021). Los autores encontraron que E1 del VPH16, no solo aumentó genes que están involucrados en la supervivencia celular sino también algunos asociados a muerte celular. Tradicionalmente se considera que la evasión de la apoptosis conduce al desarrollo de cáncer (Hanahan, *et al*, 2011). Sin embargo, se ha reportado que las células pueden mantener activa la señal de apoptosis y con ello enviar señales de proliferación a células adyacentes promoviendo el proceso de carcinogénesis (Ichim, *et al*, 2016). Esto apoya la hipótesis de que E1 de VPH, además de estar implicada en la replicación del genoma viral, también podría tener un papel relevante en el desarrollo de cáncer. En nuestros resultados del análisis del transcriptoma acotado a los genes asociados de NF- κ B se encontró que E1 aumentó la expresión de genes como BCL2L1, IER3 y CD44 que tienen función anti apoptótica, y no se encontraron genes involucrados en la promoción de la apoptosis; sin embargo, no se descarta que E1 pudiera estar regulando la expresión de genes pro apoptóticos o pro tumorales en nuestro modelo. Lo que fue claro de nuestros datos es que E1 en particular disminuyó la expresión de genes de NF- κ B asociados a respuesta inmune, lo que sugiere sustancialmente que E1 de VPH16 modula la respuesta inmune antiviral, promoviendo la persistencia de la infección por VPH, que es evento clave para el potencial desarrollo de cáncer.

Nuestro trabajo de investigación aporta aún más evidencia de que la proteína E1 de los VPH16 y 11 puede modular la vía de activación de NF- κ B en diferentes



proteínas que la componen y así inducir la expresión de genes necesarios para el ciclo replicativo y evasión de la respuesta inmune, además de genes que podrían estar implicados en la carcinogénesis, por lo es de nuestro interés seguir investigando la función de E1, sus mecanismos de acción en la desregulación de NF- κ B y el posible papel en el desarrollo o mantenimiento de cáncer. La figura 16 resume nuestros hallazgos acerca de los efectos de E1 sobre la vía NF- κ B.



10. Conclusiones

- En este trabajo demostramos que las proteínas E1 del VPH16 y 11 regulan la vía de activación NF- κ B favoreciendo el aumento de los niveles de las proteínas, p50, p52, p65.
- La proteína E1 del VPH16 induce la translocación nuclear de las proteínas p50 y p52.
- E1 del VPH16 aumenta los niveles y favorece la translocación nuclear de la cinasa IKK α/β .
- E1 del VPH16 aumenta los niveles proteicos de la cinasa NIK y del receptor TLR-9.
- A través de análisis *in silico* se encontró que la expresión de los genes blanco de la vía de NF- κ B se encuentran desregulados en presencia de la proteína E1 del VPH16, además de que se alteran procesos celulares asociados a esta vía.

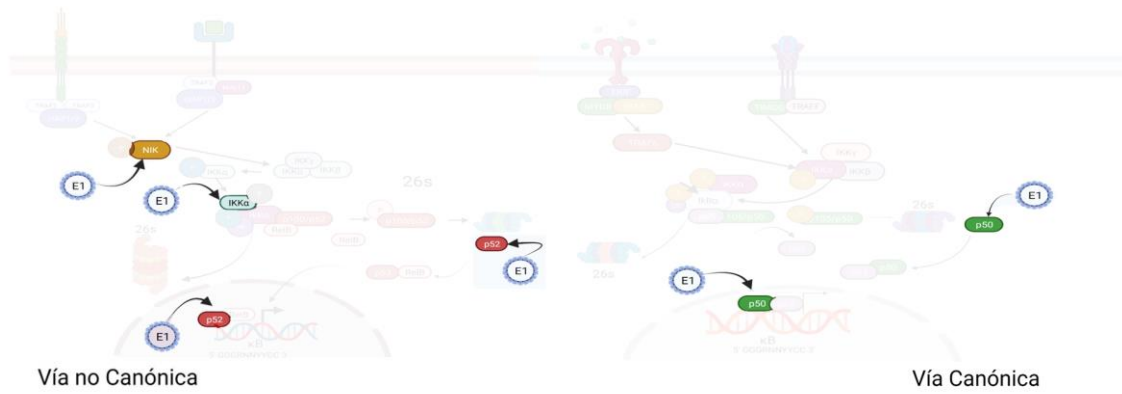


Figura 16. E1 induce la vía de activación de NF-kB (imagen de conclusiones)

Tomando nuestros resultados en conjunto podemos concluir que E1 induce la vía activación a través de diversas proteínas que la componen. Se demostró que E1 regula la vía a través de la activación de la cinasa NIK, que se sabe que es esencial para la activación de la vía canónica, así mismo también observamos que E1 aumenta los niveles de la cinasa IKK α/β , así como los niveles de los factores transcripcionales de esta vía (p50, p65 y p52). De manera interesante, E1 transloca al núcleo a p52 y p50.

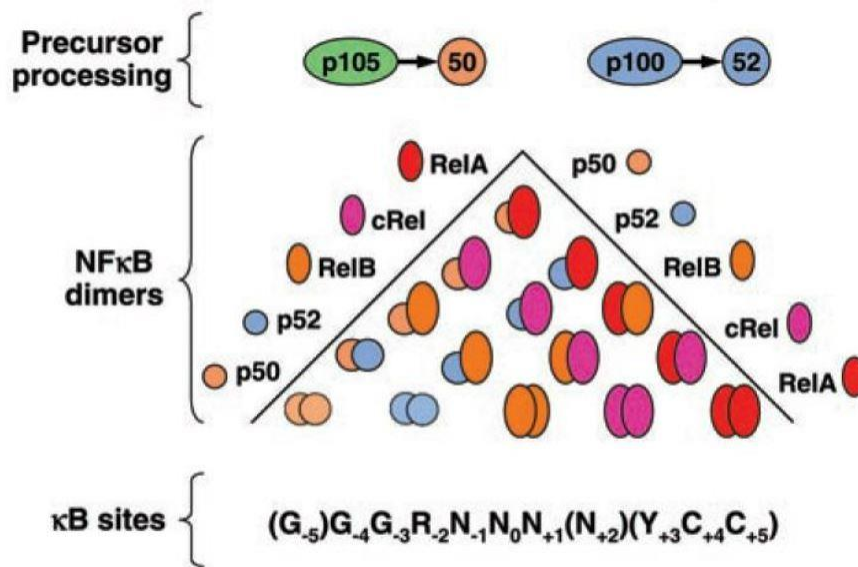


11. Perspectivas

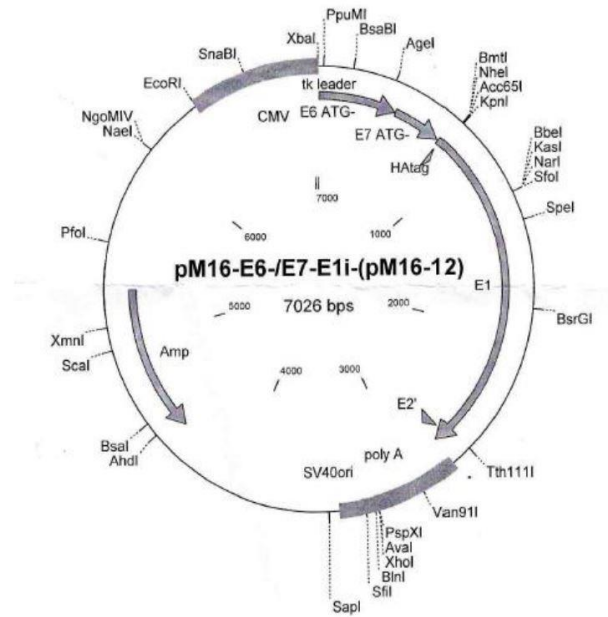
1. Validar la expresión de genes blanco del factor transcripcional NF- κ B expresados diferencialmente en presencia de E1 del VPH16 mediante qPCR.
2. Evaluar los niveles proteicos p50 y p52 en citoplasma en el modelo celular HaCat sin transfectar.
3. Determinar la interacción de IKK y NIK, así como de p65 y p52 con la proteína E1 de VPH16 a través de ensayos de CoIP.
4. Evaluar la capacidad de E1 de regular modificadores de la cromatina para favorecer la expresión de genes de NF- κ B mediante ChIP



12. Anexo



Anexo 1. Diferentes combinaciones de las proteínas con función de factor transcripcional. Tomado de <https://www.creativebiomart.net/>



Anexo 2. Mapa del vector de expresion de E1 del VPH16 y 11.



13. Referencias

Adli, M., Merkhofer, E., Cogswell, P., & Baldwin, A. S. (2010). IKKalpha and IKKbeta each function to regulate NF-kappaB activation in the TNF-induced/canonical pathway. *PloS one*, 5(2), e9428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009428>

Algarté, M., Nguyen, H., Heylbroeck, C., Lin, R., & Hiscott, J. (1999). IkappaB-mediated inhibition of virus-induced beta interferon transcription. *Journal of virology*, 73(4), 2694–2702. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.4.2694-2702.1999>

Amaya, M., Keck, F., Bailey, C., & Narayanan, A. (2014). The role of the IKK complex in viral infections. *Pathogens and disease*, 72(1), 32–44. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12210>

Arun, P., Brown, M. S., Ehsanian, R., Chen, Z., & Van Waes, C. (2009). Nuclear NF-kappaB p65 phosphorylation at serine 276 by protein kinase A contributes to the malignant phenotype of head and neck cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(19), 5974–5984. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1352>

Asin, S., Taylor, J. A., Trushin, S., Bren, G., & Paya, C. V. (1999). IkappaB mediates NF-kappaB activation in human immunodeficiency virus-infected cells. *Journal of virology*, 73(5), 3893–3903. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.5.3893-3903.1999>

Baediananda, F., Chaiwongkot, A., & Bhattarakosol, P. (2017). Elevated HPV16 E1 Expression Is Associated with Cervical Cancer Progression. *Intervirology*, 60(5), 171–180. <https://doi.org/10.1159/000487048>

Baediananda, F., Sasivimolrattana, T., Chaiwongkot, A., Varadarajan, S., & Bhattarakosol, P. (2022). Role of HPV16 E1 in cervical carcinogenesis. *Frontiers in*



cellular and infection microbiology, 12, 955847.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.955847>

Biswas, D. K., Shi, Q., Baily, S., Strickland, I., Ghosh, S., Pardee, A. B., & Iglehart, J. D. (2004). NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27), 10137–10142.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0403621101>

Blitz, I. L., & Laimins, L. A. (1991). The 68-kilodalton E1 protein of bovine papillomavirus is a DNA binding phosphoprotein which associates with the E2 transcriptional activator in vitro. *Journal of virology*, 65(2), 649–656.
<https://doi.org/10.1128/JVI.65.2.649-656.1991>

Bonne-Andrea, C., Santucci, S., & Clertant, P. (1995). Bovine papillomavirus E1 protein can, by itself, efficiently drive multiple rounds of DNA synthesis in vitro. *Journal of virology*, 69(5), 3201–3205. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.5.3201-3205.1995>

Bonne-Andrea, C., Santucci, S., Clertant, P., & Tillier, F. (1995). Bovine papillomavirus E1 protein binds specifically DNA polymerase alpha but not replication protein A. *Journal of virology*, 69(4), 2341–2350.
<https://doi.org/10.1128/JVI.69.4.2341-2350.1995>

Boulabiar, M., Boubaker, S., Favre, M., & Demeret, C. (2011). Keratinocyte sensitization to tumour necrosis factor-induced nuclear factor kappa B activation by the E2 regulatory protein of human papillomaviruses. *The Journal of general virology*, 92(Pt 10), 2422–2427. <https://doi.org/10.1099/vir.0.032466-0>

Buck, C. B., Day, P. M., & Trus, B. L. (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, 445(1-2), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.038>



Buss, H., Dörrie, A., Schmitz, M. L., Hoffmann, E., Resch, K., & Kracht, M. (2004). Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- κ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I κ B kinase (IKK)- α , IKK β , IKK ϵ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *The Journal of biological chemistry*, 279(53), 55633–55643. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409825200>

Buss, H., Handschick, K., Jurrmann, N., Pekkonen, P., Beuerlein, K., Müller, H., Wait, R., Saklatvala, J., Ojala, P. M., Schmitz, M. L., Naumann, M., & Kracht, M. (2012). Cyclin-dependent kinase 6 phosphorylates NF- κ B P65 at serine 536 and contributes to the regulation of inflammatory gene expression. *PloS one*, 7(12), e51847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051847>

Buss, H., Handschick, K., Jurrmann, N., Pekkonen, P., Beuerlein, K., Müller, H., Wait, R., Saklatvala, J., Ojala, P. M., Schmitz, M. L., Naumann, M., & Kracht, M. (2012). Cyclin-dependent kinase 6 phosphorylates NF- κ B P65 at serine 536 and contributes to the regulation of inflammatory gene expression. *PloS one*, 7(12), e51847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051847>

Cahir-McFarland, E. D., Carter, K., Rosenwald, A., Giltnane, J. M., Henrickson, S. E., Staudt, L. M., & Kieff, E. (2004). Role of NF-kappa B in cell survival and transcription of latent membrane protein 1-expressing or Epstein-Barr virus latency III-infected cells. *Journal of virology*, 78(8), 4108–4119. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.8.4108-4119.2004>

Cao, S., Zhang, X., Edwards, J. P., & Mosser, D. M. (2006). NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *The Journal of biological chemistry*, 281(36), 26041–26050. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602222200>

Castillo, A., Wang, L., Koriyama, C., Eizuru, Y., Jordan, K., & Akiba, S. (2014). A systems biology analysis of the changes in gene expression via silencing of HPV-



18 E1 expression in HeLa cells. *Open biology*, 4(10), 130119.
<https://doi.org/10.1098/rsob.130119>

Castro-Muñoz, L. J., Manzo-Merino, J., Muñoz-Bello, J. O., Olmedo-Nieva, L., Cedro-Tanda, A., Alfaro-Ruiz, L. A., Hidalgo-Miranda, A., Madrid-Marina, V., & Lizano, M. (2019). The Human Papillomavirus (HPV) E1 protein regulates the expression of cellular genes involved in immune response. *Scientific reports*, 9(1), 13620. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49886-4>

Cerqueira, C., & Schiller, J. T. (2017). Papillomavirus assembly: An overview and perspectives. *Virus research*, 231, 103–107.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.010>

Chiang, C. Y., Engel, A., Opaluch, A. M., Ramos, I., Maestre, A. M., Secundino, I., De Jesus, P. D., Nguyen, Q. T., Welch, G., Bonamy, G. M., Miraglia, L. J., Orth, A. P., Nizet, V., Fernandez-Sesma, A., Zhou, Y., Barton, G. M., & Chanda, S. K. (2012). Cofactors required for TLR7- and TLR9-dependent innate immune responses. *Cell host & microbe*, 11(3), 306–318.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.02.002>

Côté-Martin, A., Moody, C., Fradet-Turcotte, A., D'Abramo, C. M., Lehoux, M., Joubert, S., Poirier, G. G., Coulombe, B., Laimins, L. A., & Archambault, J. (2008). Human papillomavirus E1 helicase interacts with the WD repeat protein p80 to promote maintenance of the viral genome in keratinocytes. *Journal of virology*, 82(3), 1271–1283. <https://doi.org/10.1128/JVI.01405-07>

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

Das, R., Coupar, J., Clavijo, P. E., Saleh, A., Cheng, T. F., Yang, X., Chen, J., Van Waes, C., & Chen, Z. (2019). Lymphotoxin- β receptor-NIK signaling induces



alternative RELB/NF- κ B2 activation to promote metastatic gene expression and cell migration in head and neck cancer. *Molecular carcinogenesis*, 58(3), 411–425. <https://doi.org/10.1002/mc.22938>

Demchenko, Y. N., & Kuehl, W. M. (2010). A critical role for the NF κ B pathway in multiple myeloma. *Oncotarget*, 1(1), 59–68. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.109>

Di Stefano, V., Wang, B., Parobchak, N., Roche, N., & Rosen, T. (2015). RelB/p52-mediated NF- κ B signaling alters histone acetylation to increase the abundance of corticotropin-releasing hormone in human placenta. *Science signaling*, 8(391), ra85. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa9806>

Dimitrakopoulos, F. D., Antonacopoulou, A. G., Kottorou, A. E., Panagopoulos, N., Kalofonou, F., Sampsonas, F., Scopa, C., Kalofonou, M., Koutras, A., Makatsoris, T., Dougenis, D., Papadaki, H., Brock, M., & Kalofonos, H. P. (2019). Expression Of Intracellular Components of the NF- κ B Alternative Pathway (NF- κ B2, RelB, NIK and Bcl3) is Associated With Clinical Outcome of NSCLC Patients. *Scientific reports*, 9(1), 14299. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50528-y>

Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., & Matias-Guiu, X. (2005). NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 446(5), 475–482. <https://doi.org/10.1007/s00428-005-1264-9>

Ducasa, N., Grasso, D., Benencio, P., Papademetrio, D. L., Biglione, M., Kashanchi, F., Berini, C., & Garcia, M. N. (2021). Autophagy in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) Induced Leukemia. *Frontiers in oncology*, 11, 641269. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.641269>

Egawa, N., & Doorbar, J. (2017). The low-risk papillomaviruses. *Virus research*, 231, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.12.017>



Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H., & Doorbar, J. (2015). Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*, 7(7), 3863–3890. <https://doi.org/10.3390/v7072802>

Elsharkawy, A. M., Oakley, F., Lin, F., Packham, G., Mann, D. A., & Mann, J. (2010). The NF-kappaB p50:p50:HDAC-1 repressor complex orchestrates transcriptional inhibition of multiple pro-inflammatory genes. *Journal of hepatology*, 53(3), 519–527. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.03.025>

Erazo-Luna, E. V., & Velásquez-Lopera, M. M. (2019). Respuesta inmunológica al virus del papiloma humano. *Dermatol Rev Mex*, 40-59.

Ersing, I., Bernhardt, K., & Gewurz, B. E. (2013). NF-κB and IRF7 pathway activation by Epstein-Barr virus Latent Membrane Protein 1. *Viruses*, 5(6), 1587–1606. <https://doi.org/10.3390/v5061587>

Fries, K. L., Miller, W. E., & Raab-Traub, N. (1999). The A20 protein interacts with the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) and alters the LMP1/TRAF1/TRADD complex. *Virology*, 264(1), 159–166. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9980>

Gilmore T. D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51), 6680–6684. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209954>

Giridharan, S., & Srinivasan, M. (2018). Mechanisms of NF-κB p65 and strategies for therapeutic manipulation. *Journal of inflammation research*, 11, 407–419. <https://doi.org/10.2147/JIR.S140188>



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

Greenfeld, H., Takasaki, K., Walsh, M. J., Ersing, I., Bernhardt, K., Ma, Y., Fu, B., Ashbaugh, C. W., Cabo, J., Mollo, S. B., Zhou, H., Li, S., & Gewurz, B. E. (2015). TRAF1 Coordinates Polyubiquitin Signaling to Enhance Epstein-Barr Virus LMP1-Mediated Growth and Survival Pathway Activation. *PLoS pathogens*, 11(5), e1004890. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004890>

Guan, H., Hou, S., & Ricciardi, R. P. (2005). DNA binding of repressor nuclear factor-kappaB p50/p50 depends on phosphorylation of Ser337 by the protein kinase A catalytic subunit. *The Journal of biological chemistry*, 280(11), 9957–9962. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412180200>

Harhaj, E. W., & Sun, S. C. (1999). IKKgamma serves as a docking subunit of the IkkappaB kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus Tax protein. *The Journal of biological chemistry*, 274(33), 22911–22914. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.22911>

Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2012). NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development*, 26(3), 203–234. <https://doi.org/10.1101/gad.183434.111>

Herfs, M., Yamamoto, Y., Laury, A., Wang, X., Nucci, M. R., McLaughlin-Drubin, M. E., Münger, K., Feldman, S., McKeon, F. D., Xian, W., & Crum, C. P. (2012). A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26), 10516–10521. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202684109>

Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C., & Strauss, M. (1999). NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression



and G0/G1-to-S-phase transition. *Molecular and cellular biology*, 19(4), 2690–2698. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.4.2690>Hu, Z., & Ma, D. (2018). The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. *Cancer medicine*, 7(10), 5217–5236. <https://doi.org/10.1002/cam4.1501>

Hsiao, H. B., Chou, A. H., Lin, S. I., Chen, I. H., Lien, S. P., Liu, C. C., Chong, P., & Liu, S. J. (2014). Toll-like receptor 9-mediated protection of enterovirus 71 infection in mice is due to the release of danger-associated molecular patterns. *Journal of virology*, 88(20), 11658–11670.

Hu, M. C., Lee, D. F., Xia, W., Golfman, L. S., Ou-Yang, F., Yang, J. Y., Zou, Y., Bao, S., Hanada, N., Saso, H., Kobayashi, R., & Hung, M. C. (2004). IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell*, 117(2), 225–237. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00302-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00302-2)

Huang, W. C., & Hung, M. C. (2013). Beyond NF- κ B activation: nuclear functions of I κ B kinase α . *Journal of biomedical science*, 20(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-3>

Hussain, A. R., Ahmed, S. O., Ahmed, M., Khan, O. S., Al Abdulmohsen, S., Plataniias, L. C., Al-Kuraya, K. S., & Uddin, S. (2012). Cross-talk between NF κ B and the PI3-kinase/AKT pathway can be targeted in primary effusion lymphoma (PEL) cell lines for efficient apoptosis. *PloS one*, 7(6), e39945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039945>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Ishii, Y., Taguchi, A., & Kukimoto, I. (2020). The homeobox transcription factor HOXC13 upregulates human papillomavirus E1 gene expression and contributes to viral genome maintenance. *FEBS letters*, 594(4), 751–762. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13646>



Ishizuka, E. K., Filgueiras, L. R., Rios, F. J., Serezani, C. H., & Jancar, S. (2016). PAFR activation of NF- κ B p65 or p105 precursor dictates pro- and anti-inflammatory responses during TLR activation in murine macrophages. *Scientific reports*, 6, 32092. <https://doi.org/10.1038/srep32092>

Israel A. (2010). The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(3), a000158. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000158>

Ichim, G., & Tait, S. W. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature reviews. Cancer*, 16(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.58>

Jin, J., Hu, H., Li, H. S., Yu, J., Xiao, Y., Brittain, G. C., Zou, Q., Cheng, X., Mallette, F. A., Watowich, S. S., & Sun, S. C. (2014). Noncanonical NF- κ B pathway controls the production of type I interferons in antiviral innate immunity. *Immunity*, 40(3), 342–354. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.02.006>

Kaltschmidt, C., Greiner, J., & Kaltschmidt, B. (2021). The Transcription Factor NF- κ B in Stem Cells and Development. *Cells*, 10(8), 2042. <https://doi.org/10.3390/cells10082042>

Kawasaki, T., & Kawai, T. (2019). Discrimination Between Self and Non-Self-Nucleic Acids by the Innate Immune System. *International review of cell and molecular biology*, 344, 1–30. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.08.004>

Kim, J. E., Jun, S., Song, M., Kim, J. H., & Song, Y. J. (2012). The extract of *Chrysanthemum indicum* Linne inhibits EBV LMP1-induced NF- κ B activation and the viability of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(5), 1524–1528. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.034>



Kim, S. H., Oh, J. M., No, J. H., Bang, Y. J., Juhn, Y. S., & Song, Y. S. (2009). Involvement of NF- κ B and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. *Carcinogenesis*, 30(5), 753–757. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp066>

Kim, S. H., Oh, J. M., No, J. H., Bang, Y. J., Juhn, Y. S., & Song, Y. S. (2009). Involvement of NF- κ B and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. *Carcinogenesis*, 30(5), 753–757. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp066>

Lavorgna, A., & Harhaj, E. W. (2012). EBV LMP1: New and shared pathways to NF- κ B activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), 2188–2189. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121357109>

Ledoux, A. C., & Perkins, N. D. (2014). NF- κ B and the cell cycle. *Biochemical Society transactions*, 42(1), 76–81. <https://doi.org/10.1042/BST20130156> Lee, D., Sohn, H., Kalpana, G. V., & Choe, J. (1999). Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature*, 399(6735), 487–491. <https://doi.org/10.1038/20966>

Lee, D., Sohn, H., Kalpana, G. V., & Choe, J. (1999). Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature*, 399(6735), 487–491. <https://doi.org/10.1038/20966>

Lemercier, C., Verdell, A., Gallo, B., Curtet, S., Brocard, M. P., & Khochbin, S. (2000). mHDA1/HDAC5 histone deacetylase interacts with and represses MEF2A transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry*, 275(20), 15594–15599. <https://doi.org/10.1074/jbc.M908437199>

Li, S., Lv, M., Qiu, S., Meng, J., Liu, W., Zuo, J., & Yang, L. (2019). NF- κ B p65 promotes ovarian cancer cell proliferation and migration via regulating



mortalin. *Journal of cellular and molecular medicine*, 23(6), 4338–4348.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.14325>

Lin, L., DeMartino, G. N., & Greene, W. C. (1998). Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell*, 92(6), 819–828.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81409-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81409-9)

Lin, T. H., Pajarinen, J., Lu, L., Nabeshima, A., Cordova, L. A., Yao, Z., & Goodman, S. B. (2017). NF-κB as a Therapeutic Target in Inflammatory-Associated Bone Diseases. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 107, 117–154. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2016.11.002>

Liu, D., Wu, A., Cui, L., Hao, R., Wang, Y., He, J., & Guo, D. (2014). Hepatitis B virus polymerase suppresses NF-κB signaling by inhibiting the activity of IKKs via interaction with Hsp90β. *PloS one*, 9(3), e91658.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091658>

Liu, X., Roberts, J., Dakic, A., Zhang, Y., & Schlegel, R. (2008). HPV E7 contributes to the telomerase activity of immortalized and tumorigenic cells and augments E6-induced hTERT promoter function. *Virology*, 375(2), 611–623.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.02.025>

Lucito, R., & Schneider, R. J. (1992). Hepatitis B virus X protein activates transcription factor NF-kappa B without a requirement for protein kinase C. *Journal of virology*, 66(2), 983–991. <https://doi.org/10.1128/JVI.66.2.983-991.1992>

Mauro, C., Zazzeroni, F., Papa, S., Bubici, C., & Franzoso, G. (2009). The NF-kappaB transcription factor pathway as a therapeutic target in cancer: methods for detection of NF-kappaB activity. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 512, 169–207. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-530-9_10



McBride A. A. (2008). Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Advances in virus research*, 72, 155–205. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00404-1)

McBride A. A. (2013). The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, 445(1-2), 57–79. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.006>

Meterissian, S. H., Kontogiannea, M., Al-Sowaidi, M., Linjawi, A., Halwani, F., Jamison, B., & Edwardes, M. (2001). Bcl-2 is a useful prognostic marker in Dukes' B colon cancer. *Annals of surgical oncology*, 8(6), 533–537. <https://doi.org/10.1007/s10434-001-0533-3>

Miraghazadeh, B., & Cook, M. C. (2018). Nuclear Factor-kappaB in Autoimmunity: Man and Mouse. *Frontiers in immunology*, 9, 613. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00613>

Mitchell, S., Vargas, J., & Hoffmann, A. (2016). Signaling via the NFκB system. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, 8(3), 227–241. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1331>

Moody, C. A., Fradet-Turcotte, A., Archambault, J., & Laimins, L. A. (2007). Human papillomaviruses activate caspases upon epithelial differentiation to induce viral genome amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19541–19546. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707947104>

Nakahara, T., Tanaka, K., Ohno, S., Egawa, N., Yugawa, T., & Kiyono, T. (2015). Activation of NF-κB by human papillomavirus 16 E1 limits E1-dependent viral replication through degradation of E1. *Journal of virology*, 89(9), 5040–5059. <https://doi.org/10.1128/JVI.00389-15>



Neri, A., Marrelli, D., Roviello, F., DeMarco, G., Mariani, F., DeStefano, A., Megha, T., Caruso, S., Corso, G., Cioppa, T., & Pinto, E. (2006). Bcl-2 expression correlates with lymphovascular invasion and long-term prognosis in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 99(1), 77–83. <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9183-2>

Nolan, G. P., Fujita, T., Bhatia, K., Huppi, C., Liou, H. C., Scott, M. L., & Baltimore, D. (1993). The bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear I kappa B-like molecule that preferentially interacts with NF-kappa B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Molecular and cellular biology*, 13(6), 3557–3566. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.6.3557-3566.1993>

Oikawa, D., Hatanaka, N., Suzuki, T., & Tokunaga, F. (2020). Cellular and Mathematical Analyses of LUBAC Involvement in T Cell Receptor-Mediated NF-κB Activation Pathway. *Frontiers in immunology*, 11, 601926. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.601926>

Okamoto, T., Sanda, T., & Asamitsu, K. (2007). NF-kappa B signaling and carcinogenesis. *Current pharmaceutical design*, 13(5), 447–462. <https://doi.org/10.2174/138161207780162944>

O'Shea, J. M., & Perkins, N. D. (2010). Thr435 phosphorylation regulates RelA (p65) NF-kappaB subunit transactivation. *The Biochemical journal*, 426(3), 345–354. <https://doi.org/10.1042/BJ20091630>

Pal, A., & Kundu, R. (2020). Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Frontiers in microbiology*, 10, 3116. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03116>

Park, E., Zhu, F., Liu, B., Xia, X., Shen, J., Bustos, T., Fischer, S. M., & Hu, Y. (2007). Reduction in IkappaB kinase alpha expression promotes the development of skin papillomas and carcinomas. *Cancer research*, 67(19), 9158–9168. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0590>



Park, K. J., Krishnan, V., O'Malley, B. W., Yamamoto, Y., & Gaynor, R. B. (2005). Formation of an IKK α -dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Molecular cell*, 18(1), 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.006>

Park, M. H., & Hong, J. T. (2016). Roles of NF- κ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells*, 5(2), 15. <https://doi.org/10.3390/cells5020015>

Pflug, K. M., & Sitcheran, R. (2020). Targeting NF- κ B-Inducing Kinase (NIK) in Immunity, Inflammation, and Cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8470. <https://doi.org/10.3390/ijms21228470>

Pinatti, L. M., Walline, H. M., & Carey, T. E. (2018). Human Papillomavirus Genome Integration and Head and Neck Cancer. *Journal of dental research*, 97(6), 691–700. <https://doi.org/10.1177/0022034517744213>

Pradère, J. P., Hernandez, C., Koppe, C., Friedman, R. A., Luedde, T., & Schwabe, R. F. (2016). Negative regulation of NF- κ B p65 activity by serine 536 phosphorylation. *Science signaling*, 9(442), ra85. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aab2820>

Pramanik, K. C., Makena, M. R., Bhowmick, K., & Pandey, M. K. (2018). Advancement of NF- κ B Signaling Pathway: A Novel Target in Pancreatic Cancer. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3890. <https://doi.org/10.3390/ijms19123890>

Rahman, M. M., & McFadden, G. (2011). Modulation of NF- κ B signalling by microbial pathogens. *Nature reviews. Microbiology*, 9(4), 291–306. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2539>



Rahman, M. M., & McFadden, G. (2011). Modulation of NF- κ B signalling by microbial pathogens. *Nature reviews. Microbiology*, 9(4), 291–306. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2539>

Rangasamy, D., & Wilson, V. G. (2000). Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell Ubc9 protein. *The Journal of biological chemistry*, 275(39), 30487–30495. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003898200>

Richards, R. M., Lowy, D. R., Schiller, J. T., & Day, P. M. (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1522–1527.

Richmond A. (2002). Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nature reviews. Immunology*, 2(9), 664–674. <https://doi.org/10.1038/nri887>

Rosenstierne, M. W., Vinther, J., Hansen, C. N., Prydsøe, M., & Norrild, B. (2003). Identification and characterization of a cluster of transcription start sites located in the E6 ORF of human papillomavirus type 16. *The Journal of general virology*, 84(Pt 11), 2909–2920. <https://doi.org/10.10>

Sartorius, R., Trovato, M., Manco, R., D'Apice, L., & De Berardinis, P. (2021). Exploiting viral sensing mediated by Toll-like receptors to design innovative vaccines. *NPJ vaccines*, 6(1), 127. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00391-8>

Schiller, J. T., Day, P. M., & Kines, R. C. (2010). Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic oncology*, 118(1 Suppl), S12–S17. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.04.004>



Simon, P. S., Sharman, S. K., Lu, C., Yang, D., Paschall, A. V., Tulachan, S. S., & Liu, K. (2015). The NF- κ B p65 and p50 homodimer cooperate with IRF8 to activate iNOS transcription. *BMC cancer*, 15, 770. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1808-6>

Soubannier, V., & Stifani, S. (2017). NF- κ B Signalling in Glioblastoma. *Biomedicines*, 5(2), 29. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5020029>

Spitkovsky, D., Hehner, S. P., Hofmann, T. G., Möller, A., & Schmitz, M. L. (2002). The human papillomavirus oncoprotein E7 attenuates NF- κ B activation by targeting the I κ B kinase complex. *The Journal of biological chemistry*, 277(28), 25576–25582.

Sun S. C. (2011). Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell research*, 21(1), 71–85. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.177>

Sun S. C. (2012). The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunological reviews*, 246(1), 125–140. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01088.x>

Sun S. C. (2017). The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 17(9), 545–558. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.52>

Sun, S. C., & Cesarman, E. (2011). NF- κ B as a target for oncogenic viruses. *Current topics in microbiology and immunology*, 349, 197–244. https://doi.org/10.1007/82_2010_108

Swindle, C. S., & Engler, J. A. (1998). Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1. *Journal of virology*, 72(3), 1994–2001. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.3.1994-2001.1998>



Szymonowicz, K. A., & Chen, J. (2020). Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. *Cancer biology & medicine*, 17(4), 864–878. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0370>

Takada, H., Imadome, K. I., Shibayama, H., Yoshimori, M., Wang, L., Saitoh, Y., Uota, S., Yamaoka, S., Koyama, T., Shimizu, N., Yamamoto, K., Fujiwara, S., Miura, O., & Arai, A. (2017). EBV induces persistent NF- κ B activation and contributes to survival of EBV-positive neoplastic T- or NK-cells. *PloS one*, 12(3), e0174136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174136>

Takada, K., & Ono, Y. (1989). Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes. *Journal of virology*, 63(1), 445–449. <https://doi.org/10.1128/JVI.63.1.445-449.1989>

Terenzi, F., Saikia, P., & Sen, G. C. (2008). Interferon-inducible protein, P56, inhibits HPV DNA replication by binding to the viral protein E1. *The EMBO journal*, 27(24), 3311–3321. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.241>

Thieblemont, N., Haeffner-Cavaillon, N., Haeffner, A., Cholley, B., Weiss, L., & Kazatchkine, M. D. (1995). Triggering of complement receptors CR1 (CD35) and CR3 (CD11b/CD18) induces nuclear translocation of NF-kappa B (p50/p65) in human monocytes and enhances viral replication in HIV-infected monocytic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(10), 4861–4867.

Vallabhapurapu, S. D., Noothi, S. K., Pullum, D. A., Lawrie, C. H., Pallapati, R., Potluri, V., Kuntzen, C., Khan, S., Plas, D. R., Orłowski, R. Z., Chesi, M., Kuehl, W. M., Bergsagel, P. L., Karin, M., & Vallabhapurapu, S. (2015). Transcriptional repression by the HDAC4-RelB-p52 complex regulates multiple myeloma survival and growth. *Nature communications*, 6, 8428. <https://doi.org/10.1038/ncomms9428>

Van Doorslaer, K., Li, Z., Xirasagar, S., Maes, P., Kaminsky, D., Liou, D., Sun, Q., Kaur, R., Huyen, Y., & McBride, A. A. (2017). The Papillomavirus Episteme: a



major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic acids research*, 45(D1), D499–D506. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw879>

Vandermark, E. R., Deluca, K. A., Gardner, C. R., Marker, D. F., Schreiner, C. N., Strickland, D. A., Wilton, K. M., Mondal, S., & Woodworth, C. D. (2012). Human papillomavirus type 16 E6 and E 7 proteins alter NF- κ B in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF- κ B promotes cell growth and immortalization. *Virology*, 425(1), 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.12.023>

Wagner H. (2004). The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends in immunology*, 25(7), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.04.011>

Wilson, V. G., West, M., Woytek, K., & Rangasamy, D. (2002). Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus genes*, 24(3), 275–290. <https://doi.org/10.1023/a:1015336817836>

Yang, A., Farmer, E., Wu, T. C., & Hung, C. F. (2016). Perspectives for therapeutic HPV vaccine development. *Journal of biomedical science*, 23(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0293-9>

Yu, Y., Wan, Y., & Huang, C. (2009). The biological functions of NF- κ B1 (p50) and its potential as an anti-cancer target. *Current cancer drug targets*, 9(4), 566–571. <https://doi.org/10.2174/156800909788486759>

Zhang, Q., Lenardo, M. J., & Baltimore, D. (2017). 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell*, 168(1-2), 37–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.012>

zur Hausen H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews. Cancer*, 2(5), 342–350. <https://doi.org/10.1038/nrc798>

