



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas –  
Universidad Nacional de Rosario

**Tesis de Doctorado**

**"Estudio de la contribución de factores celulares y virales en  
los procesos tumorales asociados a infecciones por virus  
oncogénicos"**

Presentada por:

**Marina Paula Bugnon Valdano**

**Rosario, Argentina  
2016**

**"Estudio de la contribución de factores celulares y virales en los procesos tumorales asociados a infecciones por virus oncogénicos"**

**Marina Paula Bugnon Valdano**

**Licenciada en Biotecnología  
Universidad Nacional de Rosario**

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Virus Oncogénicos del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Área Virología, de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre Septiembre 2011 y Abril de 2016, bajo la dirección de la Dra. Daniela Gardiol y la Co-dirección de la Dra. Ana Laura Cavatorta.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo esta Tesis a Daniela, una Directora como pocas. Significa mucho para mí haberte tenido a mi lado, aprender de vos, saberte acompañándome en cada paso. Desde el primer día sentí que te jugabas conmigo en esto. Gracias!

También a Ana. Por compartir toda tu experiencia y porque te animaste a que aprendamos juntas en este camino que me ayudaste a recorrer. Por tus consejos, gracias!

Gracias a los divorciados más unidos de la historia.

A Flor y Fede, mis dos pilares. Flor mi cómplice, Fede mi cumpa. No hubiera podido sin ustedes. Sí que hemos crecido juntos, amigos!!! Por juntaditas eternas que nos sigan uniendo... con Luca y con los que vengan.

A Chui (así como suena) y a German. Gracias por enseñarme tanto, por estar y volver a estar a cada momento. Si la paciencia ya era su fuerte, estoy segura de que colaboré a mejorarla.

A todas las Chicas de viro. A Elita, porque te encontré sin buscarte, y es hermoso tener esta certeza de que vas a seguir formando parte de mi vida. A Clau, con la sonrisa siempre a mano y con el hombro dispuesto. A Rox, con las palabras justas a tiempo. A Ale, con su paciencia y su aliento. A Lola, con su música, que vino e hizo imposible otra cosa que quererla. A Nadica, con su alegría y los ojos más sinceros del mundo.

A Mench, por ser una copada y estar siempre dispuesta a una ayuda sincera. A Mary Rose, por su calidez. A Migue, porque sos una persona entrañable... el chicle que une a esta gran familia.

A Guido, sos un groso chiquito! Gracias por el aguante. A Cone, anexo de los buenos si los hay. A Amelie, Ray y Sergei. A Emma. A las chicas del servicio. A todos los que pasaron, dejaron huella.

A Andrés y Gra, porque me demuestran que ser amigos no es poder verse siempre, sino bien.

A todo Viro. Porque me enseñaron que uno puede sentirse en familia en el trabajo.

Mi sincero agradecimiento a esta Facu y al Instituto, por la gente genial que conocí y en especial como ejemplo de las oportunidades que se me ofrecieron y que pude tomar para formarme, hacer lo que me gusta y siempre seguir aprendiendo.

Quiero agradecer también a mi Familia, que es de esas que se nombran con todo el orgullo del mundo. A todos, los amo! Fueron un apoyo indispensable durante estos años... y lo van a seguir siendo. Gracias por aprender que las celulitas se me mueren de vez en cuando.

A mis papás, porque me acompañan en cada sueño, me impulsan. Porque su amor es lo primero que aprendí y a lo que siempre vuelvo. Papá con tus abrazos fuertes que me llenan el alma, Mamá con tu locura hermosa que admiro y tus besos, gracias!

A vos, Ceci!!! Por ser mi hermana y mucho más. Por la oreja y el amor. Porque si hasta acá llegué con vos, así seguiremos siempre... juntas y de la mano. A Andrews, porque me entendés y hacés que toda la flia me entienda un poco más. A Manu por enseñarme a amar de otra manera, lucecita nueva y de las más brillantes en mi vida.

A Moni, por ser puro amor y mostrarme las respuestas más simples. A mis abus postizos, que me apuntalaron tanto de este lado y ahora me acompañan desde el corazón.

A nuestra familia que se va agrandando y me va ensanchando el pecho de tanta alegría.

*A mis amigos. Al Pin... el nombre de este grupete es como nuestra amistad. No sabemos muy bien cuándo ni cómo, pero nos pasó. A Chufín y a Bat. A Flor, mi florcita dulce, te quiero! A Leoncito y a los que se sumen. Larga vida al Pin group!*

*A la peña, por escuchar hasta entenderme, gracias.*

*A Estef y a Romi. Tan distintas y sin embargo tan iguales. Porque nos complementamos y porque son ese rinconcito que me llena la cabeza pero más el corazón. Mis amigas, las volvería a elegir hoy y siempre.*

*A Lu, mi hermana del alma y si existiera (aunque me suena a cuento) mi media naranja. Gracias por iluminarme con tu luz, nos vemos en esta vida y en la que venga.*

*A Pablo, mi amor. Porque este camino lo empecé sin vos, para encontrarte en él y para terminarlo más feliz que nunca a tu lado. Y todas las rutas que vienen van a ser nuestras y las vamos a trazar juntos. Te amo y se me llena el alma de decirlo. Simplemente me enseñaste lo que es amar sin límites, sin reservas. Ahora, a caminar! que el camino que arrancamos es largo y hermoso...*

*Pensando cómo emprendí esta aventura, la verdad es que ella me encontró a mí. Al principio siguiendo mis ganas, mis ilusiones... y al final sintiéndose latir fuerte desde mis entrañas. Y lo mejor fue que me llevó a encontrarme con amigos queridos, con personas inspiradoras y con aprendizajes de vida que me marcaron a fuego. Sencillamente no soy hoy la misma que fui. Y si de sincerarse va a ser esto, déjenme contarles que esta que soy hoy tiene mucho más sabor a mí. ¡Qué difícil es escribir este hasta luego! Deberé confesarles que siempre me costaron bastante las despedidas, las pausas, los hasta siempre. Cuesta sobre todo intentar dar vuelta esta página con tantas cosas vividas.*

*Y será entonces el momento de que los abrace con este GRACIAS infinito que se me cruza en la garganta. Gracias, porque este camino fue con y POR ustedes.*

“En realidad las cosas verdaderamente difíciles son todo lo que la gente cree poder hacer a cada momento”.

*Julio Cortázar*

Parte de los resultados que se describen en el presente trabajo de Tesis han sido publicados en:

**“Disc Large 1 expression is altered by Human Papillomavirus E7 and E6 proteins in organotypic cultures of human keratinocytes”.** Bugnon Valdano, Marina; Cavatorta, Ana Laura; Morale, Mirian Gallote; Marziali, Federico; de Souza Lino, Vanesca; Steenbergen, Renske; Boccardo, Enrique y Gardiol, Daniela. *Journal of General Virology*, *aceptado, en prensa (2015)*.

Participación en trabajos publicados en el grupo de investigación:

- **“Transcriptional and translational mechanisms contribute to regulate the expression of Disc Large 1 protein during different biological processes”.** Federico Marziali\*, Ana Laura Cavatorta\*, **Marina Bugnon Valdano**, Florencia Facciuto and Daniela Gardiol. *Biology Chemistry; volume 396, Issue 8, Pages 893–902 (2015)*.
- **“Human papillomavirus (HPV)-18 E6 oncoprotein interfere with the epithelial cell polarity Par3 protein”.** Florencia Facciuto, **Marina Bugnon Valdano**, Federico Marziali, Paola Massimi, Lawrence Banks, Ana Laura Cavatorta, Daniela Gardiol. *Molecular Oncology Molecular Oncology; volume 8, issue 3, 533-43 (2014)*.
- **“Differential expression of PDZ-containing proteins in human diseases: challenging topics and novel issues”.** Florencia Facciuto, Ana Laura Cavatorta, **Marina Bugnon Valdano**, Federico Marziali y Daniela Gardiol. 2012. *The FEBS Journal; volume 279, issue 19, 3538–3548 (2012)*.
- **“Regulation of Translational Efficiency by Different Splice Variants of the DLG1 5’UTR”.** Ana Laura Cavatorta, Florencia Facciuto, **Marina Bugnon Valdano**, Adriana A. Giri, Lawrence Banks, Daniela Gardiol. *The FEBS Journal; volume 278, issue 14, 2596-2608 (2011)*.

## Presentaciones a reuniones científicas

- **Bugnon Valdano, M.**; Marziali, F.; Cavatorta, A.L.; Barbieri, G.; F. Facciuto; E. Boccardo; D. Gardiol. "Cell polarity disruption during HPV infections". Advanced School on Molecular and Cell Biology to Unravel the Physiology/Pathology of Diverse Biological Paradigms. Montevideo, Uruguay, 9-22 de noviembre de 2015. Presentación tipo póster.
- **Bugnon Valdano, M.**; Marziali, F.; Cavatorta, A.L.; Barbieri, G.; F. Facciuto; E. Boccardo; D. Gardiol. "Cell polarity disruption during HPV infections". DNA Tumour Virus Meeting 2015. Trieste, Italia, 21- 26 de Julio de 2015. Presentación tipo póster.
- **Marina Bugnon Valdano**, AL Cavatorta, F Marziali, G Barbieri, F Facciuto, E Boccardo, D Gardiol. "Regulation of polarity proteins expression during HPV infections". XI Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires- Argentina, 23-26 de Junio de 2015. Presentación tipo póster.
- G Barbieri, **M Bugnon Valdano**, AL Cavatorta, F Marziali, E Boccardo, D Gardiol. "Study of expression of HPV18 E6 oncoprotein isoforms by organotypic raft cultures". XI Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires- Argentina, 23-26 de Junio de 2015. Presentación tipo póster.
- **Marina Bugnon Valdano**; A.L. Cavatorta; F. Marziali; F. Facciuto; E. Boccardo; D. Gardiol. "Regulation of cell polarity proteins during the HPV infection". First ICGB Workshop Human Papillomavirus: From Basic Biology to Cervical Cancer Prevention. Rosario, 19 a 21 de noviembre de 2014. Presentación oral.
- **Marina Bugnon Valdano**; A.L. Cavatorta; F. Marziali; F. Facciuto; E. Boccardo; D. Gardiol. "Cell polarity disruption during HPV carcinogenic processes: analysis of cellular and viral contributions". First ICGB Workshop Human Papillomavirus: From Basic Biology to Cervical Cancer Prevention. Rosario, 19 a 21 de noviembre de 2014. Presentación tipo póster.
- **Marina Bugnon Valdano**; A.L. Cavatorta; F. Marziali; F. Facciuto; E. Boccardo; D. Gardiol. "Cell polarity disruption during carcinogenic processes: analysis of cellular and viral contributions". L Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Rosario, 11 a 14 de noviembre de 2014. Presentación tipo póster. BIOCELL 38 (Suppl. 2).
- **Marina Bugnon Valdano**, Ana Laura Cavatorta, Federico Marziali, Florencia Facciuto, Enrique Boccardo, Daniela Gardiol. "Regulation of cell polarity during carcinogenic processes associated to HPV infections". III Latin American Zebrafish Network (LAZEN) Symposium. 11 y 12 de abril de 2014. Valparaíso, Chile. Presentación tipo póster.

- **Marina Bugnon Valdano**, Federico Marziali, Florencia Facciuto, Ana Laura Cavatorta, Daniela Gardiol. Presentación "*Uso de Herramientas Bioinformáticas para el análisis de la regulación epigenética de la expresión de proteínas involucradas en procesos tumorales*". Dentro de la Mesa Redonda "'La Bioinformática como herramienta para el estudio de los distintos niveles de organización biológicos'". XV Congreso y XXXIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 28-29 de noviembre de 2013. Zavalla, Santa Fe.
- **Bugnon Valdano, MP**; Cavatorta, AL; Marziali, F; Facciuto, F; Boccardo, E; Gardiol, D. "*Cultivos organotípicos tipo raft: herramienta clave para el estudio de la biología de VPH y de los procesos neoplásicos asociados*". XXXIII Reunión Científica Anual de la SAV. 2-3 de Diciembre de 2013. Buenos Aires. Presentación oral (44).
- Facciuto, Florencia N; **Bugnon Valdano Marina P.**, Marziali Federico E.; Cavatorta, Ana Laura; Lawrence Banks; Gardiol Daniela N. "*Oncogenic Human Papillomavirus E6 oncoproteins interfere with cell polarity network*". Discussion meeting on Cellular Polarity: from mechanisms to disease. The Royal Society. Londres, Inglaterra, 15-16 de abril de 2013. Presentación Tipo Poster.
- Federico Marziali, **Marina Bugnon Valdano**, Florencia Facciuto, Ana Laura Cavatorta y Daniela Gardiol. "Analysis of molecular mechanisms that contribute to the development of HTLV-1 associated pathologies". 3rd ICGEB Workshop on Human RNA Viruses. Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina. 2-5 de Abril de 2012. Presentación tipo póster.
- **Bugnon Valdano M**, Cavatorta AL, Marziali F, Facciuto F, Banks L, Gardiol D. "*Mecanismos que contribuyen a la regulación de la expresión del oncosupresor Disc Large, blanco de las oncoproteínas E6 de Papilomavirus humanos oncogénicos.*" X Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires- Argentina, 26-29 de septiembre de 2011. Presentación tipo póster (109).
- Ana Laura Cavatorta, **Marina Bugnon Valdano**, Federico Marziali, Florencia Facciuto, Lawrence Banks and Daniela Gardiol. "*Different mechanisms contribute to regulate the expression of Disc Large 1 Oncosuppressor, a target of high-risk HPV E6 proteins*". ICGEB DNA Tumour Virus Meeting 2011. Trieste, Italia, 19-24 de Julio de 2011. Presentación tipo poster (129).

# ÍNDICE

RESUMEN.....	11
1. INTRODUCCIÓN .....	14
1.1 Virus oncogénicos.....	14
1.2 Virus del Papiloma Humano.....	15
1.2.1 Organización y caracterización del genoma viral.....	16
1.2.2 Epitelio escamoso, blanco de infección de HPV.....	17
1.2.3 Ciclo de replicación viral.....	19
1.2.4 Patologías asociadas a infecciones por HPV mucosotrópicos.....	22
1.2.5 Proteínas E7 y E6 de HPV.....	26
1.3 Polaridad Celular .....	35
1.3.1 Características de DLG1 .....	37
1.3.2 Características de PAR3.....	40
1.3.3 Expresión de proteínas de polaridad en los procesos carcinogénicos .....	41
1.3.4 Regulación del gen de polaridad <i>DLG1</i> durante la progresión maligna.....	44
2. OBJETIVOS .....	49
2.1 Objetivo general .....	49
2.2    Objetivos específicos .....	50
2.2.1 Análisis de la expresión de proteínas de polaridad celular, blancos de HPV, en presencia de las proteínas virales.....	50
2.2.2 Estudio de la expresión génica de HPV en el microambiente epitelial.....	50
2.2.3 Análisis de la regulación de la proteína de polaridad DLG1 por procesos independientes de infecciones virales: mecanismos epigenéticos.....	50
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	51
3.1 Cepas bacterianas y vectores de expresión .....	51
3.2 Células animales utilizadas .....	52
3.3 Condiciones y medios de cultivo.....	53
3.3.1 Medios de cultivo para células bacterianas .....	53
3.3.2 Medio de crecimiento, mantenimiento y soluciones utilizadas para el cultivo de las células animales.....	53
3.3.3 Cultivo celular.....	54
3.4 Transformación de células de <i>E. coli</i> .....	55
3.4.1. Preparación de células a transformar .....	55
3.4.2. Transformación de células competentes con ADN plasmídico .....	56

3.5 Transfección de células animales.....	56
3.6 Tratamiento con el inhibidor de metilación 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-aza) .....	57
3.7 Técnicas concernientes a la manipulación de ácidos nucleicos.....	57
3.7.1 Aislamiento y purificación de ADN plasmídico.....	57
3.7.2 Purificación de ADN genómico.....	58
3.7.3 Extracción de ARN y transcripción reversa (RT).....	58
3.7.4 Estimación de la concentración y calidad de ácidos nucleicos (AN) .....	59
3.7.5 Electroforesis de AN en geles de agarosa .....	59
3.7.6 Tratamiento de ADN con bisulfito sódico .....	60
3.7.7 Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	61
3.7.8 Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa .....	61
3.7.9 Ligado de moléculas de ADN.....	62
3.7.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	62
3.7.11 Secuenciación .....	67
3.8 Cultivos organotípicos raft .....	67
3.8.1 Infecciones y selección de queratinocitos infectados.....	67
3.8.2 Desarrollo de los cultivos organotípicos <i>raft</i> .....	68
3.8.3 Procesamiento de los cultivos <i>raft</i> obtenidos.....	69
3.9 Técnicas concernientes a la manipulación de proteínas.....	69
3.9.1 Preparación de los extractos proteicos .....	69
3.9.2 Cuantificación de extractos proteicos .....	70
3.9.3 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	70
3.9.4 Electrotransferencia de proteínas a membranas (Western Blot) e inmunodetecciones.....	70
3.9.5 Análisis digital de imágenes y análisis estadístico .....	72
3.9.6 Análisis del efecto de proteínas de HPV en la actividad transcripcional del promotor de DLG1 por ensayos de luciferasa.....	72
3.9.7 Ensayos de Inmunohistoquímica (IHQ).....	73
3.9.8 Expresión y purificación de proteínas transgénicas en <i>E. coli</i> como producto de fusión con la proteína GST.....	75
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>78</b>
<b>4.1 CAPÍTULO 1: Análisis de la expresión de proteínas de polaridad celular, blancos de HPV, en presencia de las proteínas virales.....</b>	<b>78</b>
4.1.1 Implicancia de proteínas de HPV en la regulación de la expresión de DLG1 ...	78

4.1.1.1 Estudio de la incidencia de proteínas virales tempranas sobre la actividad promotora de DLG1 .....	78
4.1.1.2 Estudio de la expresión de la proteína de polaridad celular DLG1 en presencia de proteínas de HPV en cultivos organotípicos .....	80
4.1.2 Implicancia de proteínas de HPV en la regulación de la expresión de PAR3....	99
4.1.2.1 Estudio de la expresión de la proteína de polaridad celular PAR3 en presencia de proteínas de HPV en cultivos organotípicos .....	99
4.1.2.2 Estudio de la expresión de PAR3 en biopsias cervicales: análisis preliminares .....	111
4.2 CAPÍTULO 2: Estudio de la expresión génica de HPV en el microambiente epitelial .....	114
4.2.1 Análisis del <i>splicing</i> de los transcritos tempranos de HPV-18 .....	114
4.2.2 Análisis transcripcional de DLG1, blanco celular de HPV, en los estratos epiteliales de cultivos <i>raft</i> .....	119
4.3 CAPÍTULO 3: Análisis de la regulación de la proteína de polaridad DLG1 por procesos independientes de infecciones virales, mecanismos epigenéticos .....	122
4.3.1 Tratamiento con el inhibidor de metilación 5-aza.....	123
4.3.2 Estudio del estado de metilación de la región promotora de <i>DLG1</i> .....	124
4.3.2.1 Digestión con enzimas sensibles al estado de metilación y PCR.....	125
4.3.2.2 Tratamiento con bisulfito sódico, PCR y secuenciación.....	127
5. DISCUSIÓN .....	135
6. CONCLUSIONES.....	159
LENGUAJE ESPECIAL .....	162
ABREVIATURAS .....	163
BIBLIOGRAFÍA .....	166

## RESUMEN

En el presente trabajo de Tesis se profundizó el entendimiento de mecanismos involucrados en la regulación de proteínas de polaridad, con especial interés en la alteración de la expresión de dichas proteínas celulares en los procesos de transformación maligna.

Particularmente, se analizó la regulación de la expresión de la proteína DLG1, cuya expresión se ve alterada en variedad de tumores y que ha sido propuesta como una proteína clave en el mantenimiento de la polaridad celular a nivel de las uniones adherentes. Inicialmente, se estudió la incumbencia en la regulación de DLG1 durante procesos vinculados a infecciones por HPV. Se optimizaron y desarrollaron, por primera vez en nuestro medio, cultivos organotípicos tipo *raft*. Se generaron dichos cultivos expresando las proteínas transformantes de HPV-18, lo que permitió analizar la regulación de DLG1 en un contexto mimetizando el ambiente natural de infección viral. Mediante esta estrategia de estudio se pudieron analizar en detalle los efectos de la presencia de las mencionadas proteínas virales en la expresión de DLG1. Así, se demostró que la presencia de las oncoproteínas virales provoca alteraciones en la distribución subcelular de DLG1 en el ambiente epitelial y, a su vez, genera cambios significativos en sus niveles. También se analizó el efecto de proteínas virales del HPV-11, de bajo riesgo oncogénico, observándose cambios significativos tanto en los niveles como en la distribución de DLG1. Por lo tanto, se profundizó en el entendimiento de los mecanismos subyacentes a infecciones por HPV, tanto asociadas como no a procesos carcinogénicos. Una diferencia importante observada entre ambos tipos virales fue la ausencia de DLG1 en los contactos celulares para HPV-18, efecto no evidenciado en el caso del HPV-11. Estas diferencias entre HPV de alto y bajo riesgo podrían tener relevancia en las patologías asociadas, dado los reportes sobre la función oncosupresora de DLG1 a nivel de los contactos celulares. Además, se analizó y discutió la incumbencia de distintos mecanismos potencialmente involucrados en los cambios de la expresión de DLG1, estudiando en especial detalle la participación de alteraciones en el ciclo celular por parte de HPV.

Por otro lado, se investigó la expresión de otra proteína de polaridad, PAR3, y su alteración en presencia de las proteínas virales. PAR3 es crucial para la formación de las uniones *tight* y en los últimos años se ha incrementado el conocimiento de sus funciones como supresor de tumores. Notablemente, mediante cultivos organotípicos se observaron cambios importantes en los niveles totales de PAR3 en presencia de proteínas de HPV tanto de alto como de bajo riesgo oncogénico, indicando probables mecanismos comunes sobre la expresión de la mencionada proteína celular durante las infecciones virales. Además, se obtuvieron resultados preliminares en el estudio de la expresión de PAR3 en biopsias cervicales, paso importante en la identificación futura de probables biomarcadores.

También, se estudió la expresión génica de HPV en los cultivos *raft* portando las secuencias que codifican para las proteínas E6 y E7 de HPV-18. Una premisa fundamental para conocer como el virus interfiere con los blancos celulares es analizar la expresión de los genes tempranos de HPV, en especial de las distintas isoformas de E6. Así, a partir de técnicas moleculares específicas optimizadas, se demostró una mayor expresión de la isoforma E6\* en las capas Inferiores del epitelio. Además, se encontró a lo largo del tejido epitelial una transcripción diferencial de *DLG1*, en relación directa a los niveles de transcritos virales. Estos datos constituyen un avance en el entendimiento de los cambios en la abundancia de *DLG1* en presencia de HPV.

Dado que cambios en los patrones de la expresión de *DLG1* se observan también en tumores no asociados a HPV, se analizó la incumbencia de factores independientes de tales infecciones. Se investigó la injerencia de mecanismos epigenéticos y, en particular, del estado de metilación de su promotor. Así, se establecieron las bases para el análisis de dichos mecanismos en la regulación de *DLG1*, no estudiado hasta el momento. Estos ensayos no mostraron una relación directa entre la regulación de los niveles de *DLG1* y los mecanismos epigenéticos propuestos, tanto en una variedad de células como en tumores asociados a HPV. No obstante, en base a los resultados obtenidos, dichos mecanismos podrían tener un rol interesante en la regulación de *DLG1* en otros tipos tumorales, particularmente durante la progresión maligna en colon.

Por lo tanto, en total los resultados del presente trabajo indican mecanismos de alteración de proteínas de polaridad por parte de las proteínas de HPV que podrían ser

de gran importancia durante las infecciones naturales. Algunas diferencias fundamentales observadas entre HPV de alto y bajo riesgo podrían resultar relevantes al relacionarse con las patologías asociadas a cada tipo viral. Conjuntamente, los datos presentados constituyen un paso fundamental para comprender la biología del cáncer en general, considerando que la disrupción de la polaridad celular es un evento clave de los procesos tumorales.

Por último, la extrapolación a la clínica de los conocimientos generados desde estudios de patobiología básica, como el presente trabajo, es fundamental para la identificación de biomarcadores que contribuyan al diagnóstico y al tratamiento en enfermedades oncológicas.

# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1 Virus oncogénicos

Los virus oncogénicos están relacionados con la formación de tumores y se estima que entre un 15 y un 20% de los tumores humanos se asocian a infecciones virales, perteneciendo dichos virus a distintas familias (Hibner and Gregoire, 2015; Mueller, 1995). Aunque el número de virus oncogénicos humanos conocidos es pequeño, se relacionan a neoplasias muy frecuentes. En la actualidad, 6 virus diferentes son reconocidos como virus oncogénicos por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), siguiendo un criterio estricto para establecer la causalidad entre la determinada infección viral y el desarrollo de cáncer (Hibner and Gregoire, 2015).

Así, se clasifican como oncovirus a: el virus de Epstein-Barr (EBV), descubierto inicialmente a partir de células del linfoma de Burkitt y también asociado a algunos linfomas de Hodgkin, carcinomas nasofaríngeos y carcinomas gástricos; el virus del Papiloma Humano (HPV), asociado con casi el 100% de cáncer cervical y con una porción significativa de tumores anogenitales y de cabeza y cuello; los virus de la hepatitis B (HBV) y C (HCV) relacionados con el 80% de los casos de carcinoma hepatocelular; el virus linfotrópico de células T (HTLV-1, del inglés *human T-lymphotropic virus type I*), ligado con la leucemia de células T en adultos; y el virus Herpes humano tipo 8 (HSV8, del inglés *Herpes simplex virus 8*), asociado al desarrollo de sarcoma de Kaposi (Hibner and Gregoire, 2015; McLaughlin-Drubin and Munger, 2008). Además, recientemente también ha sido causalmente ligado a la oncogénesis humana un poliomavirus humano, el virus Merkel, asociado al desarrollo de un tipo de cáncer de piel muy agresivo (Feng et al., 2008). Por último, si bien ante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) existe un mayor riesgo de desarrollo de neoplasias (como sarcoma de Kaposi y linfoma no Hodgkin), dicho riesgo es debido presumiblemente a la inmunosupresión generada, por lo que no es en sí mismo considerado un virus oncogénico (Hibner and Gregoire, 2015; Meijide et al., 2013; White et al., 2014).

Cabe recalcar, además, que para todos los virus oncogénicos humanos, el proceso de infección es mucho más frecuente que la ocurrencia del tumor respectivo. Así, solo una pequeña proporción de los individuos infectados cursan el desarrollo

tumoral. De hecho, algunos de los oncovirus mencionados se encuentran ampliamente distribuidos en la población humana. En este sentido, las transformaciones oncogénicas no representan en sí una ventaja para los virus. Al ser los virus parásitos obligados, utilizan las maquinarias celulares y generan cambios fisiopatológicos de las células infectadas. La consecuente perturbación celular y tisular, que asegura el ciclo viral, a su vez incrementa el riesgo de progresión maligna (Hibner and Gregoire, 2015).

Los distintos oncovirus humanos utilizan una variedad de mecanismos diferentes que conllevan al desarrollo tumoral, aunque compartiendo muchas características comunes claves (Martin and Gutkind, 2008). Por lo tanto, los virus oncogénicos representan herramientas de gran valor a la hora de comprender los mecanismos carcinogénicos. El análisis preciso del desarrollo maligno es sumamente dificultoso debido a que los procesos que ocurren en un organismo son muy lentos e inciertos. Por ello, el estudio de los mecanismos moleculares por los cuales dichos virus oncogénicos evaden los sistemas celulares pro-apoptóticos y de control de la proliferación ha sentado las bases para el actual entendimiento de la biología del cáncer (Martin and Gutkind, 2008; Saha et al., 2010).

## **1.2 Virus del Papiloma Humano**

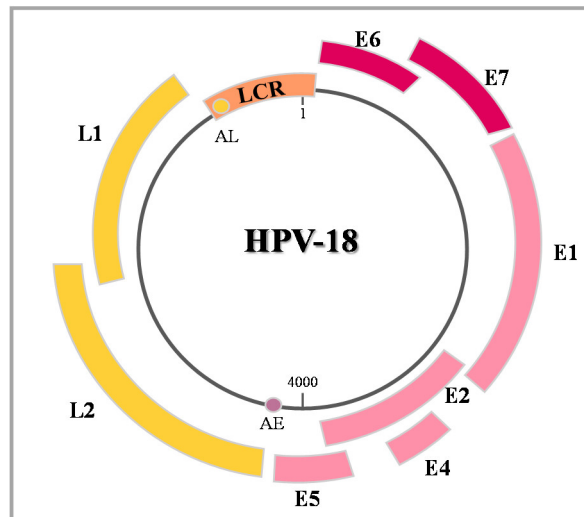
Los HPV son un grupo de virus no envueltos que presentan una cápside icosaédrica de 55 nm de diámetro y un genoma de ADN doble hebra circular de aproximadamente 8 Kb (Zheng and Baker, 2006). Hasta el momento se han identificado y clonado completamente alrededor de 200 tipos de HPV ([www.hpvcenter.se](http://www.hpvcenter.se)), que se dividen en 5 géneros distintos en base a diferencias en sus secuencias nucleotídicas (Bernard et al., 2010). Además pueden distinguirse, en base a su tropismo, entre aquellos que infectan epitelios cutáneos (HPV cutaneotrópicos) y los que infectan mucosas (HPV mucosotrópicos) de variedad de sitios anatómicos (Mistry et al., 2008; Syrjänen, 1999a).

Los HPV que infectan mucosas genitales son los más estudiados y caracterizados, constituyendo cerca de 40 tipos (Munoz et al., 2003). Se han identificado numerosos tipos virales mucosotrópicos de alto riesgo oncogénico, asociados frecuentemente a carcinomas genitales (zur Hausen, 1996). Los más comunes y reconocidos por la IARC como carcinogénicos son los HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59 (Bzhalava et

al., 2013; Humans, 2012). Un grupo adicional ha sido clasificado como probablemente carcinogénico (Schiffman et al., 2009), mientras que los de bajo riesgo como los HPV-6 y HPV-11 inducen la formación de verrugas genitales benignas y están raramente asociados a malignidad (Bzhalava et al., 2013; Munoz et al., 2003).

### 1.2.1 Organización y caracterización del genoma viral

El genoma de los HPV se organiza en dos grandes regiones: 1) región temprana o E (del inglés *Early*), que incluye los genes que codifican para proteínas que intervienen en la replicación del virus y en la transformación celular (E1- E7), los cuales son expresados en los primeros estadios de la infección; y 2) región tardía o L (del inglés *Late*), que incluye los genes que codifican para las proteínas de la cápside, L1 y L2, los cuales son expresados en la etapa final de la infección. La proteína L1 es particularmente utilizada como antígeno en la formulación de vacunas contra HPV (Pils and Joura, 2015; Villa, 2011). El genoma de HPV presenta además una Región Larga de Control o LCR (del inglés *long control región*), de 0,3-1 kb sin función codificante, pero que posee señales de control de la transcripción y el origen de replicación viral (Figura 1.1 y Tabla 1.1) (Bernard, 2013; Syrjänen, 1999a). Esta estructura genómica es compartida entre distintos tipos de HPV, excepto en el caso del marco abierto de lectura de E5 que no está presente en algunos HPV de tipo cutaneotrópicos (Ghittoni et al., 2010). Aunque presentan un bajo número de genes, en congruencia con el pequeño tamaño del genoma de HPV, el número de proteínas codificadas es mucho mayor, dado que la expresión génica viral utiliza múltiples promotores y complejos patrones de *splicing* (Zheng and Baker, 2006).



**Figura 1.1: Mapa genómico de HPV.** El análisis comparado de las secuencias genómicas de diferentes tipos de HPV ha permitido describir una organización genética común. Se señalan en rosa los genes E, destacándose en rosa oscuro las regiones codificantes para E6 y E7. En amarillo se indican los genes L y en naranja la región LCR. AE y AL indican los sitios de poliadenilación temprano y tardío, respectivamente. Figura adaptada de Doorbar y col. 2015 (Doorbar et al., 2015).

Principales Marcos abiertos de lectura	Función proteica
E1	Replicación viral
E2	Replicación, segregación de los episomas virales y regulación de la transcripción.
E4	Ruptura del citoesqueleto. Relacionada con la maduración del virus
E5, E6, E7	Proteínas requeridas para la replicación viral <i>in vivo</i> . Proteínas transformantes para los HPV de alto riesgo.
L1	Proteína estructural, constituyente mayor de la cápside.
L2	Proteína estructural, constituyente menor de la cápside.

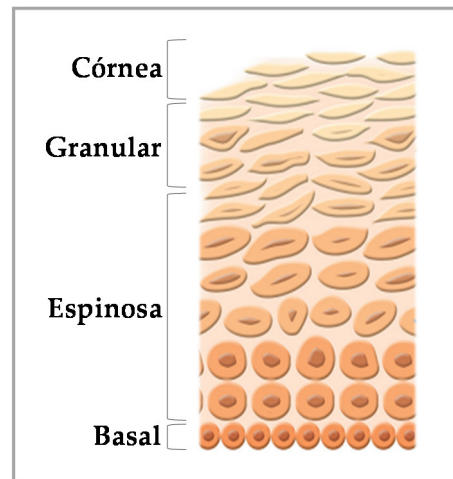
**Tabla 1.1:** Funciones de las proteínas codificadas por los principales marcos de lectura abiertos de HPV.

### 1.2.2 Epitelio escamoso, blanco de infección de HPV

Las infecciones por HPV tienen lugar en epitelios escamosos, los cuales se constituyen como estructuras estratificadas en las cuales cada estrato está definido según la posición, morfología y grado de diferenciación de los queratinocitos que lo conforman.

Dichos epitelios estratificados presentan una elevada capacidad de renovación, debido a que los queratinocitos de la capa inferior se dividen y ejecutan un programa de diferenciación terminal, a través del cual ascienden atravesando los diferentes estratos hasta llegar al más superficial. Mediante este proceso de continuo influjo de células migrando hacia las capas más externas, se consigue un estado de equilibrio dinámico, esencial para mantener la homeostasis del tejido (Fuchs, 2007).

Desde el más interno al más superficial los estratos epidérmicos se denominan: Basal, Espinosa, Granular y Córnea (Zaidi et al., 2015) (ver Figura 1.2). La Capa Basal o proliferativa, presenta queratinocitos cilíndricos y mitóticamente activos junto con células madre epidérmicas. Luego de la división de las células basales, una de las células hijas permanece en la capa basal, mientras que la otra migra hacia arriba y comienza el proceso de diferenciación (Hebner and Laimins, 2006). La Capa Espinosa es la más gruesa y resistente, ciertas zonas presentando gran cantidad de desmosomas. Además, las células contienen un amplio rango de organelas y queratinas específicas de diferenciación. A su vez, presentan una forma poligonal y se van aplanando en las zonas más superficiales de esta capa. Una característica importante es la presencia de gránulos que serán luego volcados a los espacios intercelulares en las capas superiores (Zaidi et al., 2015). La Capa Granular se caracteriza por los cambios necesarios para la formación posterior de una capa impermeable. Esta zona consiste de células romboides elongadas conteniendo gránulos basófilos en el citoplasma con proteínas precursoras importantes para la agregación posterior de los filamentos de queratina, contribuyendo en gran medida a la resistencia mecánica del estrato cornificado (Eckhart et al., 2013). Además, tiene lugar aquí el procesamiento de proteínas de alto peso molecular y es en esta región donde los gránulos lamelares del estrato espinoso se fusionan a la membrana plasmática y liberan su contenido y algunas enzimas al espacio intercelular, produciendo un sellado hidrofóbico entre el estrato granular y córneo. Por último, el paso a la Capa Córnea implica la pérdida del núcleo celular así como de todos los orgánulos celulares. Estas células son poliédricas y aplanadas, siendo el 80% de su contenido queratinas de alto peso molecular. Así, este estrato proporciona protección mecánica y actúa como barrera impermeabilizante (Zaidi et al., 2015).



**Figura 1.2. Diferentes estratos del epitelio escamoso.** Se esquematiza un corte transversal de epitelio escamoso magnificado donde se evidencian las distintas capas celulares detalladas en el texto. Figura adaptada de Lowy y col., 2006 (Lowy and Schiller, 2006).

### 1.2.3 Ciclo de replicación viral

Los HPV infectan particularmente las células basales, menos diferenciadas, de epitelios estratificados (Doorbar et al., 2012). Las infecciones por HPV se inician a través de microlesiones del epitelio que exponen las células basales y permiten el ingreso del virus a las mismas. De esta forma, infecciones iniciales requieren células mitóticamente activas, de manera de permitir el ingreso del genoma viral al núcleo (Doorbar et al., 2012). Especialmente para el caso de los HPV de bajo riesgo, los cuales no estimulan masivamente la proliferación de las células basales, es posible que el proceso se inicie tras la infección de células madre basales. Sin embargo, la naturaleza precisa de las células basales infectadas inicialmente y su incidencia en las patologías asociadas son aún materia de controversia (Doorbar et al., 2015). Así, el ciclo de replicación del HPV está estrechamente coordinado con el programa de diferenciación de las células epiteliales a la vez que depende de las proteínas celulares para la replicación (Galloway and Laimins, 2015).

Las distintas etapas del ciclo viral de HPV se esquematizan en la Figura 1.3. Una vez infectadas las células en la capa basal, mediante una combinación de factores celulares que interactúan con sitios ubicados en LCR se promueve la transcripción de los genes tempranos, los cuales permiten el establecimiento y el mantenimiento del genoma viral en el núcleo de las células como un episoma de bajo número de copias. Dichos episomas replican de manera coordinada con los cromosomas de la célula hospedadora,

siendo E1 y E2 esenciales para esta fase de amplificación inicial (Doorbar et al., 2012; Galloway and Laimins, 2015; Hebner and Laimins, 2006).

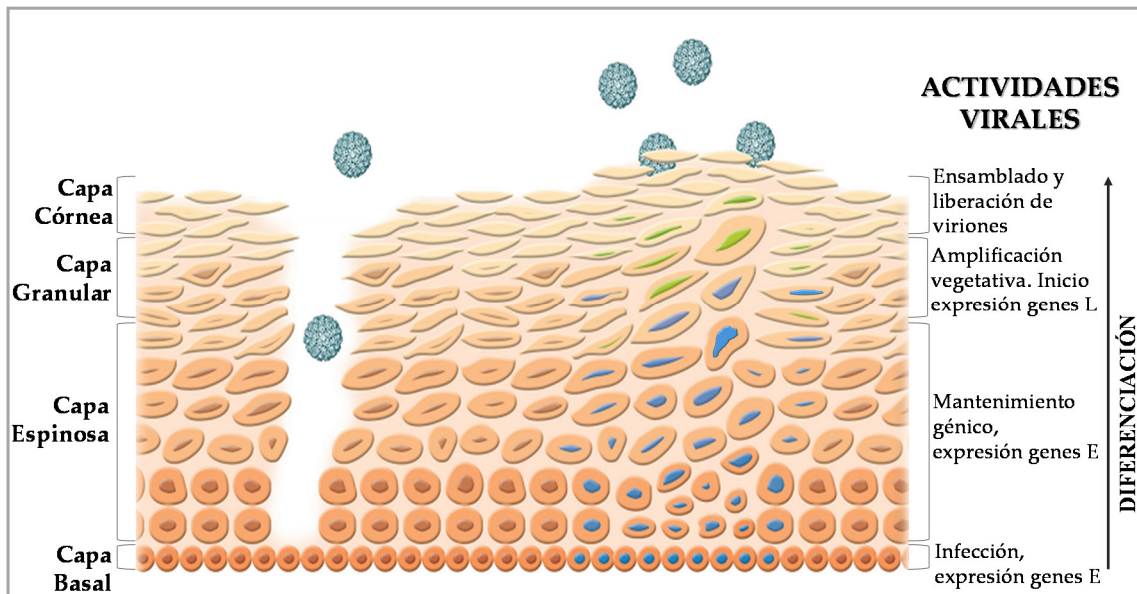
En infecciones virales productivas la expresión de las proteínas E1, E2, E5, E6 y E7 tiene lugar en queratinocitos indiferenciados o pobremente diferenciados en las capas basal y espinosa del epitelio estratificado. Por su parte, la replicación vegetativa que permite la amplificación génica del virus, la expresión de las proteínas de la cápside, y el ensamblaje de los viriones ocurren exclusivamente en las capas espinosa superior y granular más diferenciadas del epitelio (Doorbar, 2006; Meyers and Laimins, 1994; Wang et al., 2011).

Como se detallará a continuación, E6 y E7 son reguladores claves de la progresión del ciclo celular. En el caso de los HPV de alto riesgo, E6 y E7 dirigen la proliferación en las capas basales y espinosas inferiores del epitelio. Sin embargo, el rol de E6 y E7 de HPV de bajo riesgo en las células basales infectadas es más incierto. En estos tipos, sería fundamental el rol de la proliferación inicial inducida por procesos de reparación de tejido a partir del propio microambiente tisular (Doorbar et al., 2015).

Para replicarse, HPV depende de las polimerasas y otras proteínas celulares involucradas en la replicación del ADN que están presentes en la fase S (o de síntesis) del ciclo celular (Galloway and Laimins, 2015). A medida que las células se diferencian en el epitelio normal se produce un arresto de la proliferación; y cuando las células migran desde la capa basal diferenciándose se genera un arresto en el estadio G1/S del ciclo celular. Sin embargo, este proceso se encuentra alterado en los epitelios infectados por HPV, induciéndose el pasaje a fase S fuera de programa, que puede evidenciarse mediante marcadores asociados a dicha fase del ciclo celular (Freije et al., 2012; Kubben et al., 1994; Sherr and Roberts, 1999). Este evento permite la síntesis de los componentes necesarios para la replicación del ADN y por ende, la replicación del genoma viral. La inducción del pasaje a fase S se produce a través de la interferencia que las oncoproteínas virales E6 y E7 ejercen sobre la función de las proteínas regulatorias p53 y del retinoblastoma (Rb), respectivamente, las cuales participan activamente del control de la progresión del ciclo celular (Doorbar et al., 2012; Nead, 1998).

En las capas superiores tiene lugar la activación de la expresión de los genes L de HPV, sintetizándose las proteínas estructurales. Esta activación se produce por la

interacción de factores celulares presentes en la célula diferenciada con sitios de reconocimiento específico localizados en LCR. Por último, tendrá lugar el ensamblado y liberación de las partículas virales (Galloway and Laimins, 2015) (Figura 1.3).



**Figura 1.3. Ciclo de replicación de HPV en relación al programa de diferenciación de los queratinocitos.** Se esquematizan un corte transversal de epitelio escamoso magnificado donde se evidencian los distintos estratos celulares y el ciclo de replicación de HPV, señalando las células expresando proteínas virales E con azul y L con verde. Figura adaptada de Lowy y col., 2006 (Lowy and Schiller, 2006).

Un aspecto importante que contribuye a la desregulación de la expresión génica es la integración del ADN viral al genoma celular. En este proceso, observado frecuentemente para los HPV de alto riesgo, se interrumpe el marco de lectura abierto E2 del genoma viral. Esto conlleva a una expresión desregulada de E6 y E7, dado que E2 se comporta como un regulador de la expresión de dichos genes (Doorbar et al., 2015). Ha sido demostrado que la sobre-expresión persistente de estos genes se vincula a una acumulación de errores en el ADN que pueden, eventualmente, llevar al desarrollo tumoral (Pett et al., 2004; Vinokurova et al., 2008).

En este sentido, es necesario enfatizar que los procesos de transformación e inmortalización celular asociados a HPV son acompañados por anomalías en el programa de diferenciación. Por lo tanto, teniendo en cuenta la dependencia entre ciclo de multiplicación viral y diferenciación de las células epiteliales, la progresión maligna de las lesiones resulta en la pérdida de la replicación del virus, subsistiendo únicamente

la expresión desregulada de los oncogenes correspondientes (Doorbar et al., 2012). Así, como se comentó para este y otros oncovirus, la oncogénesis es un efecto secundario que resulta en detrimento tanto para el virus como para el hospedador (Hibner and Gregoire, 2015; Laimins, 1998).

Los HPV presentan un ciclo de replicación profundamente dependiente del grado de diferenciación de las células que infectan dentro del epitelio escamoso (Hebner and Laimins, 2006). Por ello, para estudiar completamente mecanismos moleculares asociados a HPV se requiere de estrategias que permitan mimetizar cercanamente el contexto natural de dichas infecciones. En este sentido, resulta importante destacar los cultivos epiteliales organotípicos *raft*, los cuales representan un abordaje novedoso para el estudio del HPV dado que reproducen fielmente el proceso de diferenciación epitelial *in vitro* (Ozbun and Patterson, 2014).

Dichos cultivos pueden ser desarrollados a partir de queratinocitos primarios normales, explantes de tejido epitelial o líneas celulares estables, permitiendo que las células proliferen y se diferencien completamente en la interfase aire-líquido sobre un soporte que equivale a la dermis (ver Figura 4.1.2, sección Resultados - Capítulo 1). Los queratinocitos humanos primarios normales se ordenan en forma estratificada y se diferencian totalmente en una forma similar a los tejidos epiteliales escamosos, mientras que las líneas celulares transformadas generan epitelios que presentan morfologías displásicas similares a las lesiones que se observan *in vivo* (Andrei et al., 2010). Esta y otras metodologías han permitido conocer más detalladamente las características del ciclo viral de los HPV y sus efectos en los tejidos infectados.

#### **1.2.4 Patologías asociadas a infecciones por HPV mucosotrópicos**

Las infecciones por HPV son las infecciones virales de transmisión sexual más comunes a nivel mundial (Lowy and Schiller, 2006), siendo la infección persistente por HPV mucosotrópicos de alto riesgo oncogénico el evento clave en el desarrollo de los carcinomas de cuello de útero y de las lesiones neoplásicas precursoras (Doorbar et al., 2015; Snijders et al., 2003; zur Hausen, 1999). El cáncer cervical representa, entre las patologías asociadas a HPV, aquella que ha sido más y mejor caracterizada; siendo dicho cáncer una de las neoplasias mundialmente más frecuente en mujeres.

En este sentido, se estima que anualmente se diagnostican aproximadamente 530.000 nuevos episodios de cáncer cervical en el mundo, de los cuales más del 85% ocurren en países en desarrollo, con una mortalidad cercana al 50% (Parkin et al., 2008). De acuerdo con las estadísticas del Ministerio de Salud de nuestro país ([www.msal.gov.ar](http://www.msal.gov.ar)), cada año se diagnostican aproximadamente 5.000 casos de carcinoma cervical, y mueren aproximadamente 1.800 mujeres a causa de la enfermedad, siendo esta una enfermedad de mayor prevalencia en mujeres de sectores socialmente vulnerables (Ferlay et al., 2015).

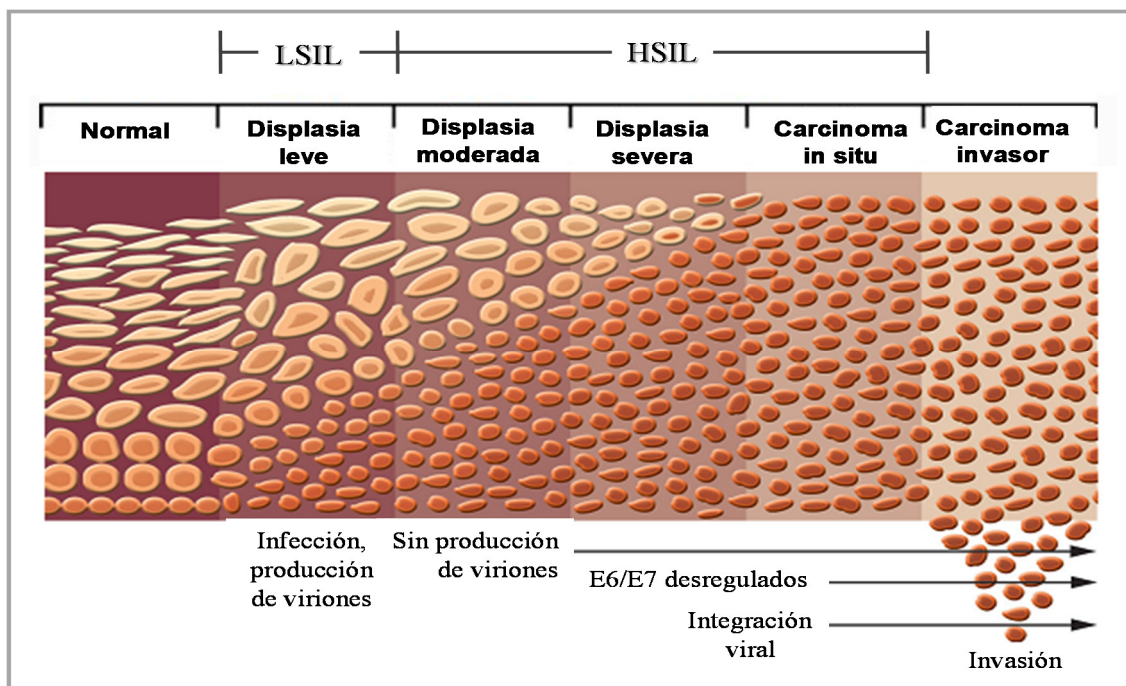
El desarrollo del cáncer cervical invasivo es un proceso gradual, cuya primera manifestación consiste en la aparición de lesiones intraepiteliales en la mucosa de cuello uterino (Derchain et al., 1999; Doorbar et al., 2012; Syrjanen and Syrjanen, 1999). Las distintas etapas clínicas del proceso oncogénico cervical son: infección por HPV, persistencia del virus por un cierto período de tiempo, progresión a lesiones precancerosas e invasión. De esta forma, el cáncer cervical invasivo está precedido por un espectro progresivo de anormalidades del epitelio cervical estratificado. Sin embargo, este proceso es reversible y muchas infecciones cursan en sentido contrario, lo que conduce a la eliminación de manera espontánea de la infección por HPV e incluso a la regresión de las lesiones (Schiffman and Kjaer, 2003).

La severidad de las Lesiones Escamosas Intraepiteliales (SIL, por su sigla en inglés *Squamous Intraepithelial Lesion*) precursoras del cáncer cervical se clasifica en grados, de acuerdo a la extensión del epitelio normal diferenciado que es reemplazado por células no diferenciadas, de tipo basal. Dicha clasificación distingue entre lesiones de bajo grado (LSIL, del inglés *low-grade SIL*) y de alto grado (HSIL, del inglés *high-grade SIL*) (Doorbar et al., 2012; Shah, 1996; Syrjänen, 1999b). En el carcinoma cervical de tipo invasivo, las células anormales traspasan la membrana basal e invaden el tejido circundante, pudiendo eventualmente provocar metástasis (Figura 1.4) (zur Hausen, 1996).

Las neoplasias de alto grado representan una infección abortiva, en la cual se desregula la expresión génica viral y el virus no puede completar el ciclo normal. Así, a partir de displasias moderadas ya no hay producción de viriones. El cáncer se desarrolla en aquellos individuos en los cuales falla la resolución de la infección y retienen la

expresión oncogénica, generalmente, por años. En la mayoría de los individuos, sin embargo, prevalece una regresión que lleva a la eliminación viral, o a su mantenimiento pero en una forma latente o asintomática en las células basales (Doorbar, 2006).

Para el desarrollo de la patología es necesaria la persistencia de la infección pero también se ha demostrado que, además, son necesarios ciertos cofactores. Datos epidemiológicos señalan la participación de factores endógenos: hormonales e inmunológicos; y exógenos: comportamiento sexual, tabaquismo, uso de anticonceptivos orales, nutrición, infecciones, mutágenos, entre otros (Derchain et al., 1999; Kim et al., 2012; Yetimalar et al., 2012). Asimismo, también es importante para el potencial desarrollo oncogénico el tipo de tejido que se infecte. La mayoría de las neoplasias de cuello de útero se desarrollan con preferencia a nivel de la unión entre las células columnares del endocérvix y el epitelio escamoso estratificado del ectocérvix, denominada zona de transformación (Lee et al., 2008; Syrjänen, 1999b).



**Figura 1.4: Lesiones cervicales asociadas a infecciones por HPV de alto riesgo.** Representación esquemática de los precursores del cáncer cervical: LSIL y HSIL, y del carcinoma invasivo. En LSIL y HSIL las células normales son reemplazadas por células no diferenciadas del tipo basal. En el carcinoma invasivo las células anormales traspasan la membrana basal invadiendo EL tejido circundante. Figura adaptada de Lowy y col., 2006 (Lowy and Schiller, 2006).

En los últimos años se han desarrollado e implementado dos vacunas a partir de partículas similares al virus (VLP, del inglés *Virus-Like Particles*). Una de ellas protege para 2 tipos virales de alto riesgo (HPV-16 y 18) y 2 de bajo riesgo (HPV-6 y 11) (vacuna GARDASIL de MERCK); mientras que la otra protege contra la infección por HPV-16 y 18, los tipos virales que con mayor frecuencia se asocian a cáncer cervical (vacuna CERVARIX de GLAXO). Debido a que las vacunas disponibles son profilácticas, el mayor impacto se lograría focalizando los esfuerzos de inmunización en mujeres sin contacto previo con el HPV ([www.msal.gov.ar](http://www.msal.gov.ar)). Así, desde el año 2011 se ha incluido en el calendario nacional la vacuna bivalente y desde el 2014 la tetravalente, para niñas de 11 años. Recientemente, también ha sido licenciada una vacuna nanovalente formulada contra los cuatro tipos de HPV incluidos en la formulación tetravalente junto a otros cinco tipos virales de alto riesgo, los HPV-31, 33, 45, 52 y 58 (GARDASIL® 9 de MERCK). Dicha vacuna ha sido recientemente recomendada en EE.UU. por el Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización (ACIP, del inglés *Advisory Committee on Immunization Practices*) (ACIP, 2015).

Estas vacunas no tienen acción terapéutica y por ello, las personas ya infectadas no se ven beneficiadas con la inmunización. Además, no puede prevenirse la infección por tipos virales no presentes en las formulaciones actuales. Por lo tanto, los programas de control continúan siendo importantes para reducir la incidencia y mortalidad del cáncer de cuello de útero, al permitir la detección temprana de probables infecciones y lesiones asociadas a HPV ([www.msal.gov.ar](http://www.msal.gov.ar)).

Asimismo, el HPV está implicado en el desarrollo de otros tumores anogenitales en zonas de transformación a nivel vaginal, de vulva, de pene y de ano (De Vuyst et al., 2009; Doorbar et al., 2015). Más aún, las infecciones por HPV también se han vinculado al desarrollo patológico en otros sitios anatómicos, y en forma particular se reconocen como factores de riesgo importantes para el desarrollo de tumores de cabeza y cuello (Doorbar et al., 2015). En este sentido, se ha señalado la prevalencia e incidencia de infecciones por HPV-16 y otros tipos como 18, 31, 33 y 35 (Mehanna et al., 2013).

Por último, también es importante destacar el desarrollo de lesiones benignas como el condiloma acuminado, una de las manifestaciones de HPV más comunes en el área genital, y generalmente causado por HPV de bajo riesgo como el 6 y 11. A su vez,

los HPV que causan verrugas genitales pueden generar papilomas en la cavidad oral, con la problemática intrínseca en su tratamiento debido a su localización anatómica (Doorbar et al., 2015).

### **1.2.5 Proteínas E7 y E6 de HPV**

Los HPV de alto y bajo riesgo oncogénico infectan y replican en los mismos tejidos, presumiblemente en iguales contextos celulares y, por lo tanto, sobrepasando las mismas barreras para la infección viral. Así, es sorprendente que ambos tipos muestran diferencias considerables en su relación con blancos celulares, probablemente reflejadas en sus respectivas patologías asociadas (zur Hausen, 2002).

Por su parte, el mecanismo de acción de los HPV de alto riesgo oncogénico en el desarrollo tumoral se explica principalmente por la acción de sus oncoproteínas E6 y E7 (Pim and Banks, 2010). Dichas proteínas actúan cooperativa y complementariamente durante el desarrollo carcinogénico, lo que ha sido demostrado mediante cultivo celular (Doorbar et al., 2012; Hawley-Nelson et al., 1989), modelos de ratones transgénicos (Arbeit et al., 1996; Chung and Lambert, 2009; Pim and Banks, 2010) y cultivos organotípicos (Meyers et al., 1997).

Así, E6 y E7 de HPV de alto riesgo tienen la capacidad de inmortalizar y transformar las células infectadas, confiriéndoles a dichas células un alto grado de inestabilidad cromosómica. La expresión continua de estos genes, es requisito indispensable para mantener el crecimiento neoplásico (Alvarez-Salas and DiPaolo, 2007). Contrariamente, las proteínas E6 y E7 de HPV de bajo riesgo no tienen capacidad transformante ni de inmortalización (Pim and Banks, 2010). Estudios del mecanismo molecular del proceso de transformación de los HPV de alto riesgo han revelado un complejo patrón de interacciones de sus oncoproteínas con reguladores celulares, involucrados en distintos procesos biológicos como la apoptosis, la proliferación y diferenciación celular (von Knebel Doeberitz, 2002; Vousden, 1994).

#### **1.2.5.1 Funciones de la proteína E7**

La proteína E7, de aproximadamente 100 aminoácidos, no posee actividad enzimática ni es capaz de unirse al ADN. Sin embargo, lleva a cabo sus funciones de

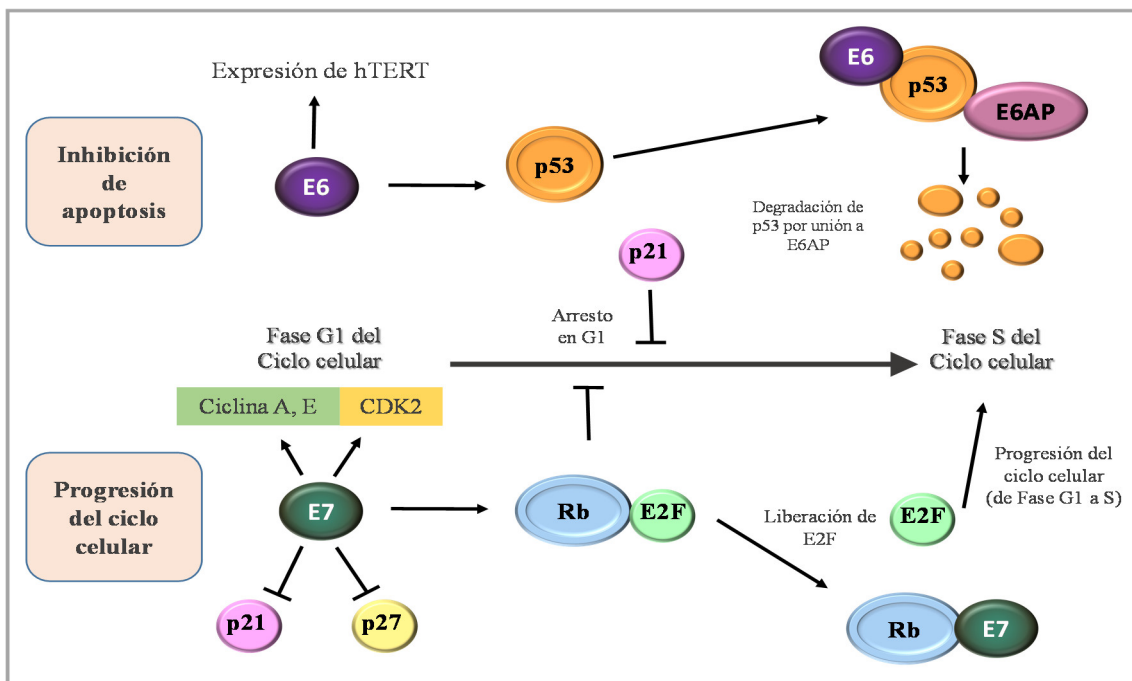
estimulación del pasaje a fase S del ciclo celular, evento necesario para la infección viral productiva, interaccionando con varios factores celulares fundamentales para el control de dicho ciclo (Laimins, 1998).

El ciclo celular es regulado por complejos de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDK del inglés *Cyclin-dependent kinase*) cuya actividad es secuencial y coordinada. Para permitir la progresión del ciclo celular, las células deben superar el punto de restricción en G1, el cual es controlado por Rb, p107 y p130, pertenecientes a la familia de proteínas *pocket* (Ghittoni et al., 2010). Rb normalmente interacciona e inactiva a los factores de transcripción E2F, los cuales regulan tanto la apoptosis como la progresión del ciclo celular por inducción de genes de fase S (Poznic, 2009). En respuesta a mitógenos, los complejos ciclina D1-CDK4 y ciclina D1-CDK6 se activan y producen a su vez la fosforilación de Rb permitiendo la liberación de E2F y su activación, facilitándose así la entrada en fase S. Por su parte, p107 controla la entrada al ciclo celular en la capa basal; mientras que p130 está involucrada en la progresión de dicho ciclo en las capas epiteliales superiores (Doorbar et al., 2015).

La interacción de E7 de HPV de alto riesgo con los supresores de tumores Rb, p107 y p130, y la posterior inducción de la degradación de los mismos, han sido ampliamente caracterizadas. En consecuencia a la interacción con dichos factores celulares, E7 estimula la progresión del ciclo celular en células diferenciadas, permitiendo la replicación vegetativa del ADN de HPV necesaria para completar el ciclo viral (Munger et al., 2001). Tanto E7 de HPV de alto como de bajo riesgo son capaces de interaccionar con Rb, pero los primeros lo hacen más eficientemente y pueden inducir su degradación por la vía proteolítica dependiente de ubiquitina. E7 de alto riesgo es también capaz de unir y estimular la degradación de p107 y p130. De manera interesante, la proteína E7 de HPV de bajo riesgo es asimismo capaz de unir y promover la degradación de p130, aunque no de p107 (Zhang et al., 2006). Así, E7 de alto riesgo es capaz de desacoplar la diferenciación de los queratinocitos de la progresión del ciclo celular. Al mismo tiempo, sus interacciones con proteínas *pocket* inducen otras múltiples respuestas celulares, incluyendo la supresión de procesos de reparación de ADN y de mantenimiento de la integridad genómica junto con la estabilización de p53 (Pim and Banks, 2010). Se ha propuesto que esta síntesis de ADN fuera de programa activa

mecanismos celulares apoptóticos denominados “respuesta centinela trófica” (Evan and Vousden, 2001). Sin embargo, como se verá en más detalle posteriormente, la proteína E6 HPV de alto riesgo degrada a p53 y, por lo tanto, contrarresta tanto esta respuesta celular como la estabilización de p53 por E7 (Pim and Banks, 2010) (ver Figura 1.5). La estrategia de replicación de HPV, en donde se inhiben conjuntamente Rb y p53, es compartida con otros virus oncogénicos con genoma a ADN, aunque con mecanismos diferentes (Nead and McCance, 1998). Por su parte, E7 de HPV de bajo riesgo, más allá de su interacción con proteínas *pocket*, no parece activar la respuesta centinela celular.

E7 de alto riesgo es también capaz de interactuar con otras proteínas claves que controlan la progresión del ciclo celular, como p21 y p27, inhibidores de las CDK (Funk et al., 1997). Dichos reguladores son sumamente importantes para el arresto del crecimiento durante la diferenciación, y la inhibición de su función mediada por E7 resulta en la progresión del dicho ciclo. Las proteínas E7 derivadas de HPV de bajo riesgo son capaces de interactuar con p21, pero con baja eficiencia, por lo que no estimulan eficientemente la progresión del ciclo celular.



**Figura 1.5: Efecto de E6 y E7 de alto riesgo en la desregulación del ciclo celular.** E7 y E6 de HPV de alto riesgo actúan sobre las proteínas celulares Rb y p53, respectivamente, induciendo la inducción de la inmortalización celular y por lo tanto favoreciendo procesos de transformación y oncogénesis. Se muestran también otros efectos de las oncoproteínas virales. Adaptado de Senba y col (Senba and Mori, 2012).

Además, la expresión de E7 de alto riesgo se asocia a una vasta reprogramación epigenética de la célula infectada que es importante para la estimulación de la entrada y progresión del ciclo celular. En este sentido, E7 tiene la habilidad de unirse e inhibir la función de histonas desacetilasas (HDAC) (Nguyen et al., 2002) y de modular la maquinaria de metilación de ADN, controlando vías de proliferación (Burgers et al., 2007). También se ha señalado que E7 lleva a la activación de ciertas histonas metiltransferasas y de-metilasas (Doorbar et al., 2015; McLaughlin-Drubin et al., 2011), estando estas últimas aparentemente involucradas en la regulación de genes de la familia HOX, y asociándose a una regulación negativa de la diferenciación epidermal (La Celle and Polakowska, 2001). Notablemente, los efectos sobre histonas metiltransferasas parecen estar conservados entre HPV de alto y bajo riesgo, proveyendo un punto de unión entre la expresión génica viral y la modulación de eventos celulares durante el ciclo viral.

E7 de alto riesgo también se une a otros reguladores de la proliferación celular tales como factores transcripcionales de la familia AP1 (Antinore et al., 1996) y contribuye con vías de supervivencia celular (Doorbar et al., 2015). También se ha comprobado que favorece la inestabilidad genética observada en carcinomas, ya que induce la síntesis de múltiples centrosomas en la fase S, a través de la formación de centriolos inmaduros (Duensing and Munger, 2003). Debido a todas las funciones descritas acerca de la desregulación del ciclo celular, se considera que E7 es la principal proteína oncogénica de HPV. En la Figura 1.5 se detallan las acciones de E6 y E7 sobre algunos de los componentes que regulan el ciclo celular. En la Tabla 1.2 se resumen los efectos principales de E7 de HPV mucosotrópicos de alto y bajo riesgo sobre sus blancos.

	Alto riesgo oncogénico	Bajo riesgo oncogénico
E7	Unión y degradación de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rb</li> <li>• p107</li> <li>• p130</li> </ul> Unión (no degradación): <ul style="list-style-type: none"> <li>• E2F</li> <li>• Culina2 (ligasa de ubiquitina)</li> <li>• HDAC</li> </ul>	Unión débil (sin degradación) de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rb</li> <li>• p107</li> <li>• E2F</li> </ul> Unión y degradación de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• p130</li> </ul>
	Inducción de la entrada al ciclo celular y la síntesis de ADN	
	Rol en la amplificación génica	
	Inducción de inestabilidad génica	No
Funciones de inmortalización y transformación	No	
Activación de vías de supervivencia	Desconocida	

**Tabla 1.2:** Diferencias funcionales de las proteínas E7 de HPV de alto y bajo riesgo oncogénico. Adaptada de Doorbar y col. 2015 (Doorbar et al., 2015).

### 1.2.5.2 Funciones de la proteína E6

La proteína E6 presenta aproximadamente 150 aminoácidos, siendo su función más estudiada la inactivación de p53. Dicha inhibición de las funciones de p53 es llevada a cabo tanto por E6 de HPV de alto como de bajo riesgo oncogénico, lo que sugiere un importante rol en esta inactivación para el ciclo viral. Como se mencionó en la sección anterior, la expresión de E7 de alto riesgo lleva a las células a un aumento en la susceptibilidad a apoptosis. E6 de alto riesgo interfiere con la función de p53 a través de diversos mecanismos, contrarrestando este efecto (ver Figura 1.5). E6 recluta a la ubiquitina ligasa E6AP y a p53, formándose de esta manera un complejo tripartito que estimula la degradación de esta última a través del mecanismo proteolítico dependiente de ubiquitina (Huibregtse et al., 1991). Así, mediante la interferencia de E6 con p53 se establecería un ambiente celular propenso a la acumulación de mutaciones e inestabilidad genética que conllevaría a la transformación celular. Es importante mencionar que en el caso de los HPV de bajo riesgo, si bien la unión de E6 con E6AP ocurre, no resulta en la degradación de p53 (Doorbar et al., 2015). En cambio, interfieren en la interacción de p53 con ciertos promotores (Pim and Banks, 2010).

Además, E6 puede unirse directamente al sitio de unión al ADN de p53, bloqueando su actividad como factor de transcripción (Lechner and Laimins, 1994); o

interaccionar con la histona acetiltransferasa ADA3, afectando la actividad de p53 (Shamanin et al., 2008). A su vez, E6 de alto y bajo riesgo pueden interaccionar e interferir con la función de las acetiltransferasas p300 y CBP, consecuentemente impidiendo la estabilización de p53. Dicha interacción resulta en la inhibición de dichas enzimas, con la consecuente desestabilización del supresor de tumores. Esta y otras observaciones sugieren un grado importante de conservación entre los efectos sobre p53 de E6 de alto y bajo riesgo, que sería importante para el ciclo viral (Thomas and Chiang, 2005).

Otros factores celulares distintos a p53 también contribuirían al desarrollo oncogénico. Así, independientemente de los efectos sobre dicho oncosupresor, E6 también puede interaccionar con diversos factores celulares, inhibiendo la función apoptótica (Kinoshita et al., 1997; Pim and Banks, 2010). Al mismo tiempo, E6 de bajo y alto riesgo pueden interferir en la inducción de las vías de apoptosis mitocondriales intrínseca y extrínseca, a través de la interacción con miembros proapoptóticos de la familia Bak (Thomas and Banks, 1999). También se ha reportado la interferencia de E6, especialmente de alto riesgo, con el sistema inmune mediante la inhibición de la apoptosis inducida por interferón (Doorbar et al., 2015; Ronco et al., 1998). Por último, E6 de alto riesgo oncogénico tiene la habilidad de activar la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa hTERT (Liu et al., 2009; Oh et al., 2001), la cual es fundamental para la inmortalización celular, ya que previene el acortamiento de los telómeros permitiendo, de esta manera, la proliferación celular continua.

Por otro lado, las proteínas E6 de los HPV de alto riesgo presentan en su región carboxilo terminal una secuencia consenso de unión a dominios proteicos PDZ (PSD95, DLG1, ZO-1) (Gardiol et al., 1999; Lue et al., 1994). Dicho sitio de unión a PDZ se encuentra altamente conservado entre los HPV oncogénicos pero se encuentra ausente en las proteínas E6 de los HPV de bajo riesgo. Los dominios PDZ son motivos estructuralmente conservados de 80-90 aminoácidos presentes en proteínas de polaridad celular y de transducción de señales (Nourry et al., 2003). Funcionan como módulos específicos de reconocimiento proteína-proteína y permiten el reclutamiento de péptidos y la formación de complejos multiproteicos en sitios especializados de la membrana (Fanning and Anderson, 1999; Lee and Zheng, 2010).

Por lo tanto, otros blancos reportados de E6 son proteínas PDZ, la mayoría de las cuales pertenecen a la familia de guanilato quinasas asociadas a membrana (MAGUK, del inglés *membrane-associated guanylate kinase*) importantes para el control de la polaridad celular y la formación de las uniones celulares tipo adherentes (UA) y oclusivas o *tight* (UT). El primer blanco identificado de este tipo fue DLG1 (del inglés *Disc large 1*), proteína que participa del control de la proliferación y polaridad celular. E6 interacciona directamente con DLG1 resultando en la estimulación de su degradación por el mecanismo dependiente de ubiquitina (Gardioli et al., 2002; Gardioli et al., 1999).

Posteriormente, han sido reportados otros blancos de E6 con motivos PDZ. Entre ellos se encuentra la proteína Scribble, que también regula la polaridad celular (Nakagawa and Huibregtse, 2000); las proteínas MUPP1 (del inglés *multi-PDZ domain protein*), regulador negativo de la proliferación celular (Lee et al., 2000); junto con otros componentes de complejos de polaridad celular como PATJ (del inglés *PALS1-associated TJ protein*) (Storrs and Silverstein, 2007) y las proteínas MAGI-1/2/3 (del inglés *membrane-associated guanylate kinase WW and PDZ domain containing protein*) (Thomas et al., 2001b).

A su vez, también se han reportado funciones de E6 de HPV de alto riesgo en la deslocalización de otras proteínas PDZ de polaridad. Así, en nuestro grupo de trabajo reportamos recientemente que E6 de HPV-18 interfiere en la localización de la proteína PAR3 (del inglés *Partitioning defective 3 homolog*), proteína clave en la formación de las UT y en la regulación de señales que regulan la proliferación celular (Facciuto et al., 2014; Wu et al., 2007). La presencia de E6 induce una redistribución de PAR3 desde los bordes celulares hacia el citoplasma y núcleo. No ha sido establecido si dicho efecto es de tipo directo, pero sí que depende del dominio de unión a sitios PDZ de E6, a la vez que no se encontraron cambios en los niveles de PAR3. En el mismo sentido, otros investigadores reportaron que E6 altera la localización de otra proteína de polaridad, la proteína ZO2 (del inglés *Zona Occludens 2*), perteneciente a las UT, sin generar cambios en sus niveles (Hernandez-Monge et al., 2013). En la Tabla 1.3 se resumen los efectos principales de E6 de HPV sobre sus blancos celulares.

	Alto riesgo oncogénico	Bajo riesgo oncogénico
E6	<ul style="list-style-type: none"> <li>Unión y degradación de: p53, proteínas PDZ específicas (DLG1, MAGI-1, Scribble)</li> <li>Interferencia en la localización de: PAR3, ZO2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Unión débil (sin degradación) de: p53</li> <li>No une proteínas PDZ</li> </ul>
	Interacción con E6AP (ligasa de ubiquitina) Inhibición de la trans-activación y acetilación de p53	
	Inhibición de apoptosis	Desconocida
	Evasión del arresto del ciclo celular por daño en el ADN	Arresto del ciclo celular normal por daño en el ADN
	Inhibición de la diferenciación de queratinocitos	Desconocida
	Inhibición de la Respuesta interferón	Débil
	Activación de vías de proliferación y supervivencia	Desconocida
	Activación de Telomerasa	No
Por <i>splicing</i> de preARNm: E6*	No	

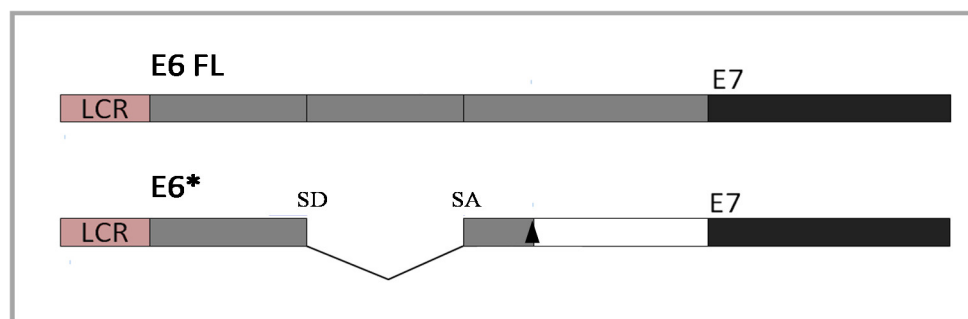
**Tabla 1.3:** Diferencias funcionales de las proteínas E6 de HPV de alto y bajo riesgo oncogénico. Adaptada de Doorbar y col. 2015 (Doorbar et al., 2015).

En conjunto, las interacciones reportadas sugieren que los componentes reguladores de la polaridad celular y la formación de las uniones intercelulares son blancos importantes para el ciclo de replicación viral y, en particular, para la oncogénesis asociada a la HPV. Por lo tanto si bien E6 de alto y de bajo riesgo comparten algunos blancos celulares, aunque con distintas consecuencias, otros componentes celulares son blancos específicos de las E6 de HPV oncogénicos. En conjunto, esto podría explicar el potencial oncogénico diferencial entre ambos tipos virales.

#### ***Isoforma menor de E6: E6\****

En el caso particular de ciertos HPV de alto riesgo oncogénico, su actividad transformante está codificada en un preARNm policistrónico. A partir de eventos de *splicing* alternativo involucrando dicho preARNm, se ha demostrado la traducción de distintas proteínas virales funcionales. Además de las previamente descritas, E6 y E7, tiene lugar la traducción de ciertas isoformas de la oncoproteína E6, conocidas como E6 estrella (E6\*) (Ajiro and Zheng, 2014). Las proteínas E6\* se corresponden con variantes transcripcionales de menor tamaño, dando origen a versiones proteicas de E6 truncadas

en su extremo carboxilo-terminal. Mientras que algunos tipos de HPV, como HPV-16, expresan hasta 4 especies distintas de E6\* correspondientes a distintos sitios aceptores durante el proceso de *splicing*, HPV-18 parece transcribir sólo una especie de ARNm capaz de expresar E6\*. Así, el transcripto correspondiente comparte las regiones codificantes para los primeros 44 aminoácidos de la proteínas E6 completa (E6FL, del inglés *E6 full lenght*), produciéndose luego la exclusión de un exón que conlleva al corrimiento del marco de lectura y formación de un codón de terminación prematuro. Por lo tanto, la isoforma E6\*, de unos 57 aminoácidos, consiste en una isoforma truncada de la proteína E6FL (Pim et al., 2009) (Figura 1.6)



**Figura 1.6: Diagrama de los transcritos productos del *splicing* alternativo del preARNm codificante para E7, E6FL y E6\*.** Se esquematiza la exclusión del exón que da lugar al transcripto codificante para la isoforma E6\*, con el codón de terminación prematura indicado con un triángulo. Además se indican los sitios donador y aceptor del *splicing* (SD y SA, respectivamente).

En relación a la potencial funcionalidad de este evento, se ha evidenciado que la prevalencia de la isoforma E6\* aumentaría con la severidad de las lesiones, aunque con ciertas controversias. Además, la forma transcripcional de E6\* se reconoce como la más abundante presente en las células derivadas de cáncer cervical o líneas celulares derivadas (Hafner et al., 2008; Rosenberger et al., 2010).

Entre las funciones de E6\* reportadas, la misma es capaz de regular ciertos aspectos de las actividades de E6FL (Pim et al., 2009; Rosenberger et al., 2010). E6\* de HPV-18 cumpliría con roles anti-proliferativos, interaccionando con E6FL y favoreciendo la inhibición de la degradación de p53 mediada por esta última (Mantovani and Banks, 1999; Pim and Banks, 1999). Además, probablemente también mediaría otras vías pro-apoptóticas (Filippova et al., 2007; Tungteakkhun et al., 2010). Sin bien se ha propuesto que E6\* tendría efectos sobre distintos blancos celulares de HPV, y que en

muchos casos cumpliría un rol antagónico respecto a E6FL, los mecanismos implicados en dichas observaciones son desconocidos y, hasta el momento, no se han descrito blancos celulares directos de E6\* cuya interacción haya sido validada (Vande Pol and Klingelhutz, 2013).

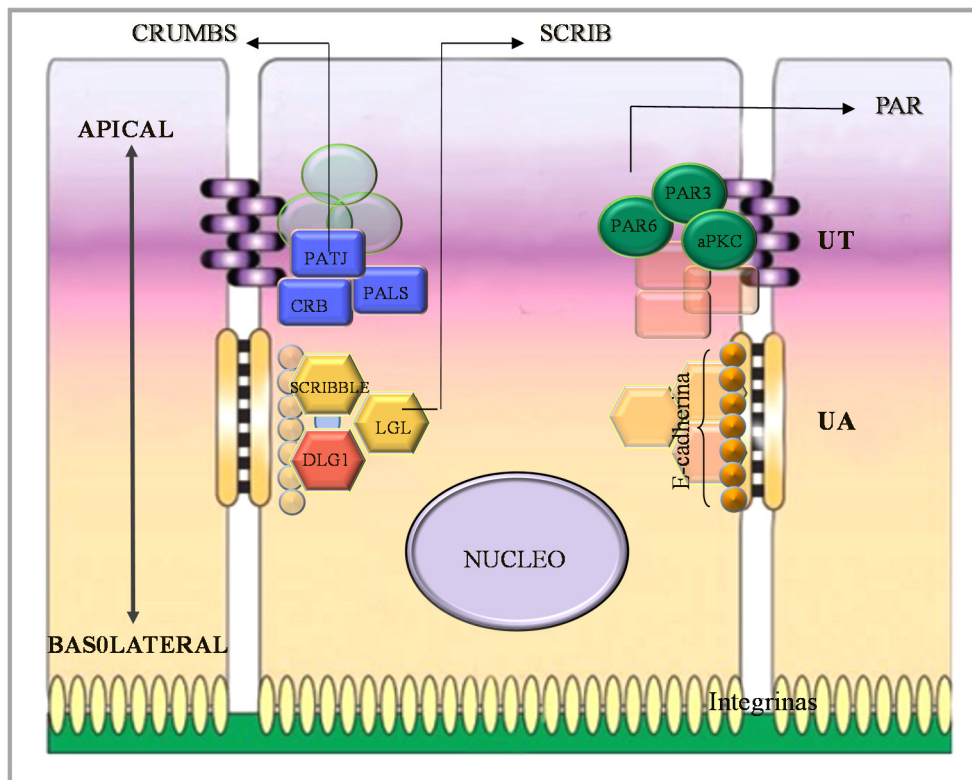
Por lo tanto, si bien la existencia de E6\* ha sido reportada hace años (Schneider-Gadicke and Schwarz, 1986) y se han incrementado los esfuerzos para conocer los efectos moleculares de su expresión, mucho resta por saber sobre la regulación que podría ejercer esta isoforma sobre los blancos celulares de HPV. Estudiar dichos mecanismos en mayor detalle permitirá conocer con más precisión las consecuencias de la expresión de E6\* durante la diferenciación del epitelio infectado y, particularmente, su relevancia en los procesos oncogénicos asociados a HPV.

### 1.3 Polaridad Celular

Los epitelios son tejidos estrictamente polarizados. Las células epiteliales mantienen la polaridad mediante la correcta organización de complejos multiproteicos de membrana que conforman las uniones intercelulares, dando lugar al establecimiento de la polaridad ápico-basal (Mlodzik, 2002; Zallen, 2007). Esta última se evidencia por la presencia, dentro de una misma célula, de una superficie apical, en contacto con el lumen exterior (o con las células de la capa epitelial más superficial en caso de tratarse de un tejido estratificado), y una superficie basolateral, en contacto con las células adyacentes y con el tejido conectivo (Dow and Humbert, 2007).

Dicha polaridad ápico-basal consiste en una distribución asimétrica de lípidos y proteínas, reflejando funciones específicas bien diferenciadas, y resulta de la presencia de complejos proteicos que conforman las UT y las UA (ver Figura 1.7). Las UT forman un cinturón estrecho entre las células vecinas que funciona como una barrera esencial para el epitelio, mientras que las UA permiten mantener la adhesividad entre las células en contacto. En dichas UA están involucradas también las proteínas de la familia caderina que interaccionan con la actina del citoesqueleto (Perez-Moreno and Fuchs, 2006). En la Figura 1.7 se esquematizan los tres complejos proteicos que participan en la formación de las uniones intercelulares en células de mamíferos: el complejo "CRUMBS" formado por la proteína CRUMBS, PALS1 y PATJ, requerido para la conformación de la membrana apical; el complejo "PAR" que promueve el establecimiento del dominio

apical y lateral, formado por PAR 3, PAR 6 y aPKC (del inglés *atypical protein kinase C*) y el complejo “SCRIBBLE” (SCRIB) compuesto por LGL (del inglés *lethal giant larvae homologue*), DLG1 y Scribble, el cual define el dominio de membrana basolateral (Assemat et al., 2008; Goldstein and Macara, 2007; Humbert et al., 2008; McCaffrey and Macara, 2009).



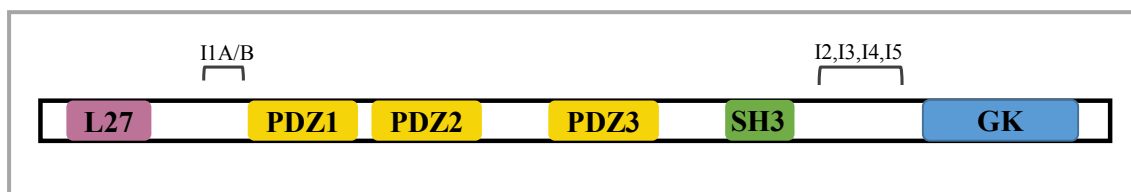
**Figura 1.7: Representación esquemática de los complejos proteicos que regulan la polaridad apico-basal en las células de mamíferos.** Los complejos PAR y CRUMBS están localizados en la zona apical de la membrana, regulando las UT. El complejo SCRIB se ubica en el dominio basolateral de las células regulando las UA en asociación con las proteínas E-cadherina. Figura adaptada de Humbert y col., 2008 (Humbert et al., 2008).

Durante el desarrollo embrionario, y en algunos procesos carcinogénicos, las células epiteliales son sometidas a la transición epitelio mesenquimal (EMT, del inglés *epithelial mesenchymal transition*) que tiene como consecuencia más importante, la pérdida de las uniones celulares y de los marcadores de polaridad, lo que activa el fenotipo de migración. De esto se desprende que la integridad de la polaridad epitelial juega un rol esencial tanto en la progresión tumoral como en tejidos sanos (Debnath and Brugge, 2005) (Yamada and Cukierman, 2007). Además, como se ha mencionado, han sido reportados muchos blancos celulares de HPV, particularmente de E6, relacionados con

el control de la adherencia y la polaridad celular, perteneciendo muchos de ellos a los complejos citados anteriormente (ver Tabla 1.3). La modificación de la expresión de estas proteínas, con importantes funciones estructurales y de señalización, podría promover el desarrollo de alteraciones morfológicas, deficiencias en las uniones intercelulares, pérdida de polaridad y características invasivas propias de los procesos carcinogénicos.

### 1.3.1 Características de DLG1

La proteína DLG1 forma parte del complejo de polaridad SCRIBBLE, a nivel de las UA. DLG1 es miembro de la familia de proteínas MAGUK, los cuales poseen dominios de reconocimiento e interacción proteicos característicos. Así, DLG1 presenta tres dominios tipo PDZ, un dominio de interacción SH3 (del inglés *Src homology 3*) y una región carboxilo-terminal enzimáticamente inerte hómologa a la enzima guanilato quinasa de levaduras (GK). Esta organización modular de la familia proteica permite su función como proteínas de andamiaje, orquestando el ensamblaje de vías de transducción de señales en localizaciones específicas de la célula, incluyendo la membrana plasmática (Roberts et al., 2012). DLG1 también contiene otro módulo de interacción proteica en su región amino-terminal: L27, involucrado en la formación de oligómeros de DLG1 y que también media su interacción con otras proteínas (Oliva et al., 2012). Además, mediante procesos de *splicing* alternativo, se obtienen múltiples isoformas de DLG1 (McLaughlin et al., 2002) (ver Figura 1.8).



**Figura 1.8: Esquema estructural de DLG1.** Se muestran los distintos dominios presentes en la proteína celular y la localización de los distintos sitios de *splicing* (I1A, I1B, I2-I5). Figura adaptada de Roberts y col. (Roberts et al., 2012).

El homólogo en *Drosophila melanogaster* de DLG1, el oncosupresor DLGA, participa en el control de la proliferación, adhesión y polaridad de las células, así como también en la inhibición de la invasión celular durante el desarrollo, por lo que ha sido identificado como un agente supresor de tumores (Goode and Perrimon, 1997). A su vez,

se ha demostrado su rol en la regulación de la polaridad apicobasal en células epiteliales de *Drosophila* (Wang and Margolis, 2007). La relevancia de esta proteína también fue demostrada en el homólogo de *Caenorhabditis elegans*, mostrándose que es requerida para la formación de las UA (Bossinger et al., 2001). En roedores, sus homólogos muestran una conservación evolutiva funcional, remarcando su probable rol en el control de polaridad (Humbert et al., 2003).

En células epiteliales DLG1 colocaliza con E-cadherinas en las UA en asociación con el citoesqueleto, desarrollando funciones estructurales y de transmisión de señales, importantes para la regulación de la proliferación (Reuver and Garner, 1998). A su vez, también se encuentra a nivel nuclear en diversos tipos de células y tejidos. Así, han sido descritas varias isoformas de la proteína DLG1 con distinta localización y probablemente diferentes roles dentro de la célula. Estas isoformas contienen combinaciones de inserciones como resultado de *splicing* alternativo, como señalado anteriormente, que tiene lugar en dos regiones bien definidas de su secuencia codificante (McLaughlin et al., 2002) (Figura 1.8).

En efecto, durante la diferenciación epitelial en un tejido escamoso la localización de DLG1 se ve modificada: en los compartimentos basales se ubica en núcleo y citoplasma, mientras que en las capas epiteliales superiores más diferenciadas se ubica en los bordes celulares (Cavatorta et al., 2004; Roberts et al., 2007). Además, cambios en la relación entre las isoformas I2, preferentemente nuclear, e I3 de DLG1 y en la localización han sido reportados durante el proceso de diferenciación epitelial (Roberts et al., 2007). También se ha demostrado la acumulación de DLG1 en el *midbody* durante la citoquinesis, sugiriendo un rol crítico de dicha proteína en esta etapa de la división celular (Massimi et al., 2003).

Al mismo tiempo, DLG1 sufre diferentes modificaciones post-traduccionales, que participan en el control de sus funciones y localización intracelular. Así, los niveles celulares y la distribución de DLG1 se encuentran normalmente regulados por un complejo patrón de eventos, que incluyen la fosforilación y ubiquitinación de dicha proteína. Específicamente, se ha demostrado que DLG1 es hiperfosforilada como resultado de un mayor nivel de contacto celular, siendo reclutada hacia dichos contactos, donde además sería estabilizada (Mantovani et al., 2001). Asimismo, durante procesos

de estrés osmótico y en relación al ciclo celular, la inducción específica de distintas quinasas celulares modifican el patrón de fosforilación de DLG1, con importantes consecuencias en su localización y, por ende, en su función (Inesta-Vaquera et al., 2010; Massimi et al., 2006; Narayan et al., 2009a; Sabio et al., 2005). Más aún, ha sido reportada la degradación diferencial de DLG1 en forma dependiente de su distribución subcelular, y en relación con su patrón de fosforilación (Massimi et al., 2004; Massimi et al., 2006; Narayan et al., 2009a). Todos estos estudios proveen una fuerte evidencia de la existencia de un complejo patrón de regulación post-traducciona de la proteína DLG1, indicando un rol multifuncional de la misma a nivel de diversos compartimentos y mecanismos celulares.

Al mismo tiempo, como se comentó, DLG1 fue el primer blanco tipo PDZ identificado para E6 de alto riesgo. Así, la interferencia de E6 con sus funciones ha sido objeto de numerosos estudios incluyendo investigaciones de nuestro laboratorio (Gardiol et al., 2002; Narayan et al., 2009b; Roberts et al., 2012).

Por último, si bien aún es mucho lo que resta por conocer acerca del rol funcional de la proteína DLG1, existen importantes evidencias experimentales que sugieren un rol de dicha proteína en control de la polaridad celular (Humbert et al., 2003; Roberts et al., 2012). Esto incluiría tanto a procesos involucrados en la morfogénesis y el desarrollo, como a procesos de supresión de tumores (Caruana and Bernstein, 2001; Iizuka-Kogo et al., 2007; Laprise et al., 2002). En este sentido, es importante destacar que DLG1 interacciona mediante sus dominios PDZ con los oncosupresores PTEN (del inglés *phosphatase and tensin homologue*) y APC (del inglés *Adenomatous Polyposis Coli*), habiéndose demostrado la importancia de estas interacciones en la regulación negativa del ciclo celular (Ishidate et al., 2000; Roberts et al., 2012). Más aún, se ha propuesto la regulación de señales de transducción que regulan el crecimiento celular por parte del complejo ternario DLG1-APC-PTEN (Sotelo et al., 2012; Subbiah et al., 2012):

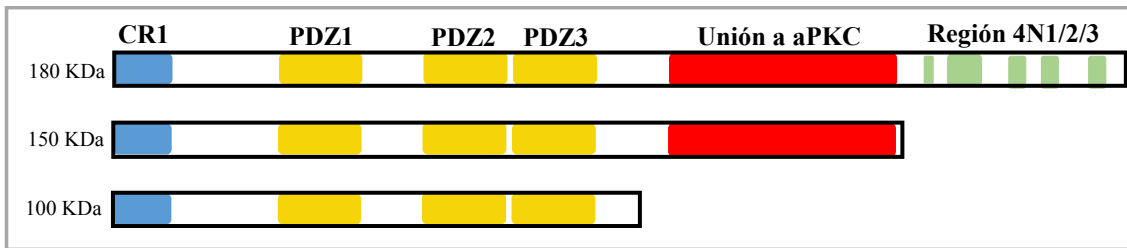
No obstante, también existe evidencia que sugiere que DLG1 cumpliría tanto funciones de supresor de tumores como oncogénicas, de acuerdo al contexto celular (Roberts et al., 2012). En este sentido, dos estudios han mostrado que *pools* específicos de DLG1 desarrollan funciones oncogénicas en presencia de oncoproteínas virales derivadas de HPV o adenovirus como se discutirá más adelante (Frese et al., 2006;

Krishna Subbaiah et al., 2012). Por lo tanto, habiendo evidencias que apoyan la función dual de DLG1 tanto como supresor de tumores como promoviendo el desarrollo oncogénico, es importante comprender cómo dicha proteína es desregulada en su expresión durante los procesos tumorales de manera de comprender su rol específico en la carcinogénesis.

### 1.3.2 Características de PAR3

La proteína PAR 3, es otra proteína de polaridad cuyo estudio hemos comenzado a abordar recientemente. Perteneciente al complejo de polaridad PAR en las UT, PAR3 es una proteína de andamiaje asociada a membrana plasmática que presenta múltiples dominios. Principalmente posee: i) tres dominios PDZ, mediante uno de los cuales interacciona con PAR 6; ii) un dominio de interacción con aPKC (aPKCBD), siendo aPKC una quinasa que se destaca por su función como regulador de la polarización a través de la fosforilación de distintos blancos, entre los que se incluye PAR3 (Tabuse et al., 1998); iii) un sitio a través del cual interacciona con distintas proteínas, denominado 4N1/2/3; y iv) un dominio CR1 por el cual es capaz de formar homodímeros (Chen and Chen, 2013).

La proteína PAR 3 en mamíferos presenta 3 isoformas, las cuales son consecuencia del *splicing* alternativo que sufre el transcrito (Gao et al., 2002), difiriendo en su peso molecular (180, 150, y 100 kDa) pero compartiendo el dominio de oligomerización (CR1) y los dominios PDZ (Figura 1.9) (Macara, 2004). La expresión de las distintas isoformas es diferente en los diversos tejidos, lo que genera múltiples patrones de interacción y, en consecuencia, diversas actividades celulares de PAR 3 (Gao et al., 2002). La interacción de PAR 3 con distintas proteínas y/o lípidos contribuyen en su localización asociada a membrana plasmática a nivel de las UT. Además, su unión con microtúbulos es relevante en la regulación de la polaridad apicobasal de los epitelios (Chen and Chen, 2013).



**Figura 1.9: Esquema de las distintas isoformas de la proteína PAR 3.** Presenta 3 variantes como resultado de distintos eventos de *splicing* alternativo. Nótese que el dominio de oligomerización (CR1) y los dominios PDZ están conservados en las 3 variantes. Figura adaptada de Sfakianos y col. (Sfakianos et al., 2007).

La fosforilación de PAR3 por aPKC es requerida para la formación de las UT y del dominio apical (Hirose et al., 2002). Por otro lado, PAR3 puede ser regulada por fosfatasas (Traweger et al., 2008) y por otras quinasas que regularían su distribución celular (Benton and St Johnston, 2003). En este sentido, es importante destacar que se ha reportado la localización nuclear de PAR3 en células tumorales HPV positivas (Fang et al., 2007), y que se ha vinculado esta localización con funciones de PAR3 durante la reparación del ADN. Además, el análisis de la secuencia de PAR 3 revela la presencia de una potencial señal de localización nuclear; no obstante, hasta el momento se desconoce el mecanismo a través del cual PAR 3 se localiza en el núcleo, no pudiéndose descartar asociación con otras proteínas nucleares (Fang et al., 2007).

Para concluir, es importante destacar que, recientemente nuestro grupo identificó a PAR3 como probable blanco de E6 de HPV-18. Así, en presencia de la oncoproteína viral observamos una redistribución de la mencionada proteína hacia núcleo y citoplasma (Facciuto et al., 2014). Así, sería interesante continuar estudiando la relevancia de los cambios en la expresión de PAR3, analizando su participación en diversas patologías y, en particular, considerando el contexto de infecciones por HPV.

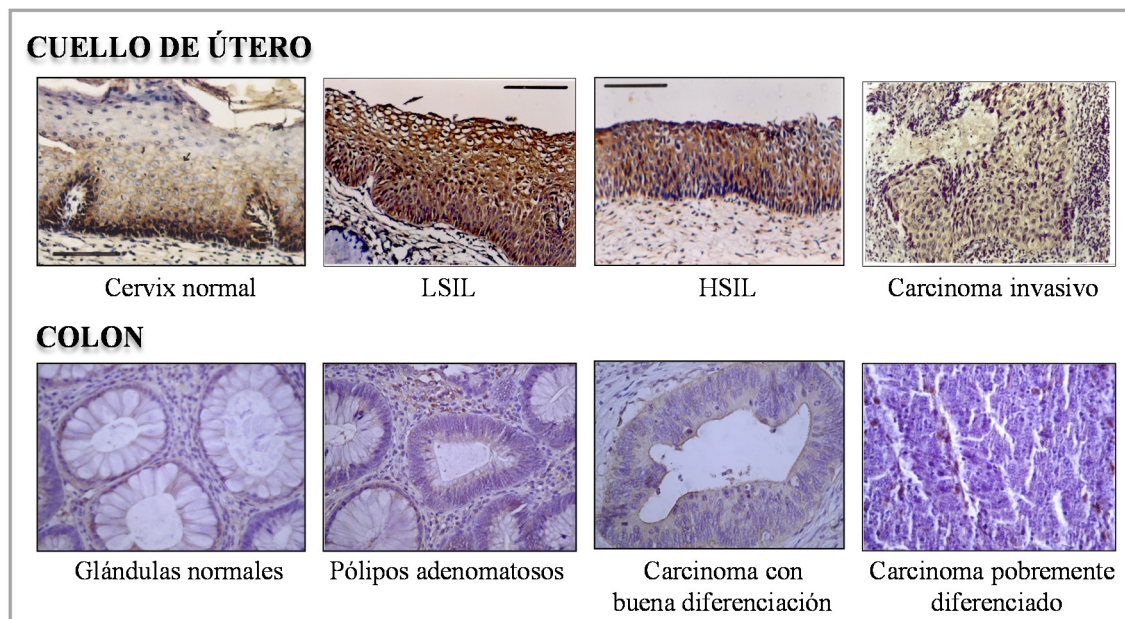
### 1.3.3 Expresión de proteínas de polaridad en los procesos carcinogénicos

Las alteraciones de la polaridad celular y la consecuente interferencia con la arquitectura de los tejidos, son características claves de los carcinomas. En este sentido es importante considerar los cambios en la expresión de algunas de estas proteínas de polaridad durante la progresión tumoral.

Ha sido reportada la relación entre el desarrollo de tumores y la regulación de la expresión de DLG1 (Facciuto et al., 2012). De hecho, los niveles de transcripción de DLG1 son extremadamente bajos en diversas células derivadas de tumores, y esta pérdida de expresión se ha correlacionado con un fenotipo celular más indiferenciado (Mantovani et al., 2001). Se destaca también el reporte de mutaciones en posiciones conservadas dentro del gen correspondiente en carcinomas ductales de mama (Fuja et al., 2004). Además, cuantiosa evidencia experimental ha demostrado alteraciones en la expresión de dicha proteína tanto en diversos procesos oncogénicos como en otras patologías (Facciuto et al., 2012).

En particular, ha sido demostrado que DLG1 presenta cambios en su patrón de distribución en diversos tumores, tanto asociados como independientes de infecciones por HPV. Según se señaló en distintos estudios utilizando biopsias humanas, en los estadios intermedios de las respectivas progresiones tumorales, DLG1 se pierde gradualmente de las zonas de contacto célula-célula, mientras que se observa un aumento en los niveles de expresión de dicha proteína, junto a una mayor distribución hacia el citoplasma (Facciuto et al., 2012). Además, dicha proteína está ausente o muy disminuida en su expresión en los focos invasivos de los carcinomas, por lo que la ausencia de DLG1 se ha asociado a eventos tardíos en la carcinogénesis. Estos patrones de expresión característicos se observaron en estudios independientes utilizando muestras derivadas de carcinoma cervical (Cavatorta et al., 2004; Watson et al., 2002), cáncer de mama (Fuja et al., 2004) y carcinoma de colon (Gardiol et al., 2006) (Figura 1.10).

Así, sería de gran relevancia poder conocer en más detalle los mecanismos involucrados en los mencionados cambios en los niveles y localización de DLG1 durante el desarrollo tumoral, principalmente en los estadios intermedios considerando su potencial aplicación como biomarcador. Además, podrían comprenderse las funciones biológicas asociadas a las mencionadas alteraciones de la expresión de DLG1 y su implicancia en las patologías (Facciuto et al., 2012; Roberts et al., 2012).



**Figura 1.10: Inmunomarcación característica de DLG1 durante la progresión maligna en biopsias.** En la figura se muestra la expresión de DLG1 observada en muestras de cuello de útero (Cavatorta et al., 2004), y la correspondiente expresión en muestras de Colon (Gardiol et al., 2006).

Por otro lado, existe cada vez más evidencia indicando que otras proteínas de polaridad se expresan diferencialmente en ciertas patologías. Así, ha sido puesto en relevancia la importancia de las proteínas del complejo de polaridad PAR en los mecanismos mediante los cuales se produce la pérdida de la polaridad y arquitectura celular en los procesos carcinogénicos (Aranda et al., 2008; Facciuto et al., 2012).

En este sentido, se encontró que la región genómica que contiene al gen que codifica para PAR3 se encuentra truncado en algunas líneas celulares derivadas de carcinomas de cabeza y cuello, pulmón y esófago (Rothenberg et al., 2010; Zen et al., 2009). También se han informado importantes funciones de PAR3 como regulador de la polaridad celular, así como también de proliferación, invasión y metástasis, en un modelo celular derivado de cáncer de mama. Notablemente, el análisis de la expresión de PAR3 en biopsias de cáncer de mama evidenció una disminución de PAR3 en los bordes celulares o bien deslocalización de dicha proteína (Xue et al., 2013). Señalan en el mismo sentido los estudios llevados a cabo por McCaffrey y colaboradores en modelos de ratones, que relacionan a la integridad de PAR3 con el mantenimiento de marcadores importantes de polaridad y características tumorales de menor invasividad y metástasis. Estos hallazgos se corroboraron en biopsias de cáncer de mama, reportándose una disminución de la expresión de PAR3 en los estadios invasivos, junto con activación de

vías de señalización que podrían inducir metástasis (McCaffrey et al., 2012). Además, recientemente se reportó a la disminución de PAR3 como un evento en favor del proceso de EMT en un modelo celular de cáncer de próstata (Zhang et al., 2015).

Estas y otras evidencias han llevado a proponer a PAR3 como supresor de tumores (Facciuto et al., 2012). Sin embargo, en estudios en modelos de cáncer de piel, se pudo observar que PAR 3 podía actuar como un promotor de tumores, estimulando las vías de supervivencia, o bien como oncosupresor, al relacionarse a PAR3 con menor tasa tumoral, dependiendo del tipo específico de tumor (Iden et al., 2012). Además, se ha postulado que tanto la pérdida (Chen and Macara, 2005) como el aumento de PAR3 (Mishima et al., 2002) pueden vincularse a la ruptura de las uniones celulares, lo que permitiría la migración celular. A su vez, se ha propuesto que la pérdida de PAR3 en el contexto de cáncer de mama implica tanto mecanismos de proliferación tumoral como la inducción de mecanismos apoptóticos (Archibald et al., 2015). Así, queda en evidencia que la relación de PAR3 con procesos de proliferación y apoptosis es compleja y, muchas veces, punto de controversia.

Por su parte, Bonastre y colaboradores hallaron mutaciones recurrentes en la secuencia codificante para PAR3, con la consecuente inactivación de la expresión, en carcinomas pulmonares de células escamosas. En este sentido es interesante destacar que esto autores observaron distintos patrones de expresión de PAR3 tanto en tumores pulmonares como en carcinomas de cabeza y cuello, mientras que no se encontró una clara correlación entre los niveles de PAR3 y procesos de metástasis (Bonastre et al., 2015).

Así, considerando principalmente: i) la importante función de PAR3 en la polaridad celular, ii) su actividad, aunque controversial, en la supresión de tumores y metástasis, y iii) su reciente identificación como blanco de HPV (Facciuto et al., 2014), se desprende la necesidad de evaluar la expresión de dicha proteína en el contexto de lesiones asociadas a infecciones por HPV.

#### **1.3.4 Regulación del gen de polaridad *DLG1* durante la progresión maligna**

A pesar de los reportes antes mencionados usando muestras histológicas donde se evidencia la importancia de la expresión diferencial de proteínas de polaridad en los

procesos oncogénicos, poco se conoce de los mecanismos que regulan tales cambios. Específicamente, son pocos los datos acerca de los procesos que controlan la abundancia de tales proteínas incluso en modelos celulares.

La familia de factores transcripcionales Snail juega un papel fundamental en el proceso de EMT, el cual es esencial en ciertos procesos normales de las células como el desarrollo embrionario. Sin embargo, su activación patológica durante la progresión maligna permite que las células tumorales primarias adquieran propiedades mesenquimáticas y migratorias, favoreciendo la invasividad y la metástasis (Peinado et al., 2007; Thiery, 2003). Los factores Snail son importantes represores de proteínas de adhesión como ocludina, claudina y caderina (Peinado et al., 2004), sugiriendo que los componentes de complejos de polaridad también podrían ser blancos de regulación de dichos factores transcripcionales. En este sentido, mediante un análisis funcional del promotor de *DLG1*, fue reportado por nuestro grupo que los factores Snail reprimen la transcripción de *DLG1 in vitro* y también *in vivo* (Cavatorta et al., 2008). Estos hallazgos aumentaron el conocimiento de la regulación de *DLG1* y, más aún, resalta la injerencia de los factores Snail en el silenciamiento de genes de polaridad, con las consecuentes implicancias en el desarrollo tumoral (Facciuto et al., 2012).

Como se comentó, *DLG1* se caracteriza por presentar distintas isoformas producto de eventos de *splicing* alternativo (Roberts et al., 2012). En el marco del estudio de la regulación de la expresión de *DLG1*, hemos identificado que la región no traducida 5' (5' UTR, del inglés *untranslated región*) también es objeto de dichos eventos de *splicing*, resultando en dos isoformas de ARNm. Dichas isoformas difieren en su eficiencia de traducción y por ende contribuyen a regular los niveles de *DLG1* (Cavatorta et al., 2011). Además, hemos reportado como las expresión diferencial de los ARN conteniendo distintas 5'UTR cumplen roles en diversos procesos biológicos, incluyendo la diferenciación celular, la formación de contactos intercelulares y el grado de progresión del ciclo celular (Marziali et al., 2015). Estos reportes, por tanto, aportan mayores evidencias de la complejidad de la regulación de los niveles de *DLG1* en distintos contextos.

En este sentido, otro mecanismo muy interesante no analizado hasta el momento es la probable contribución de mecanismos epigenéticos a la regulación de la expresión

de DLG1. Específicamente, la metilación del ADN en citidinas ubicadas 5' de residuos de guanosina es una de las modificaciones de ADN genómico más importantes en células eucariotas. Así, la metilación de citosinas (C) en dinucleótidos CpG, proceso catalizado por enzimas ADN metil-transferasas, se reconoce como un mecanismo de regulación epigenético que juega roles importantes en diferentes procesos biológicos (Rodenhiser, 2009).

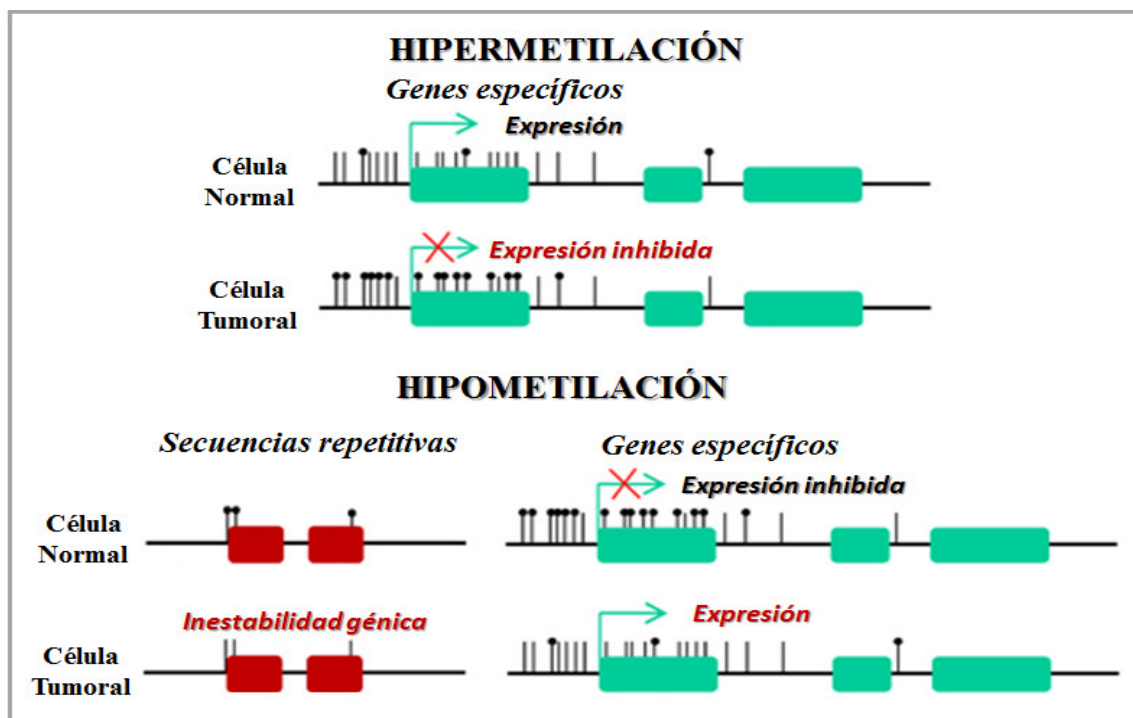
La distribución de dinucleótidos CpG metilados y no metilados no es azarosa, sino que sigue patrones determinados (Daniel et al., 2011). En particular, la alteración de dichos patrones de metilación del ADN ha sido reportada como un componente clave en el desarrollo de tumores (Fidler, 2003). Específicamente en vertebrados, se reconocen zonas en el ADN con alta densidad de dinucleótidos CpG, denominadas Islas CpG. Dichas zonas presentan cantidades significativamente mayores de CpG, y predominantemente de-metiladas, en comparación al resto del genoma, lo que permite que sean sitios claves de regulación. Situadas en zonas promotoras en muchos casos, su estructura le permite influenciar localmente a la cromatina y regular la actividad génica. En particular en el genoma humano se encuentran más de 29.000 Islas CpG y generalmente presentan un estado de-metilado en células normales, lo que se asocia a promotores activos (Daniel et al., 2011; Deaton and Bird, 2011).

Principalmente, se ha descrito la hipermetilación de promotores. Dicha hipermetilación aberrante induce la represión de la transcripción del gen en cuestión jugando un rol clave durante la carcinogénesis (Jones, 2002). Se ha descrito la disminución en la expresión de diversos genes supresores de tumores por hipermetilación de sus promotores (Rodenhiser, 2009), incluyendo a genes de polaridad como el correspondiente a la proteína E-cadherina (Chen et al., 2003; Esteller et al., 2001).

En cambio, menos se sabe de los posibles efectos de estados de hipometilación en dichas Islas CpG. Se ha asociado a la progresión maligna con procesos de hipometilación global del genoma, con una concomitante inestabilidad genómica general (Daniel et al., 2011). Sin embargo, en los últimos años aumentó el número de reportes de genes sobre-expresados en forma específica mediante patrones de hipometilación de las correspondientes regiones promotoras (Brucato et al., 2014; Cui et al., 2008; Hoffmann

and Schulz, 2005; Paredes et al., 2005; Park et al., 2014). Los distintos mecanismos expuestos se esquematizan en la Figura 1.11.

Además, a partir de que en nuestro laboratorio se clonó y se analizaron las secuencias funcionales de la región promotora de *DLG1* (Cavatorta et al., 2008), pudimos establecer que dicho promotor es muy rico en dinucleótidos CpG. Por todo lo expuesto, resulta interesante estudiar si mecanismos de regulación epigenética, y particularmente el estado de metilación del correspondiente promotor, pueden contribuir a explicar los niveles de expresión de *DLG1* en biopsias.



**Figura 1.11: Mecanismos de regulación por metilación del ADN asociados a procesos carcinogénicos.** Se esquematiza el estado en células normales y tumorales tanto de secuencias repetitivas como de genes específicos. Los sitios de inicio transcripcional de estos últimos se indican con flechas. Los residuos CpG se señalan como líneas verticales y se muestra su estado metilado (líneas con remate) o de-metilado (líneas sin remate). Figura adaptada de Lopez-Serra y col., 2012 (Lopez-Serra and Esteller, 2012).

Más aún, el análisis de la metilación de promotores y su utilización como biomarcador se ha convertido en un área de gran relevancia en la oncología clínica en general (Sharma et al., 2010). Por lo tanto, el estudio de la incumbencia de los mecanismos epigenéticos en la regulación de la expresión de esta y otras proteínas de polaridad, claves durante el desarrollo tumoral, podría contribuir a un mejor entendimiento de la biología molecular del cáncer.

*De los datos planteados en esta sección, surge la necesidad de estudiar en profundidad distintos mecanismos de regulación de proteínas de polaridad que permitan correlacionar las alteraciones en su expresión con las observaciones realizadas durante transformaciones malignas, particularmente aquellas asociadas a infecciones por HPV.*

## 2. OBJETIVOS



### 2.1 Objetivo general

La transformación maligna está frecuentemente asociada a la pérdida de la polaridad celular, siendo el estudio de dicho evento uno de los principales intereses de nuestro grupo de trabajo. Además, los virus oncogénicos se constituyen como sistemas útiles para abordar el análisis de los mecanismos moleculares que conllevan al proceso tumoral. Así, nuestro objetivo consiste en estudiar diversos factores celulares y virales implicados en los procesos de transformación; prestando especial atención a aquellos asociados a infecciones por el virus HPV, agente etiológico del cáncer cervical.

A su vez, al estar el ciclo de replicación de HPV estrechamente relacionado con la diferenciación del epitelio que infecta, los cultivos organotípicos *raft* constituyen herramientas fundamentales para el estudio de los mecanismos moleculares asociados a dichas infecciones. Por ello, también nos planteamos como objetivo implementar dicha metodología al estudio de la expresión de proteínas celulares de polaridad en presencia de ciertas proteínas virales, en un contexto que asemeja en forma más fisiológica lo que ocurre en infecciones naturales de HPV. En este sentido, consideramos de relevancia analizar la expresión de la proteína DLG1. Dicha proteína se destaca entre los blancos celulares de HPV involucrados en la polaridad celular, cumpliendo funciones estructurales y participando de importantes mecanismos de transmisión de señales. Asimismo, es de nuestro interés extender estos estudios al análisis de otras proteínas celulares. Tal es el caso de la proteína de polaridad PAR3, recientemente reportada por nuestro grupo como blanco de HPV.

Más aún, utilizando la herramienta de cultivos organotípicos para asemejar el contexto natural de infecciones por HPV, estamos interesados en caracterizar con más detalle la expresión génica viral en el contexto de los cultivos *raft* generados, con principal atención en la expresión de las isoformas de la proteína E6. Así, esperamos contribuir al entendimiento de la expresión génica viral en los epitelios infectados, a la vez que comprender más profundamente la regulación de proteínas de polaridad blanco de HPV, posibles biomarcadores útiles en el diagnóstico histológico.

Por lo dicho, planteamos como objetivo de este trabajo de Tesis continuar con la caracterización de la regulación de la proteína DLG1, buscando una mejor comprensión de los mecanismos de progresión maligna en general. De esta forma, el estudio de probables mecanismos de tipo epigenéticos en la regulación de DLG1, constituye un punto de gran interés en el marco de mi Tesis Doctoral. Por lo expuesto, los conocimientos generados en este trabajo representan un paso hacia el entendimiento de los mecanismos generales de carcinogénesis.

## 2.2 Objetivos específicos

### 2.2.1 Análisis de la expresión de proteínas de polaridad celular, blancos de HPV, en presencia de las proteínas virales

- *Estudio de la incidencia de proteínas virales tempranas sobre la actividad promotora de DLG1*
- *Optimización de cultivos organotípicos raft*
- *Estudio de la expresión de la proteína de polaridad celular DLG1 en presencia de proteínas de HPV en cultivos organotípicos*
- *Estudio de la expresión de la proteína de polaridad celular PAR3 en presencia de proteínas de HPV en cultivos organotípicos*
- *Estudio de la expresión de PAR3 en biopsias cervicales: estudios preliminares*

### 2.2.2 Estudio de la expresión génica de HPV en el microambiente epitelial

- *Análisis del splicing de los transcritos tempranos de HPV-18*
- *Análisis transcripcional de DLG1, blanco celular de HPV, en los estratos epiteliales de cultivos RAFT*

### 2.2.3 Análisis de la regulación de la proteína de polaridad DLG1 por procesos independientes de infecciones virales: mecanismos epigenéticos

- *Tratamiento con el inhibidor de metilación 5-aza*
- *Estudio del estado de metilación de la región promotora de DLG1*

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS



#### 3.1 Cepas bacterianas y vectores de expresión

En la Tabla 3.1 se detallan el genotipo de la cepa bacteriana y las características de los vectores de expresión utilizados:

Cepas bacterianas	Genotipo	Origen
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44, <math>\Delta</math>lacU169, (<math>\Phi</math>80lacZ <math>\Delta</math>AM15), <i>hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1</i></i>	Colección laboratorio
Plásmidos	Características relevantes	Referencia u origen
pRL-TK vector	Vector que permite la expresión de la proteína luciferasa de Renilla utilizada como control interno en los ensayos de luciferasa para análisis de actividad promotora. Ori (BR322), Amp <sup>r</sup> , Rluc+	Promega (EE.UU.)
pcDNA-3	Vector de clonado que permite la expresión de proteínas recombinantes en células animales. Ori (colE1), Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> , CMVp, MCS	Invitrogen (EE.UU.)
pGL3	Vector reportero de regiones promotoras que contiene secuencias que codifican para la luciferasa de luciérnaga sin su promotor Ori (colE1), Amp <sup>r</sup> , MCS, luc+	Promega (EE.UU.)
LUC-790	pGL3 conteniendo un fragmento de 883 pb del promotor de DLG1	(Cavatorta et al., 2008)
pcDNA3-E616/HA	pcDNA3 conteniendo secuencias que codifican para oncoproteína E6 de HPV-16, fusionado al epítipo HA	Trabajo Doctoral de la Dra. Facciuto
pcDNA3-E618/HA	pcDNA3 conteniendo secuencias que codifican para proteína E6 de HPV-18, fusionado al epítipo HA	Trabajo Doctoral de la Dra. Facciuto
pcDNA3-E611/HA	pcDNA3 conteniendo secuencias que codifican para proteína E6 de HPV-11, fusionado al epítipo HA	Trabajo Doctoral de la Dra. Facciuto
pcDNA3-E5 16	pcDNA3 conteniendo secuencias que codifican para la proteína E5 de HPV-16	Colección laboratorio
pcDNA3-E7 16	pcDNA3 conteniendo secuencias que codifican para la oncoproteína E7 de HPV-16	Colección laboratorio
pcDNA3-E7 18	pcDNA3 conteniendo secuencias que codifican para la oncoproteína E7 de HPV-16	Cedido por el Dr. Lawrence Banks
pGEM®-T-Easy		Promega (EE.UU.)

pGEX-2T	Ori (colE1) Amp <sup>r</sup> , permite el clonado de productos de amplificación.	(Smith and Johnson, 1988)
pKMyc PAR 3	Vector de clonado que permite la expresión de proteínas fusionadas a la proteína glutatión S-transferasa (GST). Ori (pBR322), sitio de múltiple clonado (MCS), GST, lac I, Amp <sup>r</sup> , tacP	Cedido por el Dr Mathieu Coureuil (Coureuil et al., 2009)
pGEX2T-PAR3pept	Vector que permite la expresión de la proteína PAR 3 de ratón fusionado a los aminoácidos 408-439 del dominio carboxilo terminal de cMyc (del inglés <i>Cellular myelocytomatosis oncogene</i> ), tanto en sistemas in vitro como en células animales	Este trabajo de Tesis Doctoral
	pGEX-2T conteniendo un fragmento de aproximadamente 860 pb que codifica para los residuos 457 a 744 de la proteína PAR3 fusionada a la proteína GST	
<b>Vectores retrovirales</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Referencia u origen</b>
pBabe	Vector retroviral para el clonado y expresión de genes en células de mamífero Amp <sup>r</sup> , Puro <sup>r</sup> , MCS	Addgene, plasmid #1764
pBabe E711	pBabe conteniendo secuencias que codifican para la proteína E7 de HPV-11	(Guess and McCance, 2005)
pBabe E6/E711	pBabe conteniendo secuencias que codifican para las proteínas E6 y E7 de HPV-11	(Guess and McCance, 2005)
pLJ	Vector retroviral para el clonado y expresión de genes en células de mamífero Kn <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> , MCS	Addgene, #34595 (Cheng et al., 1995)
pLJ- E718	pLJ conteniendo secuencias que codifican para la proteína E7 de HPV-18	(Boccardo et al., 2004)
pLJ-E6E718	pLJ conteniendo secuencias que codifican para la proteína E6 y E7 de HPV-18	(Boccardo et al., 2004)

**Tabla 3.1:** Cepas bacterianas y vectores.

### 3.2 Células animales utilizadas

- HEK293: Línea celular epitelial transformada derivada de células de riñón de embrión humano. "American Type Culture Collection" (ATCC CRL-1573).
- HaCaT: Línea celular epitelial inmortalizada derivada de queratinocitos de piel humana (Boukamp et al., 1988)

- SH-SY5Y: Línea celular derivada de neuroblastoma humano. “American Type Culture Collection” (ATCC CRL-2266).
- K562: Línea celular humana transformada derivada de leucemia mieloide aguda. “American Type Culture Collection” (ATCC CCL 243).
- HeLa: Línea celular humana transformada derivada de carcinoma cervical asociado a HPV-18, expresa la oncoproteína E6 de HPV-18. “American Type Culture Collection” (ATCC CCL-2).
- 3T3-J2: Línea celular derivada de fibroblastos embrionarios de ratón de la cepa BALB/c (Allen-Hoffmann and Rheinwald, 1984); línea subclonada a partir de la línea 3T3-SA (ATCC CCL-92).
- PHK (del inglés *primary human keratinocytes*): Queratinocitos primarios humanos neonatales (NHEK-Neo, Neonatal Normal Human Epidermal Keratinocytes, Pooled, Cat 192906, Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD).
- Am12: línea celular anfotrópica empaquetadora de retrovirus derivada de leucemia de ratón (Markowitz et al., 1988)

### 3.3 Condiciones y medios de cultivo

#### 3.3.1 Medios de cultivo para células bacterianas

El medio utilizado para el cultivo y mantenimiento de las cepas bacterianas fue Luria Bertani (LB) (Sambrook, 1989), cuya composición es: Peptona de caseína 10 g/l, Extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l. Cuando este medio se requirió en estado sólido, se le agregó agar-agar a una concentración de 1,5%. Cuando fue necesario se usó el antibiótico Ampicilina (Amp) o Kanamicina (Kn) en una concentración final de 100 µg/ml en ambos casos.

#### 3.3.2 Medio de crecimiento, mantenimiento y soluciones utilizadas para el cultivo de las células animales

Se utilizaron las soluciones: Solución amortiguadora de fosfatos (PBS): NaCl 8 g/l; KCl 0,2 g/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/l; pH=7,2; Solución de tripsina/EDTA: tripsina (GIBCO, EE.UU.) 0,05% y EDTA 0,02%, en solución PBS (esterilizada a través de filtros de 0,22 µm).

En general, las líneas celulares se cultivaron en Medio de cultivo completo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (GIBCO, EE.UU.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (PAA Laboratorios, Alemania), 2 mM L-Glutamina (PAA Laboratorios, Alemania) y los antibióticos penicilina y estreptomina (Sigma Aldrich, EE.UU) en una concentración final de 60 µg/ml y 100 µg/ml, respectivamente.

Para el desarrollo de los cultivos *raft* se utilizaron células PHK de bajo número de pasajes, las que fueron cultivadas en Medio libre de suero para queratinocitos (KFSM, del inglés *keratinocyte serum free medium*, GIBCO, EE.UU.), reemplazado cada 2 días y hasta un 80% de confluencia. Las células se mantuvieron en estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para el pasaje de los PHK, se removió el medio por lavado con PBS, seguido de adición de solución Tripsina/EDTA al 0,05% e incubando a 37°C. Luego de 5 minutos aproximadamente, la tripsina fue inhibida por agregado de medio DMEM conteniendo SFB. Las células se centrifugaron y el *pellet* se recuperó en KFSM.

Para el desarrollo de los cultivos organotípicos *raft*, se utilizó Medio de Cultivo para Raft (RCM, del inglés *raft culture medium*). Dicho RCM se compone de 3 partes de medio DMEM, 1 parte de F12, suplementado al 10% con SFB, Toxina Colérica (Sigma Aldrich, EE.UU) 0,1 nM, Insulina (Sigma Aldrich, EE.UU) 5 µg/ml, Apo-transferrina (Sigma Aldrich, EE.UU) 5 µg/µl, Hidrocortisona (Sigma Aldrich, EE.UU) 0,4 µg/ml y EGF (del inglés *epidermal growth factor*, Sigma Aldrich, EE.UU) 0,5 ng/ml.

### 3.3.3 Cultivo celular

#### **Cultivo bacteriano:**

Los cultivos de *E. coli* se crecieron en medio LB líquido a 37°C con agitación, en presencia del antibiótico correspondiente. Los medios sólidos se cultivaron en estufa a 37 °C.

#### **Mantenimiento de las células animales:**

Todos los cultivos se realizaron en estufa a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Cuando las células llegaron a un grado de confluencia donde cubrían un alto porcentaje de la superficie de los frascos donde se estaban cultivando, se les retiró el sobrenadante del cultivo y se lavó la monocapa celular con PBS. Después de eliminar la solución de

lavado, se agregó cantidad adecuada de la solución de tripsina/EDTA, dejándola actuar por unos min hasta lograr el desprendimiento de las células adheridas. Luego se adicionó medio de cultivo, neutralizando la acción de la tripsina, y se homogenizó la suspensión celular. Una alícuota adecuada de esta suspensión se continuó cultivando en un nuevo frasco con el agregado de medio de cultivo completo fresco. En el caso particular de los PHK, y como se indica anteriormente, la suspensión celular con tripsina se inactivó por agregado de medio con SFB, se centrifugó y se recuperaron las células en medio para queratinocitos.

### **3.4 Transformación de células de *E. coli***

#### **3.4.1. Preparación de células a transformar**

##### **Inducción del estado de competencia por el método de CaCl<sub>2</sub>**

Las células a transformar fueron crecidas hasta fase estacionaria en medio LB, se diluyeron 1:50 en el mismo medio y se cultivaron hasta llegar a fase exponencial, evaluado por medida de absorbancia a 595 nm hasta alcanzar una DO de aproximadamente 0,6. Luego de dejar reposar en hielo por 10 min, las células se cosecharon por centrifugación durante 5 min a 6000 rpm y a 4 °C en una centrífuga HERMLE labnet Z323K (rotor 220.78 VO2), y se resuspendieron en CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío. Tras volver a enfriar y cosechar las células, las mismas se resuspendieron en una solución fría de CaCl<sub>2</sub> 50 mM al 15% de glicerol. Se trabajó siempre en esterilidad y las células se conservaron a -70 °C hasta su utilización.

##### **Preparación de células para electroporación**

Las células se crecieron hasta fase estacionaria en medio LB, se diluyeron 1:50 en el mismo medio y se cultivaron hasta llegar a fase exponencial. Luego de dejar enfriar en hielo por 10 min, las células se cosecharon por centrifugación durante 10 min a 6000 rpm y a 4 °C y se resuspendieron en H<sub>2</sub>O destilada estéril fría. Luego de repetir este paso, se resuspendieron en glicerol al 10% estéril frío y se recogieron por centrifugación a 7500 rpm a 4 °C durante 10 min. Por último, las células se resuspendieron nuevamente en glicerol al 10% estéril frío y se conservaron a -70 °C hasta su utilización. Todas las centrifugaciones se hicieron en centrífuga HERMLE labnet Z323K (rotor 220.78 VO2).

### 3.4.2. Transformación de células competentes con ADN plasmídico

#### Transformación de células competentes logradas por tratamiento con CaCl<sub>2</sub>

Alícuotas de 100 µl de células competentes obtenidas por tratamiento con CaCl<sub>2</sub> como se detalló anteriormente, fueron transformadas agregando cantidades adecuadas de los diferentes plásmidos o mezclas de ligado. Las mezclas de transformación se mantuvieron en hielo durante 45 min. Luego se las sometió a un tratamiento de shock térmico a 42 °C por 1 min, se las dejó reposar en hielo unos minutos y se les agregó 1 ml de LB fresco, tras lo cual se dejaron recuperar a 37 °C con agitación por 1 h. Por último, se recuperaron las células por centrifugación a 7500 rpm por 5 min en microcentrífuga MiniSpin (Eppendorf, Alemania) (rotor F-45-12-11), se resuspendieron en mínimo volumen de LB y se sembraron en placas de Petri conteniendo LB-agar suplementado con los antibióticos correspondientes y en las concentraciones adecuadas. Las placas se incubaron durante 14-16 hs a 37 °C para seleccionar las bacterias transformantes.

#### Transformación por electroporación

Alícuotas de 40 µl de células cosechadas como se detalló previamente se agregaron, junto con las cantidades adecuadas de los diferentes plásmidos o ligaciones, en cubetas para electroporación. La transformación se logró electroporando con un pulso corto de 2,3 kV de potencia en un electroporador *E. coli* Pulser (Bio-Rad, EE.UU.). Luego se recuperaron las células en 1 ml de LB y en agitación durante 1 h. Por último, se recuperaron las células por centrifugación, se resuspendieron en mínimo volumen de LB y se sembraron en placas de Petri conteniendo LB-agar suplementado con antibióticos correspondientes. Las bacterias transformantes se seleccionaron incubando las placas a 37 °C durante 14-16 hs.

### 3.5 Transfección de células animales

Esta técnica permite la transferencia de material génico a células animales en cultivo. 4 10<sup>5</sup> células HEK293, fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB para su transfección. Se sembraron en placas de Petri tipo cultivo celular (60 mm de diámetro) de manera de alcanzar una confluencia del 75 a 90% a las 24 hs. Las

células se cultivaron en una estufa gaseada a 37°C y se transfectaron utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio (Scholat, 1997).

Así, se preparó una solución compuesta por el ADN a transfectar, 22 µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M y 190 µl de tampón Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl pH 7,9; 1 mM EDTA). Esta mezcla se agregó gota a gota sobre 200 µl de solución HBS 2x (Hepes 50 mM; NaCl 0,28 M; NaHPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 1,5 mM; pH=7,12), y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla final se agregó a las células sembradas el día anterior a las cuales se les había adicionado 3 ml de medio fresco. Se dejó precipitando el ADN durante 24 a 48 hs.

### **3.6 Tratamiento con el inhibidor de metilación 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-aza)**

El inhibidor de ADN metiltransferasas celulares, 5-Aza (Sigma Aldrich, EE.UU.), se disolvió en DMSO siguiendo las indicaciones del proveedor. Para realizar el tratamiento, las distintas líneas celulares fueron inicialmente contadas y sembradas en placas y a las 24 hs se comenzó el tratamiento por agregado de la droga 5-aza en las diluciones indicadas: 1 10<sup>5</sup> HeLa, 5-aza 10 µM; 7 10<sup>5</sup> SHSY-5Y, 5-aza 10 µM; 7 10<sup>5</sup> K562, 5-aza 20 µM. Asimismo, para las células en condición control, se agregó igual cantidad de DMSO. Se mantuvo el tratamiento, renovando el medio de cultivo en forma diaria, durante 72 hs, tras lo cual se obtuvieron los extractos proteicos o de ARN, según correspondiera.

### **3.7 Técnicas concernientes a la manipulación de ácidos nucleicos**

#### **3.7.1 Aislamiento y purificación de ADN plasmídico**

Para la preparación de ADN plasmídico se utilizaron los equipos comerciales: NucleoSpin® Plasmid Miniprep Kit (MACHEREY-NAGEL, Alemania), Axyprep plasmid miniprep kit (Axygen, EE.UU.), High Pure Plasmid isolation kit (Roche, Alemania), NucleoBond® Xtra Midi/Maxi Kit (MACHEREY-NAGEL, Alemania), QIAGEN® plasmid mini Kit (QIAGEN, Alemania) y QIAGEN® plasmid maxi Kit (QIAGEN, Alemania). En cada caso se siguieron las instrucciones del proveedor. El ADN plasmídico se resuspendió en H<sub>2</sub>O estéril y se conservó a -20 °C hasta su utilización. Para

el análisis de las construcciones realizadas se utilizó el método de extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina de Birnboim (Birnboim and Doly, 1979).

### 3.7.2 Purificación de ADN genómico

Específicamente para las purificaciones desde células en cultivo, 1-2  $10^6$  células fueron lisadas en 0,7 ml de solución de lisis (Tris 10mM pH8,3, EDTA 38mM pH8, 1% SDS y 200  $\mu$ g proteinasa K) e incubadas para la digestión por proteinasa K toda la noche a 56 °C, enzima que fue inactivada luego térmicamente (15 min. a 95 °C). A estas muestras luego se las procesó para la purificación del ADN genómico mediante extracción con fenol/cloroformo. El ADN purificado se analizó en gel de agarosa al 1,5%.

Cuando se partió de muestras fijadas en parafina, su utilización fue previamente sometida a evaluación por el correspondiente Comité de Bioética de nuestra Facultad (Resolución 339 del año 2012). Dichas muestras fueron cedidas por la Dra. Analía Nocito de la Cátedra de Anatomía y Fisiología Patológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Rosario. En cada caso, 3 a 4 cortes de 5  $\mu$ m de espesor fueron des-parafinados por tratamiento con xileno durante 2 hs en agitación. Luego se continuó hidratando las muestras mediante secuencia de soluciones de etanol de concentración decreciente. Las muestras hidratadas fueron lisadas en solución de lisis (Tris 1mM pH 8,3, EDTA 1mM pH 8, Tween 20 1%, proteinasa K 200  $\mu$ g) incubando toda la noche a 56 °C. Por último, se procedió a la inactivación térmica de la enzima y a la purificación del ADN genómico como se describió anteriormente.

### 3.7.3 Extracción de ARN y transcripción reversa (RT)

Para llevar a cabo la extracción del ARN total se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen, EE.UU.), siguiendo el protocolo recomendado. El ADN copia (ADNc) se sintetizó a partir de 2  $\mu$ g de ARN total, en las siguientes condiciones: 5  $\mu$ M del cebador oligodT o 6  $\mu$ M de cebadores *random* (Thermo Scientific, EE.UU); 1 mM dNTPs; 100 U de MMuLV-RT (Fermentas) y 10 U de inhibidor de ribonucleasa, en un volumen final de 20  $\mu$ l. Se siguió el perfil térmico recomendado por el proveedor. Tras inactivar térmicamente la enzima, el ADNc sintetizado se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización.

Alternativamente, algunas muestras de cultivos *raft* fueron procesadas haciendo uso de la metodología de microdissección por captura laser (LCM, del inglés *laser capture microdissection*), la cual permite separar células únicas o pequeños grupos de células de manera selectiva a partir de cortes de tejido. En nuestro caso, aplicamos la técnica mencionada al estudio de ARN en poblaciones específicas de células en ciertos cultivos. Para ello, las correspondientes muestras de cultivos *raft* fijadas y parafinadas fueron diseccionadas y procesadas por el servicio de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, LETH). Para la obtención del ARN de cada estrato epitelial se utilizaron al menos tres microdissecciones de tejido. El mencionado servicio siguió las condiciones generales antes descriptas hasta la obtención del ADNc correspondiente a cada capa. Específicamente, se utilizaron cebadores de tipo *random* para la reacción de retro transcripción y el ADNc correspondiente a cada una de las capas epiteliales fue resuspendido en un volumen final de 30  $\mu$ l.

#### **3.7.4 Estimación de la concentración y calidad de ácidos nucleicos (AN)**

La cuantificación de los AN obtenidos se realizó por medidas espectrofotométricas a 260 nm y se calculó la concentración según el valor leído, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 50  $\mu$ g/ml de ADN doble hebra y a 40  $\mu$ g/ml en el caso de ARN. Para esto se utilizó una dilución adecuada del AN y se midió en un espectrofotómetro Genova de Jenway (Jenway - Bibby Scientific Limited, Reino Unido). Además, la integridad del AN se corroboró mediante corrida y visualización en geles de agarosa. También se determinaron los índices de Absorbancia a 260 nm / Absorbancia a 280 nm, de manera de detectar contaminaciones con proteínas y con sustancias orgánicas (Sambrook, 1989).

#### **3.7.5 Electroforesis de AN en geles de agarosa**

Los geles se prepararon en solución tampón TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 10 mM; pH= 8). Para la visualización del AN se procedió al agregado de bromuro de etidio en una concentración final de 1  $\mu$ g/ml; en forma alternativa, se utilizó la tinción comercial GelRed (Biotium, EE.UU), incubando el gel luego de la corrida electroforética en una

dilución 3:10.000 del fluoróforo durante 30 min. Las concentraciones de agarosa utilizadas variaron entre el 0,8 y el 2% según el tamaño de las moléculas de AN a resolver.

Las muestras de AN se sembraron utilizando solución de siembra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno-cianol; 30% de glicerol, en agua estéril) en proporción 6:1 (muestra de ADN: solución de siembra). Como marcadores de peso molecular se utilizaron Marcadores de ADN  $\lambda$ BstE II de 702 a 14.140 pb, Marcadores de ADN Ladder 1Kb de 1.000 a 10.000 pb o Marcadores de ADN Ladder 100 de 100 a 2.080 pb (PB-L Productos Bio-Lógicos, Argentina). Las corridas electroforéticas se realizaron a 50-90 mA en solución tampón TAE. Los geles fueron observados en transiluminador de luz UV. En caso de ser necesario los geles fueron digitalizados usando una cámara digital Kodak EKB 9040 (Kodak, EE.UU.) y alternativamente con una cámara digital Canon Power Shot A470 (Canon, Japón).

### 3.7.6 Tratamiento de ADN con bisulfito sódico

El estado de metilación de una secuencia de ADN puede ser determinada fehacientemente utilizando bisulfito de sodio. El tratamiento del ADN genómico con bisulfito de sodio modifica químicamente las citosinas (C) no metiladas, convirtiéndolas en uracilos, no afectando las C metiladas. Así, se marcan de forma fidedigna e individual el estado metilado o no metilado de los dinucleótidos CpG. El paso más crítico para la correcta determinación del patrón de metilación del ADN es la completa conversión de las C no metiladas. Esto se logra mediante la incubación del ADN en concentraciones altas de la sal de bisulfito a altas temperaturas y un bajo pH, condiciones que usualmente conllevan un alto grado de fragmentación del ADN y, subsecuentemente, a la pérdida de parte de la muestra durante la purificación.

Para realizar esta conversión en forma más estandarizada, utilizamos un *kit* comercial de alta *performance* como es el EpiTect Bisulfite Kit (59104, QIAGEN, Alemania), siguiendo las indicaciones del proveedor. Brevemente, inicialmente se procedió a la conversión de las C no metiladas del ADN mediante la solución de la sal de bisulfito, que además brinda el pH óptimo para dicho tratamiento. Se siguió el perfil térmico recomendado, el cual facilita la completa desnaturalización y conversión del

ADN. Luego, se facilitó la adsorción del ADN convertido a una columna con membrana de sílica-gel, se lavó y se trató la muestra con la solución comercial provista para la desulfuración del ADN. Posteriormente, se lavó para eliminar el agente desulfurante y se eluyó. Así, el ADN convertido y purificado se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### 3.7.7 Digestión de ADN con enzimas de restricción

En términos generales, las condiciones de corte usadas fueron las recomendadas por lo proveedores de las distintas endonucleasas de restricción. Se utilizó aproximadamente 1 U de las enzimas correspondientes en cada caso por µg de ADN plasmídico.

Para el caso de la digestión de ADN genómico con las enzimas de restricción sensibles al estado de metilación *MspI* y *HpaII* (Takara Bio Inc., Japón), 0,5 µg de ADN purificado de las líneas celulares especificadas fueron digeridos con 1 U de dichas endonucleasas a 37 °C durante 5 horas, en un volumen total de 20 µl. Las enzimas *MspI* y *HpaII* fueron inactivadas por tratamiento durante 15 mins 60 y 70 °C, respectivamente. Dicho ADN digerido se utilizó luego como molde para la amplificación con los cebadores DlgMET2 Fm y DlgMET3 R detallados a continuación en la sección 3.7.10.

Invariablemente, los resultados de los cortes con enzimas de restricción se verificaron mediante electroforesis de los productos obtenidos en geles de agarosa, estimando el tamaño de los fragmentos generados por comparación con marcadores de peso molecular adecuados. Para el caso de los vectores digeridos, los mismos fueron, además, tratados con fosfatasa alcalina para disminuir la probabilidad de religado en la reacción de ligación.

### 3.7.8 Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa

Para aislar fragmentos de ADN para su posterior clonado, las muestras de ADN digeridas con enzimas de restricción se separaron por electroforesis en geles de agarosa en las condiciones señaladas anteriormente. La zona del gel conteniendo el fragmento de ADN de interés se extrajo por corte con bisturí estéril y el ADN se purificó utilizando el equipo comercial NucleoSpin gel and PCR Clean Up (MACHEREY-NAGEL, Alemania), basado en la adsorción del ADN a membrana de sílica-gel. El sistema fue

utilizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y resuspendiendo el ADN aislado en H<sub>2</sub>O estéril.

### **3.7.9 Ligado de moléculas de ADN**

Las reacciones de ligado en las cuales se utilizó el vector pGEM®-T-Easy se llevaron a cabo según las indicaciones del manual del laboratorio comercial proveedor (Promega, EE.UU.), utilizando una relación 1:5 (vector: inserto). Las demás reacciones de ligación en las que no se utilizó este vector, se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl, utilizando 1 U de la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Promega, EE.UU.), en la solución tampón adecuada para la enzima y con las cantidades necesarias de inserto y de vector para cada caso (aproximadamente en una relación 4:1 inserto:vector). La mezcla de ligado se incubó a 4 °C durante toda la noche.

### **3.7.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

#### **Reacciones de PCR cuantitativa (qPCR)**

A partir del ADNc previamente obtenido, las reacciones de qPCR fueron llevadas a cabo en termociclador Step One™ Real-Time PCR System (Thermo Scientific, EE.UU). Para la reacción de amplificación se utilizó la mezcla comercial “Mezcla Real” (Biodynamics, Argentina). La misma posee concentraciones estandarizadas de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, ADN polimerasa y además contiene, como agente intercalante, al fluoróforo EvaGreen. Las condiciones de las reacciones de qPCR fueron: 5 min iniciales a 95 °C seguidos de 40 ciclos de: 15 seg a 95 °C, 20 seg a la Temperatura de hibridación indicada en cada caso, seguidos por 20 seg a 72 °C, tras lo cual se realiza lectura de intensidad de fluorescencia. El valor del CT (ciclo umbral) se obtuvo durante la fase exponencial de la reacción de PCR. Una vez finalizados los 40 ciclos se realizó una curva de *melting* para determinar la temperatura de fusión de los productos obtenidos durante la reacción y controlar su especificidad. Para más seguridad, los amplicones obtenidos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa, y fue confirmada la presencia de un solo producto específico del tamaño esperado.

A continuación se detallan las reacciones de qPCR realizadas y en cada caso se indica la Temperatura de hibridación utilizada, la cantidad de muestra, el volumen final

de reacción y la concentración de cebadores óptima. Tanto en el caso de los experimentos de LCM como en cultivo de líneas celulares, la amplificación de los transcritos de DLG1 se llevó a cabo con el juego de cebadores F2RTDl<sub>g</sub>PAL11 (5'-CAA<sub>g</sub>CA<sub>g</sub>CCTTA<sub>g</sub>CCCTA<sub>g</sub>TgTA-3') y R2RTDl<sub>g</sub>PAL12 (5'-CAT<sub>g</sub>AACCAATTCT<sub>g</sub>gACCTATCA-3'), ubicados en la secuencia codificante para DLG1 y diseñados sobre la unión de exones de modo de evitar la amplificación de ADN genómico. La temperatura óptima de hibridación se fijó en 60 °C y se utilizó un volumen final de 20 µl, incluyendo 8 µl de una dilución 1/10 del ADNc y 10 pmoles de cada cebador correspondiente. Se llevó a volumen con agua libre de nucleasas.

En los experimentos de LCM, para amplificar diferencialmente las dos isoformas de E6 de HPV-18 se diseñaron cebadores específicos, que se esquematizan en la Figura 4.2.3.A. Así, para la isoforma E6 *full length* (E6FL) se utilizaron los cebadores específicos E6FLFw (5'-CTgTgTATggAgACACATTggA-3') y E6FLRv (5'-TTTTCTgCTggATTCAACggT-3'). La temperatura óptima de hibridación fue 54 °C y se utilizaron 8 µl de una dilución 1/10 del ADNc, 20 pmoles del cebador sentido (Fw) y 5 pmoles del cebador antisentido (Rv), llevándose a un volumen final de 25 µl agua libre de nucleasas. Para el caso de la amplificación de E6 estrella (E6\*) se diseñaron los cebadores específicos E6StarFw (5'-TTggAACTTACAgAggTgCCT-3') y E6StarRv (5'-TTATAAgCTTTTATACTTgTgTTTTCTCTgCgTC-3'). La temperatura óptima de hibridación se estableció en 58 °C y se utilizó un volumen final de 25 µl, incluyendo 8 µl de una dilución 1/10 del ADNc y 5 pmoles de cada cebador correspondiente. Se llevó a volumen con agua libre de nucleasas.

Para poder realizar cuantificaciones relativas, se determinaron además los niveles de transcritos de genes de referencia interna. En el caso de las determinaciones en líneas celulares, se utilizó el gen de referencia Succinato deshidrogenasa (SDH), cuya reacción había sido previamente optimizado en nuestro laboratorio (Cavatorta et al., 2008). El juego de cebadores utilizados fue SDH-F (5'-gCACACCCTgTCCTTTgT-3') y SDH-R (5'-CACAgTCAgCCTCgTTCA-3'). Los juegos de cebadores fueron diseñados sobre la unión de exones de modo de no amplificar ADN genómico. La temperatura óptima de hibridación se fijó en 60 °C y se utilizó un volumen final de 20 µl, incluyendo 8 µl de una dilución 1/10 del ADNc y 10 pmoles de cada cebador correspondiente,

llevándose a volumen con agua libre de nucleasas. En el caso de los experimentos de LCM, dada la dependencia de los genes metabólicos con el grado de diferenciación del epitelio, se utilizó en cambio como gen de referencia interna al gen ribosomal 18S. Se utilizó el juego de cebadores RNA18SFw (5'-AAACggCTACCACATCCAAG-3') y RNA18SRv (5'-TTgCCCTCCAATggATCCT-3') (Lardizabal et al., 2012). La temperatura óptima de hibridación se estableció en 58 °C y se utilizó un volumen final de 20µl, incluyendo 8 µl de una dilución 1/1000 del ADNc y 5 pmoles de cada cebador correspondiente. Se llevó a volumen con agua libre de nucleasas.

El análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de los ensayos de qPCR fue realizado aplicando el test no paramétrico de Mann-Whitney para el caso de comparaciones de dos grupos independientes. En cambio, para comparaciones múltiples se utilizó en primer lugar el análisis de la variancia de un factor (ANOVA), seguido por el test de Bonferroni-Holm. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

### **Reacciones de PCR semi-cuantitativa o a tiempo final**

En todas las reacciones de amplificación a tiempo final se utilizó un termociclador Mastercycler 5333 (Eppendorf, Alemania). Subsiguientemente a reacciones de retro-transcripción, las correspondientes reacciones de PCR a tiempo final se llevaron a cabo utilizando 1µl del ADNc sintetizado, representando aproximadamente 0,1 µg de molde. Se utilizó un volumen total de 25 µl conteniendo solución tampón comercial suplementada con la cantidad óptima de MgCl<sub>2</sub> para cada reacción, 0,2 mM de cada dNTP, 10 pmoles de cebador sentido y antisentido, y 1U de ADN polimerasa Taq (Invitrogen, EE.UU.).

La amplificación de los transcriptos de E6 se llevó a cabo con cebadores específicos para los diferentes tipos de HPV. Para el caso de E6 de HPV-11 se utilizaron los cebadores HPV11BgIII (5'-TTATAgATCTATggAAAgtAAAgATgCCTCC-3') y HPV11HindIII (5'-TTATAACTTTTAgggTAACAAgTCTTCCATg-3'), diseñados previamente en nuestro laboratorio por la Dra. Florencia Facciuto en su Tesis Doctoral. Las condiciones de ciclado fueron: 5 min a 95 °C, 35 ciclos de 50 seg a 95 °C, 50 seg a 58 °C, 50 seg a 72 °C y un paso final de extensión durante 10 min a 72 °C, aplicándose

concentraciones finales de 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>. En el caso de E6 de HPV-18 se diseñó el par de cebadores específicos E6T18 Fw (5'-gCgCTTTgAggATCCAACAC-3') y E6T18 Rv (5'-ACTgTCTTgCAATATACACAggT-3'). Se utilizaron concentraciones finales de 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y se aplicó el ciclado: 5 min a 95 °C, 35 ciclos de 20 seg a 95 °C, 20 seg a 54 °C, 30 seg a 72 °C y un paso final de extensión durante 10 min a 72 °C. Se aplicaron concentraciones finales de 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>.

Para el caso de las reacciones de amplificación para determinar los transcritos de E7, también fueron diseñados cebadores tipo-específicos. De esa manera, para detectar los E7 de HPV-11, se utilizaron los cebadores E711 Fw (5'-gTggACAAACAAGcGcCACAA-3') y E711 Rv (5'-TgCCCAGCAAAAaggTCTTgTA-3'). Para E7 de HPV-18 se usaron los cebadores E718 Fw (5'-TgCATggACCTAaggCAACA-3') y E718 Rv (5'-CTCgTCgggCTggTAAATgT-3'). En ambos casos las condiciones de ciclado fueron: 5 min a 95 °C, 33 ciclos de 40 seg a 95 °C, 40 seg a 55 °C, 40 seg a 72 °C y un paso final de extensión durante 10 min a 72 °C. Se aplicaron concentraciones finales 3 mM de MgCl<sub>2</sub>.

Para el clonado de la región peptídica de PAR3 en el vector pGEX-2T, a utilizar en los ensayos de bloqueo antigénico, se diseñaron los siguientes cebadores específicos, según la secuencia reportada de ADNc correspondiente a la región antigénica: Par3pept BamHI Fw (5'-TTAT**ggATCC**ggCAAgAggCTCAACATCCAgCT-3') y Par3pept EcoRI Rv (5'-ACAT**gAATTCTCACT**ggCATTTACCCATTATCCTgCT-3'). Los sitios de restricción para *BamHI* y *EcoRI*, utilizados para el clonado direccional, se señalan en negrita. Se utilizó un volumen total de 50 µl conteniendo solución tampón comercial suplementada 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 10 pmoles de cebador sentido y antisentido, y 1U de ADN polimerasa Taq (Invitrogen, EE.UU.). El perfil térmico utilizado fue el siguiente: 5 min a 95 °C, 35 ciclos de 40 seg a 95 °C, 40 seg a 60 °C, 90 seg a 72 °C, seguido por un paso final de extensión durante 5 min a 72 °C. Como templado se utilizaron 5 ng del vector pKMyC-PAR3, conteniendo las secuencias codificantes para la proteína celular PAR3. El clonado se corroboró inicialmente a través del análisis de las colonias transformantes mediante ensayos de PCR de colonia. Para ello, se tomó una colonia directamente de la placa con un palillo estéril y, luego de

generar una réplica en una nueva placa, el resto fue resuspendido en 30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada estéril e incubada a 98 °C durante 5 min, luego se centrifugó 4 min a 13.000 g. Finalmente, 5  $\mu$ l del sobrenadante del lisado de bacterias se resuspendieron en la mezcla de reacción de PCR utilizando las mismas condiciones que para la amplificación del fragmento original correspondiente.

Por último, en la Tabla 3.2 se muestran los cebadores que fueron diseñados para el estudio del estado de metilación del promotor de *DLG1*. Dichos cebadores se esquematizan a la vez en la Figura 4.3.2. En la Tabla se detallan los diseños que permitieron amplificar las distintas ISLAS CpG del promotor mencionado, junto con la longitud de los amplificadores a que dan lugar; además, se muestran las condiciones de amplificación óptimas. En los casos de amplificación utilizando como molde ADN tratado mediante bisulfito de sodio, se utilizó el sistema comercial *Expand Long Template PCR System* (Roche, Alemania), que cuenta con una enzima Taq polimerasa de mayor procesividad. Entonces, se utilizó se fijó a 68 °C la temperatura de extensión, siguiendo lo indicado por el proveedor.

	Cebadores	Secuencia	Amplificón	Condiciones	Ciclado
ISLA 1	DlgMET2 Fm	CCTCTgAgTAgCTgTTAAggTT	522 pb	Cebadores 0.1uM; dNTPs 0.4mM; MgCl <sub>2</sub> 2mM; 2%DMSO; 1.5U Taq	5 min a 95°C; 40 ciclos de: 60 seg a 95°C, 90 seg a 60°C, 90 seg a 72°C; y 10 min a 72°C.
	DlgMET3 R	gggCagAgAAggTTTgTTCA			
	DlgMET3modF	gTgggTAgTgATTTggAAAg	249 pb	Cebadores 0.1uM; dNTPs 0.4mM; MgCl <sub>2</sub> 1.5mM; 2% DMSO y Taq 1.5U	5 min a 95°C seguidos de 40 ciclos de: 60 seg a 95°C, 90 seg a 53°C, 90 seg a 68°C; y 10 min a 68°C.
	DlgMET2 R	CATTCATTTCCCTCAAACCT			
ISLA 2	DlgMET4mod F	AgTTTggAgTggAAggTAATg	340 pb	Cebadores 0.1uM; dNTPs 0.4mM; MgCl <sub>2</sub> 1.5mM; 2% DMSO y Taq 1.5U	5 min a 95°C seguidos de 40 ciclos de: 60 seg a 95°C, 75 seg a 54°C, 75 seg a 68°C; y 10 min a 68°C.
	DlgMET4mod R	gTgggTTAgggTAAggTAAAgg			
ISLA 3	DlgMET6mod F	ggggAgTTgTTTTgAgTTTg	342 pb	Cebadores 0.1uM; dNTPs 0.4mM; MgCl <sub>2</sub> 1.5mM; 2% DMSO y Taq 1.5U	5 min a 95°C seguidos de 40 ciclos de: 60 seg a 95°C, 90 seg a 53°C, 90 seg a 68°C; y 10 min a 68°C.
	DlgMET R'	AAgTATCCACACTCCCCACCT			

**Tabla 3.2:** Cebadores para el estudio del estado de metilación del promotor de *DLG1*.

### 3.7.11 Secuenciación

Las construcciones derivadas de PCR fueron confirmadas por secuenciación del ADN. Así, los vectores de expresión correspondientes fueron purificados y enviados a secuenciar. De la misma forma, los productos de amplificación resultantes del estudio del estado de metilación del promotor de *DLG1* fueron purificados y enviados también al servicio de secuenciación de la Universidad de Maine (EE.UU.).

## 3.8 Cultivos organotípicos raft

### 3.8.1 Infecciones y selección de queratinocitos infectados

Para el desarrollo de los cultivos organotípicos *raft* se utilizaron PHK en número bajo de pasajes. Los PHK fueron infectados con virus recombinantes siguiendo la técnica detallada por Chow y colaboradores (Cheng et al., 1995). Brevemente, las células se crecieron en placas de 100mm de diámetro y, al alcanzar una confluencia del 70%, dichos PHK fueron infectados con los retrovirus recombinantes correspondientes (codificando las proteínas de HPV) mediante incubación con 5 ml de medio sobrenadante de las células Am12 productoras retrovirales. Esta metodología de infección de queratinocitos a partir del sobrenadante de células productoras retrovirales (Am12) (Markowitz et al., 1988) tiene asociada una alta efectividad de infección (Cheng et al., 1995). Además, se agregó el polímero Polibreno (Millipore, Germany), en concentración final de 10 µg/ml, con el fin de disminuir las repulsiones electrostáticas y aumentar la efectividad de infección. A los 45 min, se agregaron 5 ml de KSFM, de manera de disminuir la concentración de los factores de crecimiento presentes en el suero, que podrían favorecer una diferenciación anticipada. A las 4 hs de la infección inicial, se removió todo el medio de cultivo, reemplazándose por KSFM.

A las 24 hs se comenzó con la selección de los queratinocitos efectivamente infectados, para lo cual se suplementó el medio de cultivo con el antibiótico que correspondía según la resistencia codificada por cada vector retroviral. Según correspondiera se utilizó Puromicina en una concentración de 2 µg/ml o Geneticina en una concentración final de 400 µg/ml. Al cabo de 48 hs, tiempo al cual se observó la muerte del 100% de los cultivos control no infectados, los queratinocitos ya

seleccionados se crecieron en KSFM sin antibióticos hasta alcanzar el número de células requerido para realizar los cultivos organotípicos.

Los vectores utilizados se detallan en la Tabla 3.1. Para el caso de los vectores retrovirales recombinantes conteniendo los genes de E7 y E6/E7 de HPV-11, los mismos fueron provistos por Dennis J. McCance y ampliamente descritos (Guess and McCance, 2005). Los vectores retrovirales recombinantes conteniendo las secuencias de HPV-18 LCR-E7 y -E6/E7 también se describieron previamente (Boccardo et al., 2004; Cheng et al., 1995). Estos vectores expresan el gen de resistencia dirigido por el SV40p, mientras que los genes de HPV están bajo el control de las regiones regulatorias y promotor nativo de HPV (LCR).

### 3.8.2 Desarrollo de los cultivos organotípicos *raft*

Para el desarrollo de los cultivos *raft* se siguió la metodología reportada (Boccardo et al., 2010). Brevemente, se preparó una solución de medio de cultivo F12 (GIBCO, EE.UU) y colágeno tipo I comercial derivado de cola de ratón (BD Biosciences, EE.UU.), a pH adecuado, SFB (GIBCO, EE.UU.) al 10% y células derivadas de fibroblastos de ratón 3T3 en una concentración de  $2,5 \cdot 10^5$  células/ml. Esta suspensión celular se dispuso en placas de cultivo de 24 pocillos, de manera de generar componentes que asemejasen la dermis en los cultivos *raft* a desarrollar posteriormente. Una vez solidificada esta preparación, se sembraron sobre ella los queratinocitos (ya infectados y seleccionados por resistencia a antibióticos) en número aproximado de  $2 \cdot 10^5$  por cultivo utilizando para ello 1:2 de KSFM y 1:2 de RCM. Al día siguiente, cada cultivo se levantó y se montó sobre una malla metálica y se colocó en placas de cultivo de 60 mm de diámetro, suplementándose con RCM de manera de que el cultivo se mantuviera en la interfase medio de cultivo-aire (Figura 4.1.2). Los *raft* se cultivaron por períodos de 9 a 11 días y renovando el medio de cultivo cada 48 hs.

En el caso de los cultivos organotípicos desarrollados a partir de la línea celular FK18B, que contiene el genoma completo de HPV-18, fueron establecidos como fue descrito previamente por Pinheiro y col. (Pinheiro et al., 2014). Brevemente, los PHK fueron transfectados con el genoma completo de HPV-18, dando lugar a las células denominadas FK18B, que fueron crecidas durante diferentes números de pasajes, para

luego ser cosechadas y utilizadas en la generación de los cultivos *raft* correspondientes. Estos cultivos fueron provistos por nuestra colaboradora Dra. Renske Steenbergen (Steenbergen et al., 1998).

### 3.8.3 Procesamiento de los cultivos *raft* obtenidos

Los cultivos *raft* destinados al análisis por técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) fueron incluidos en piezas de parafina. En los casos destinados a análisis por LCM, la fijación previa se realizó en solución de etanol y en condiciones libres de RNAsas. En forma alternativa, se realizaron extractos proteicos mediante procesamiento de los cultivos en maceradores y utilizando una solución de lisis tipo para extracción de proteínas solubles totales (Boccardo et al., 2004). Por último, algunos cultivos fueron procesados por macerador en solución Trizol (Invitrogen, EE.UU.) y se procedió a la extracción del ARN total siguiendo las indicaciones del proveedor de la mencionada solución comercial.

## 3.9 Técnicas concernientes a la manipulación de proteínas

### 3.9.1 Preparación de los extractos proteicos

Las células adheridas a la superficie de las placas se lavaron con PBS frío y se incubaron durante 10 min en hielo con la solución de lisis fría (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP40, 0.5% deoxicolato), conteniendo una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (*Halt Protease Inhibitor single use cocktail*, Thermo Scientific, Pierce, EE.UU.). Las células fueron despegadas, y los extractos celulares recolectados en tubos se centrifugaron por 2 min a 13000 g, tomándose el sobrenadante. En el caso de los cultivos organotípicos, se realizaron extractos proteicos mediante procesamiento de los cultivos en maceradores y utilizando una solución de lisis tipo para extracción de proteínas solubles totales (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1mM EDTA, 0.5% NP40) con inhibidores de proteasas (Boccardo et al., 2004). Las muestras conteniendo los extractos proteicos fueron conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 3.9.2 Cuantificación de extractos proteicos

La concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinonínico (Sigma Aldrich, EE.UU.). A 5 µl de muestra se agregaron 200 µl de reactivo conteniendo CuSO<sub>4</sub> y solución de ácido bicinonínico en una proporción 1:50 en volumen. Se incubó a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se midió absorbancia a 630 nm en un lector de microplacas Dynatech Laboratories (EE.UU.) modelo MRX. Como testigo se utilizó una curva de albúmina sérica bovina.

### 3.9.3 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras proteicas se analizaron mediante SDS-PAGE. Antes de la siembra las muestras se calentaron 5 min a 95°C en solución de siembra de concentraciones finales de 75 mM Tris-HCl (pH= 6,8), 5% (V/V) β-mercaptoetanol, 10% (V/V) glicerol, 2% (P/V) SDS, y 0,002% (P/V) azul de bromofenol. Las corridas electroforéticas se realizaron en una solución reguladora 3 g/l Tris-base, 14,4 g/l glicina, y 0,1% (P/V) SDS, a una intensidad de corriente constante de 30 a 40 mA. La concentración de acrilamida:bisacrilamida (29:1) utilizada en los geles de separación varió entre 8-12 % (P/V) según el tamaño de la proteína a separar. Además, se incluyó siempre un gel de concentración de un porcentaje de acrilamida:bisacrilamida (29:1) del 5% (P/V).

### 3.9.4 Electrotransferencia de proteínas a membranas (Western Blot) e inmunodetecciones

Los experimentos de Western Blot (WB) se llevaron a cabo como fuera previamente descrito (Gardiol et al., 1999), siguiendo la técnica descrita por Towbin (Towbin et al., 1979). Así, una vez finalizada la corrida electroforética, el gel de poliacrilamida y la membrana fueron colocados en el dispositivo de transferencia. En los experimentos a partir de extractos de líneas celulares se utilizó membrana de nitrocelulosa (RPN303D, Hybond ECL, GE, EE.UU.). En los experimentos realizados a partir de extractos de cultivos organotípicos se utilizó membrana de PVDF (10600023, Hybond ECL, GE, EE.UU.), con previa hidratación de la membrana en metanol y equilibrándose en solución de transferencia, compuesta por 3,02 g/l de Tris-base; 14,4 g/l

de glicina y 20% metanol. La electrotransferencia se realizó durante 4 h a 250 mA y la correcta transferencia de las proteínas a la membrana se determinó por tinción con el colorante Rojo Ponceau. Luego, para bloquear posibles reacciones inespecíficas, la membrana fue preincubada en una solución conteniendo 10% de leche descremada en PBS, durante 45 min a temperatura ambiente y con agitación. A continuación se realizó una incubación a temperatura ambiente por 16 hs, con una dilución adecuada del anticuerpo primario en PBS/leche al 10%.

En este trabajo fueron utilizados los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal anti-DLG1 producido en ratón (2D11, Santa Cruz, EE.UU., dilución 1:200); anticuerpo policlonal anti-PAR3 producido en conejo (07-330, Millipore, Alemania, dilución 1:500); anticuerpo monoclonal anti-p53 producido en ratón (DO-1, Santa Cruz, EE.UU., dilución 1:500); anticuerpo policlonal anti-Rb producido en conejo (M-153, Santa Cruz, EE.UU., dilución 1:100); anticuerpo policlonal anti-Ciclina E (M-20, Santa Cruz, EE.UU., dilución 1:200); anticuerpo monoclonal anti-E6, dirigido contra una región amino terminal de E6 por lo que es capaz de reconocer ambas isoformas de E6 (399, Arbor Vita Corporation, EE.UU., dilución 1:500); por último, para la detección como control de siembra de  $\gamma$ -tubulina se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti- $\gamma$ -tubulina humana (T6557, Sigma Aldrich, EE.UU., dilución 1:5.000).

Finalizada la incubación con el correspondiente anticuerpo primario, se lavó la membrana con 1% de Tween 20 en PBS, efectuando 3 lavados cortos y luego otros 3 lavados de 10 min cada uno y en agitación. Posteriormente, se realizó la incubación con una dilución del anticuerpo secundario adecuado en 10% leche y 1% Tween 20 en PBS, durante 2 hs a temperatura ambiente. Según correspondiera, se utilizaron los anticuerpos secundarios conjugados a HPR anti-IgG de ratón (NXA931, Amersham GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido, dilución 1:750-1:1000.) o anti-IgG de conejo (NA934, Amersham GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido, dilución 1:500-1:750). Finalmente, después de 4 lavados con PBS/Tween 20 y uno con PBS, la membrana se incubó durante 5 minutos con la reacción de revelado para peroxidasa del equipo de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate reagent (Thermo Scientific, Pierce, EE.UU.). Se realizó la exposición de la membrana a

temperatura ambiente durante tiempos variables y la señal quimioluminescente se tomó con placas radiográficas (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido).

### **3.9.5 Análisis digital de imágenes y análisis estadístico**

En los casos en los cuales se procedió a cuantificar las proteínas detectadas mediante WB, dicha cuantificación se realizó con el programa MacBiophotonics ImageJ1.43m software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EE.UU.). Para ello, se llevó a cabo la densitometría de las bandas obtenidas.

El análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de la cuantificación de la expresión proteica fue realizado aplicando en primer lugar el análisis de la variancia de un factor (ANOVA), seguido por el test de Bonferroni-Holm para comparaciones múltiples. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

### **3.9.6 Análisis del efecto de proteínas de HPV en la actividad transcripcional del promotor de DLG1 por ensayos de luciferasa**

Los ensayos de actividad luciferasa se realizaron siguiendo la metodología reportada (Cavatorta et al., 2008). Brevemente, se utilizó el vector reportero LUC-790, conteniendo un fragmento de la región promotora de DLG1 clonada corriente arriba del gen de la luciferasa de luciérnaga (LUC) sin su promotor. Este vector permite monitorear la actividad transcripcional de la secuencia insertada, y por lo tanto también la forma en que dicha actividad se ve afectada por la presencia de distintos factores.

En cada caso,  $1,5 \cdot 10^5$  células de la línea celular HEK293 fueron transfectadas de manera transitoria con el mencionado vector reportero LUC-790 (0,4  $\mu\text{g}$ ) junto con pcDNA3 (condición control) o con los vectores de expresión de las proteínas de HPV indicadas (1,2  $\mu\text{g}$ , serie de vectores pcDNA3). Las células fueron a su vez cotransfectadas con un plásmido que codifica para la enzima Renilla luciferasa como control interno (0,004  $\mu\text{g}$ ). A las 36 hs post-transfección se ensayó la actividad LUC en los lisados de las células transfectadas. Dichos lisados se obtuvieron a partir de la solución de lisis provista en el equipo comercial utilizado, Firefly & Renilla Luciferase Assay Kit (Biotium, EE.UU.). La reacción de luz se midió utilizando el luminómetro Glomax 20/20 (Promega, EEUU).

Para normalizar en relación a la eficiencia de transfección de diferentes constructos y en diferentes ensayos, los valores de LUC obtenidos se expresaron respecto al valor de la actividad Renilla en el mismo lisado. La actividad promotora así calculada fue comparada con la actividad reportada por lisados provenientes de células transfectadas con el vector pGL3 sin inserto (0,4 µg) (control negativo). A su vez, los valores de actividad promotora se expresaron respecto al valor correspondiente a la condición control (células transfectadas con el vector LUC-790 y pcDNA3), siendo ésta la actividad promotora basal. De esta manera, los valores se expresaron en función de dicho valor como Actividad Promotora Relativa, representando el incremento de actividad (n veces) sobre el valor obtenido únicamente para el promotor. Todos los experimentos fueron llevados a cabo al menos por triplicado.

Para analizar la significancia estadística de los datos resultantes de los ensayos de actividad luciferasa descriptos se aplicó en primer lugar el análisis de la variancia de un factor (ANOVA). A continuación se procedió a realizar pruebas de comparación múltiple, para lo cual se aplicó el método de Bonferroni-Holm, realizando comparaciones de a pares en forma relativa al control. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

### **3.9.7 Ensayos de Inmunohistoquímica (IHQ)**

En el caso de los cultivos organotípicos raft a ser analizados por IHQ, los mismos fueron fijados en solución de formalina, embebidos en parafina, cortados en secciones de 3 µm y montados en porta objetos. En cambio, los cortes histológicos derivados de biopsias fijadas con formaldehído e incluidas en parafina, fueron cedidos por la Dra. Analía Nocito de la Cátedra de Anatomía y Fisiología Patológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Rosario. Estos últimos fueron cortados en secciones de 5 µm y montados en porta objetos. La utilización de dichas muestras se sometió previamente a la evaluación por el correspondiente Comité de Bioética de nuestra Facultad, y habiendo tenido lugar su aprobación mediante la Resolución 339 del año 2012.

En todos los casos, los ensayos de IHQ se realizaron acorde a lo realizado previamente en nuestro laboratorio (Cavatorta et al., 2004). Brevemente, las muestras

fueron desparafinadas por tratamiento por 16 min en xileno. A ello siguió una hidratación de los cortes por serie de alcoholes, siendo los cortes sometidos a 4 min de etanol absoluto, seguidos de 4 min de etanol al 96% y finalmente 4 min de etanol 70%. Posteriormente, se realizó un tratamiento en solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30V al 3% en metanol, durante 20 min, para consumir la peroxidasa endógena. Los cortes se lavaron con H<sub>2</sub>O destilada, y luego se sumergieron en solución tampón adecuada. Para el caso de los cultivos *raft*, la solución de elección fue Tris-EDTA (Tris 10mM pH 9; EDTA 1 mM pH 8,3), mientras que para las biopsias cervicales se utilizó Citrato 0.1M de pH 6. Para inducir la exposición antigénica, los cortes se colocaron en horno microondas a máxima potencia por un tiempo total de 12 min, se dejaron enfriar por 30 min y luego se lavaron con H<sub>2</sub>O destilada y se sumergieron en PBS durante unos minutos. Se bloqueó usando SFB en una dilución 1:20 en PBS, incubando en cámara húmeda por 45 min.

A continuación se agregó en cada caso el anticuerpo primario indicado en diluciones adecuadas en PBS y se incubó durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Se utilizaron para ensayos de IHQ los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal anti-DLG1 producido en ratón (2D11, Santa Cruz, EE.UU., dilución 1:40); anticuerpo policlonal anti-PAR3 producido en conejo (07-330, Millipore, Alemania, dilución 1:750); anticuerpo monoclonal anti-p53 producido en ratón (DO-1, Santa Cruz, EE.UU., dilución 1:50); anticuerpo policlonal anti-Rb producido en conejo (M-153, Santa Cruz, EE.UU., dilución 1:200); anticuerpo monoclonal producido en ratón anti-Ciclina A (NCL-cyclin A, Novocastra, Leica Biosystems, Alemania, dilución 1:25); anticuerpo monoclonal producido en ratón anti-PCNA (18-0110, Zymed, Thermo Scientific, EE.UU., dilución 1:25).

Finalizada la incubación con el correspondiente anticuerpo primario, se procedió a lavar por incubación con PBS por 5 min. Posteriormente, se llevaron a cabo las incubaciones sucesivas de 30 min cada una en cámara húmeda a temperatura ambiente, con anticuerpo secundario biotinilado y reactivo ABC (avidina-biotina-peroxidasa) (DAKO, Dinamarca). La reacción se reveló utilizando el equipo de sustrato cromogénico DAB para peroxidasa (Vector, EE.UU.). Se lavó con H<sub>2</sub>O destilada y se realizó la contraincubación con hematoxilina. Se lavó con H<sub>2</sub>O destilada y se deshidrató con alcoholes incubando sucesivamente durante 2 min con etanol al 70%, etanol al 96% y etanol al

100%, seguida de una incubación final por 4 min con xileno. Las secciones fueron montadas usando bálsamo de Canadá según métodos convencionales. La expresión de la proteína de interés en cada caso se evidenció por el desarrollo de color marrón. Los cortes se observaron y fotografiaron mediante un Microscopio Zeiss Primo Star (Zeiss, Alemania). En todos los casos se incluyó, a modo de control negativo, una muestra que se procesó de igual modo al detallado, salvo que se omitió la incubación con anticuerpo primario alguno.

Además, para evaluar la especificidad de la reacción de inmunotinción para PAR3, que no había sido utilizada previamente en nuestro laboratorio, se realizaron ensayos de bloqueo antigénico. En estos casos, el anticuerpo primario fue preincubado con la proteína purificada unida a la resina de agarosa (proteína específica GST-PAR3pept o control GST según correspondía). En base a la electroforesis en geles de poliacrilamida y su tinción por Azul de Coomasie, se estimó la cantidad de proteína purificada en cada caso comparando con las bandas obtenidas a partir de la corrida electroforética de una escala conteniendo cantidades crecientes y conocidas de la proteína BSA (albúmina sérica bovina). De esta manera, se incubó al anticuerpo anti-PAR3 en una solución con una cantidad de proteína igual a la masa de anticuerpo (conociendo que el anticuerpo comercial utilizado tenía una concentración de 1 µg/µl). La incubación se realizó a temperatura ambiente y en agitación durante 1 h, luego de lo cual se continuó con el protocolo como se detalló anteriormente.

### **3.9.8 Expresión y purificación de proteínas transgénicas en *E. coli* como producto de fusión con la proteína GST**

Para la obtención la péptido PAR3pept fusionado a GST, se utilizó el vector de expresión pGEX-2T, el cual al contener un promotor tac inducible por IPTG, permite la expresión de proteínas fusionadas a la proteína GST y la posterior purificación utilizando cromatografía de afinidad de glutatión-agarosa (MACHEREY-NAGEL, Alemania).

Una vez obtenido el vector pGEX2T-PAR3pept, y contando con el vector vacío como control, se optimizó la expresión de proteínas en volúmenes pequeños, de 3 ml de cultivo, probando distintas condiciones de crecimiento y de inducción adecuadas. Con

este fin, las células de *E. coli* transformadas en cada caso con los vectores de expresión de las proteínas GST (control) o GSTPAR3pept fueron crecidas, inducidas mediante el agregado de IPTG en concentraciones en el rango de 0,5-1,5 mM y cosechadas por centrifugación. Luego se obtuvo el lisado correspondiente disolviendo el *pellet* celular en volúmenes apropiados de solución de siembra 2X (125mM Tris/HCl pH=6,8; 20% glicerol; 4% SDS; 0,004% Azul de bromofenol; 10% β-mercapto etanol), calentando a 95°C durante 5 min y conservando a -20 °C hasta su uso. Estos extractos se resolvieron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, detectándose las proteínas de interés por tinción con Coomassie Brilliant Blue (Sambrook, 1989).

Con la optimización realizada usando el cultivo en pequeña escala, descrito anteriormente, se planificó la estrategia para el desarrollo del cultivo y purificación de las proteínas a gran escala. Se transformaron células de *E. coli* DH5α con los plásmidos pGEX-2T y pGEX2T-PAR3pept (Tabla 3.1). Las colonias transformantes fueron crecidas toda la noche a 37 °C con agitación en medio LB líquido con Amp, de manera de lograr un cultivo en fase estacionaria. Se realizó una dilución 1:50 del este cultivo en 200 ml de medio fresco suplementado con Amp y se creció hasta alcanzar la fase exponencial (DO<sub>595</sub> de 0,6) durante aproximadamente 2 hs. A continuación se indujo la expresión de las proteínas mediante la adición de IPTG en una concentración final de 1,5 mM, y se continuó el crecimiento por 3 hs a 30 °C. Los cultivos se centrifugaron 10 min a 4500 g en una centrífuga Avanti TM J-25 (Beckman Coulter, EE.UU.). Las células cosechadas fueron conservadas a -70 °C.

Al día siguiente se realizó la lisis celular mediante el uso de un sonicador. Las células fueron resuspendidas en solución de ruptura PBS 1,5% Tritón, ditiotretitol (DTT) 5 mM y conteniendo una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Halt Protease Inhibitor single use cocktail, Thermo Scientific, Pierce, EE.UU.). Dichas suspensiones fueron sometidas a 5 pulsos de ultrasonido de 10 s a 30 mA de potencia en un Ultrasonicador GEX 600, con intervalos de enfriamiento de 10 s. El lisado celular se centrifugó por 10 min a 7500 rpm a 4 °C en una centrífuga HERMLE Labnet Z323K (rotor 220.78 VO2). Las proteínas de interés presentes en el sobrenadante se purificaron por interacción con 700 µl de una suspensión de la resina de glutatión agarosa (G4510, Sigma Aldrich, EE.UU) equilibrada con PBS, por un período 1 h en frío y con agitación. Se

realizaron 3 lavados de la resina con solución PBS/Tritón 1,5 % y 3 lavados con PBS, incubando en agitación y en frío de 5 a 10 min cada vez.

Por último, para evaluar la purificación y estimar la concentración proteica, las muestras se resolvieron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Las proteínas fueron detectadas mediante tinción con Coomassie Blue (Sambrook, 1989), comparando con la escala de cantidades crecientes de BSA.

## **4. RESULTADOS**



### **4.1 CAPÍTULO 1: Análisis de la expresión de proteínas de polaridad celular, blancos de HPV, en presencia de las proteínas virales**

#### **4.1.1 Implicancia de proteínas de HPV en la regulación de la expresión de DLG1**

Como se comentó anteriormente en la sección Introducción, la distribución y los niveles de la proteína DLG1 en biopsias cervicales varían según la severidad de la lesión, hallándose una marcada disminución en los estadios más avanzados de la progresión maligna (Figura 1.10, Introducción) (Cavatorta et al., 2004; Watson et al., 2002). A su vez, ha sido previamente reportado que la expresión de las proteínas de HPV también se ve modificada durante la evolución de las lesiones asociadas a infecciones por dicho virus. En efecto, estudios de *microarrays* realizados por otros investigadores sugieren que los niveles transcripcionales de DLG1 podrían variar por la expresión diferencial de proteínas de HPV; sin embargo, no se ha determinado cuál de ellas podría ser responsable de estos cambios en la expresión de DLG1 (Doorbar et al., 2015).

Por lo tanto, y de acuerdo a lo expresado en la sección Objetivos, nos abocamos a analizar la posible contribución de las proteínas de HPV en las variaciones de la expresión de la proteína celular DLG1.

##### **4.1.1.1 Estudio de la incidencia de proteínas virales tempranas sobre la actividad promotora de DLG1**

En primer lugar propusimos analizar el efecto de distintas proteínas de HPV tempranas sobre la actividad promotora de *DLG1*. Particularmente, analizamos el efecto de las proteínas requeridas para la replicación viral *in vivo*: E5, E6 y E7. Para ello realizamos ensayos de la actividad reportera luciferasa, siguiendo el protocolo detallado en la sección 3.9.6 de Materiales y métodos. Brevemente, para realizar dichos ensayos de la actividad del promotor de *DLG1* utilizamos el vector LUC-790 (Tabla 3.1, sección 3.1 Materiales y métodos), conteniendo la región promotora de *DLG1* clonada corriente

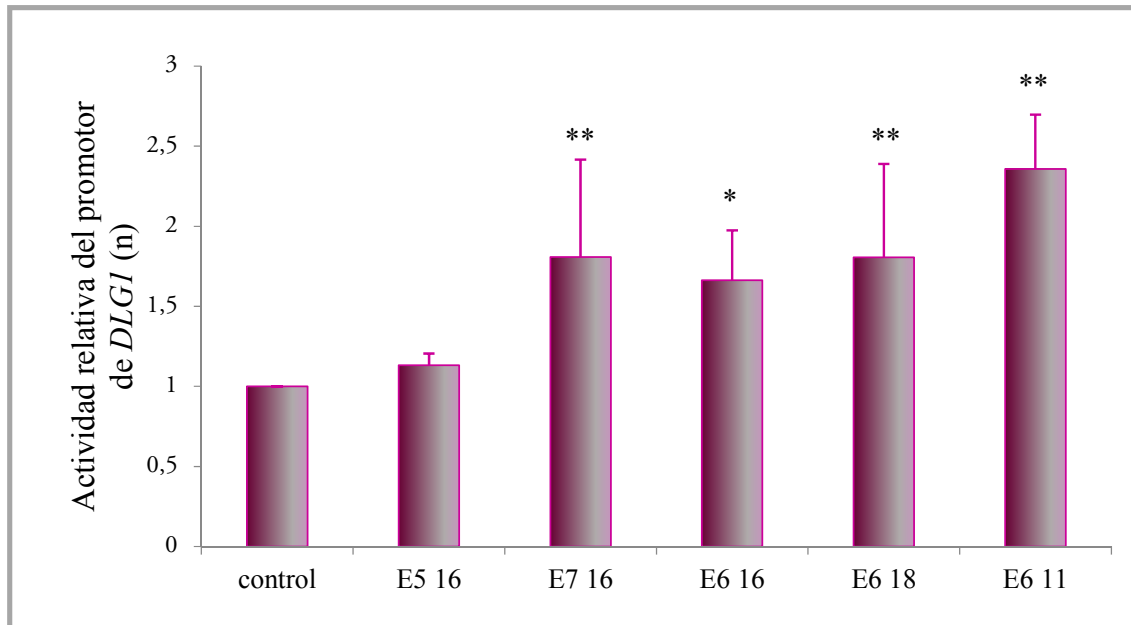
arriba del gen reportero de luciferasa (pGL3), el cual fue desarrollado previamente en nuestro laboratorio (Cavatorta et al., 2008). Células de la línea epitelial HEK293 fueron transfectadas con el vector LUC-790. A su vez, en cada caso se cotransfectó con el vector de expresión vacío (pcDNA-3, condición control) o con alguno de los vectores de expresión de las correspondientes proteínas de HPV, según se indica en la Figura 4.1.1. Las células fueron también cotransfectadas con el vector pRL-TK que codifica para la enzima Renilla luciferasa, utilizada como control interno de la eficiencia de transfección. Como se detalló en la sección Materiales y métodos, a las 36 hs post-transfección se ensayó la actividad luciferasa (LUC), que señala actividad promotora, en los lisados de las células transfectadas.

En todos los ensayos se corrigieron los valores de LUC considerando el valor del control interno (Renilla) y se corroboró la ausencia de luminiscencia significativa en el caso del control negativo (pGL3 vacío, sin inserto de región promotora). A su vez, todos los valores de actividad promotora se expresaron de manera relativa a la actividad arrojada por la condición control (co-transfección con vector de expresión vacío). De esta manera, se indicaron valores de Actividad Promotora de *DLG1* Relativa que representan el incremento de actividad (n veces) sobre el valor obtenido para el promotor de *DLG1* (“control”) en ausencia de factores virales.

Como puede observarse en la Figura 4.1.1, la presencia de la proteína E5 de HPV-16 (E5 16) no tuvo efectos significativos sobre la actividad promotora de *DLG1*. En cambio, ante la presencia de las proteínas E7 de HPV-16 (E7 16) como de las proteínas E6 de HPV-16, 18 y 11 (E6 16, E6 18 y E6 11, respectivamente) se evidenció un aumento significativo en la mencionada actividad. Los resultados presentados sugieren un efecto activador del promotor de *DLG1* por parte de proteínas E7 y E6, tanto de HPV de alto como de bajo riesgo oncogénico. Además, en los casos de proteínas E7 y E6 ensayados, se observó una activación promotora de *DLG1* que superó un 50% de incremento, siendo estas inducciones estadísticamente significativas.

Por lo tanto, los resultados obtenidos indican una probable contribución de las proteínas virales E6 y E7 a la regulación de *DLG1*. A partir de estos hallazgos nos propusimos profundizar estos estudios y siempre con el objetivo de comprender los

cambios observados en la expresión de DLG1 durante la evolución de las lesiones asociadas a HPV (Figura 1.10, Introducción) (Cavatorta et al., 2004; Watson et al., 2002).



**Figura 4.1.1: Efecto de proteínas virales tempranas sobre la actividad promotora de DLG1.** El vector reportero LUC-790 (0,4 µg) fue transfectado en células HEK293 con el vector pcDNA3 vacío (control) o con cada uno de los vectores de expresión de las proteínas virales indicadas (1,2 µg). Los valores de actividad luciferasa fueron normalizados en relación al control interno Renilla (0,004 µg), midiendo así la eficiencia de transfección en cada caso, y en relación a la actividad del control negativo (0,4 µg) vector pGL3 sin inserto del promotor. Los resultados corresponden al promedio de al menos tres experimentos independientes. Se indican con asteriscos las diferencias significativas en la actividad promotora de DLG1 en presencia de las correspondientes proteínas virales (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

#### 4.1.1.2 Estudio de la expresión de la proteína de polaridad celular DLG1 en presencia de proteínas de HPV en cultivos organotípicos

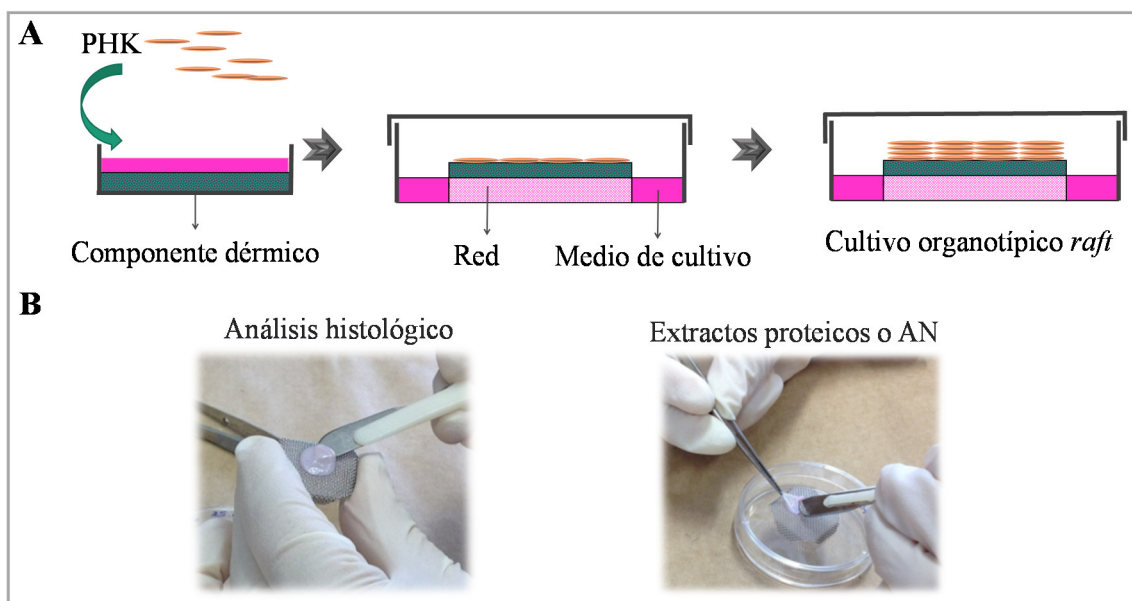
##### 4.1.1.2.1 Optimización y desarrollo de cultivos organotípicos raft; validación de los cultivos obtenidos

Como se comentó en la sección 1.2.3 de la Introducción, los cultivos organotípicos *raft* constituyen herramientas muy útiles en el estudio de los procesos de infección de virus epiteliotrópicos. Particularmente, los HPV infectan las capas basales de epitelios estratificados, siendo dichos epitelios fielmente reproducidos por los cultivos *raft* mencionados. Es por ello que los mismos son muy utilizados para estudiar los mecanismos moleculares implicados en las infecciones virales.

Por lo tanto, nos propusimos continuar con el análisis de la regulación de la proteína celular DLG1 en un contexto que asemejase *in vitro*, lo que ocurre durante una infección natural por HPV. En este punto, es de suma importancia destacar que las proteínas de HPV se expresan en forma diferencial en los distintos estratos que conforman el epitelio y de acuerdo al grado de diferenciación de las células que los componen (Doorbar, 2006; Meyers and Laimins, 1994). Consecuentemente, el desarrollo de cultivos que permitieran la expresión de las proteínas virales en el contexto de un epitelio estratificado, nos resultó de gran relevancia para el estudio de la interferencia de las mismas en la expresión de proteínas celulares.

Por lo tanto, continuamos el estudio de la contribución de las proteínas virales sobre la expresión de proteínas de polaridad, y particularmente de DLG1, en el contexto de cultivos organotípicos *raft*. En el desarrollo de dichos tejidos, las células epiteliales se cultivan permitiendo que las mismas proliferen y se diferencien, ordenándose en forma estratificada, en forma similar a los tejidos epiteliales escamosos (Andrei et al., 2010). En este sentido, en el marco de una beca Oster de perfeccionamiento que me fue otorgada por la Fundación Bunge & Born, pude adquirir la experiencia necesaria para desarrollar esta metodología. Para ello, realicé una residencia de investigación en el laboratorio de Oncovirología, Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional de Sao Paulo, Brasil, con nuestro actual colaborador, el Dr. Enrique Boccardo.

Así, nos abocamos a generar los mencionados cultivos organotípicos siguiendo la metodología reportada (Boccardo et al., 2010; Boccardo et al., 2004), y según se detalla en la sección 3.8 de Materiales y métodos. Brevemente, en primer lugar para generar los *raft* se estableció un equivalente dérmico, incorporándose a una solución comercial de colágeno tipo I células derivadas de fibroblastos de ratón 3T3, las cuales son capaces de promover la diferenciación terminal de los queratinocitos humanos primarios indiferenciados (PHK) (Wilson et al., 1992). Una vez solidificado este componente, sobre el mismo se sembraron células comerciales PHK de prepucio de bajos pasajes. Los cultivos así obtenidos se dejaron crecer en la interfase entre el medio nutriente y el aire para permitir su proliferación y correcta diferenciación. Para ello, fueron colocados sobre grillas y dispuestos en la mencionada interfase por aproximadamente 9 días, efectuando cambios regulares del medio (Figura 4.1.2).



**Figura 4.1.2: Desarrollo de cultivos organotípicos.** **A)** Esquema de los pasos para generar cultivos *raft*. Sobre una base constituida por fibroblastos y colágeno tipo I (componente dérmico) se sembraron los PHK. Una vez adheridos, esta estructura se montó sobre membranas de teflón (grilla), permitiendo a los queratinocitos proliferar en la interfase aire-medio de cultivo. Tras 9-11 días, se obtuvo el epitelio estratificado característico. **B)** Se muestran los cultivos obtenidos, los cuales fueron incluidos en parafina para el análisis histológico o fueron procesados para la extracción en fresco de AN o proteínas.

A continuación, una sección de cada uno de los cultivos organotípicos incluidos en parafina se tiñó con hematoxilina-eosina (HE), con el fin de analizar la morfología de los tejidos generados. Como puede apreciarse en la Figura 4.1.3 (control), al analizar los cultivos *raft* resultantes se observa que se logró reproducir un epitelio normal, con sus capas celulares características (basal, escamosa, granular y córnea), detalladas en la sección 1.2.2 de la Introducción.

Como fuera descripto, mucho resta conocer sobre la real contribución de las proteínas de HPV a los cambios en la expresión de DLG1, y particularmente en el contexto de epitelios escamosos. Por lo tanto, a continuación nos abocamos a la obtención de cultivos *raft* que expresaran las proteínas virales E6 y E7. Nos focalizamos en el HPV-18, de alto riesgo oncogénico, dado que había sido demostrado que DLG1 es un blanco preferencial para dicho tipo viral (Pim et al., 2012). Asimismo, utilizando células en cultivo, el HPV-18 resultó ser el tipo de HPV más agresivo en modelos de transformación *in vitro* (Lace et al., 2009); a la vez que varios reportes indicaron previamente un comportamiento clínico más agresivo y con peor pronóstico para

tumores positivos para HPV-18, con respecto al HPV-16 (Walker et al., 1989; Zhang et al., 1995). A su vez, desarrollamos también, cultivos organotípicos expresando proteínas del HPV-11, de bajo riesgo oncogénico, con el fin de comparar los resultados entre ambos tipos virales.

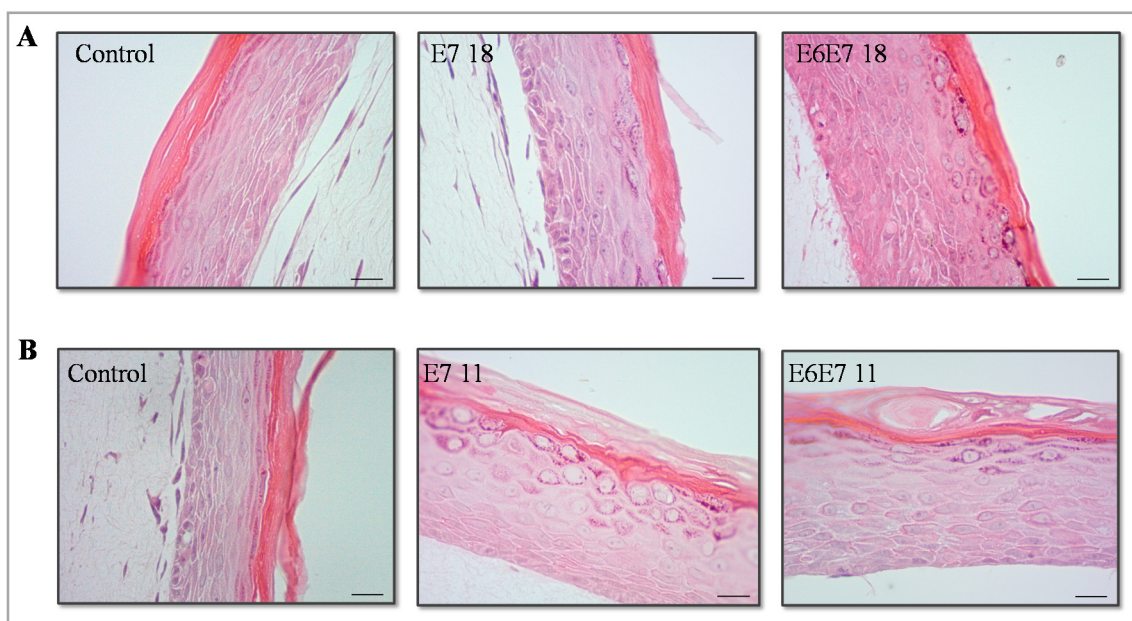
Como se profundizó en la sección 1.2.5 de la Introducción, numerosos reportes indagan sobre las actividades oncogénicas de E6 de HPV de alto riesgo oncogénico en lo que respecta a su capacidad de modificar la expresión de proteínas de polaridad celular (Gardiol et al., 1999; Pim et al., 2012). Sin embargo, ha sido mucho menos estudiado el posible rol de E7, principal oncoproteína de HPV, en la regulación de proteínas de polaridad. En este contexto, y considerando también los resultados de nuestros ensayos de luciferasa, los cuales mostraron un aumento significativo de la actividad transcripcional de *DLG1* en presencia de la oncoproteína E7, consideramos de particular relevancia estudiar la influencia de E7 de HPV en la expresión de proteínas celulares de polaridad.

Entonces, desarrollamos cultivos organotípicos a partir de queratinocitos expresando las proteínas E7 y E6/E7 de HPV-18 (E7 18 y E6E7 18) y de HPV-11 (E7 11 y E6E7 11). Para ello, aplicamos a células PHK la tecnología de infección retroviral, utilizando los retrovirus recombinantes correspondientes conteniendo las secuencias que codifican para la expresión de las proteínas virales de interés. Esta metodología de infección de queratinocitos a partir del sobrenadante de células productoras retrovirales (Markowitz et al., 1988), tiene asociada una alta efectividad de infección (Cheng et al., 1995), y nos permitió obtener queratinocitos expresando activamente las proteínas virales de manera más eficiente que la técnica de transfección. En todos los casos, se llevó a cabo un proceso de selección de aquellos queratinocitos infectados mediante resistencia al antibiótico codificado en el vector retroviral. A partir de estos queratinocitos infectados y seleccionados, generamos los distintos cultivos organotípicos. A su vez en cada caso, cultivos *raft* desarrollados a partir de PHK sin infectar o infectados con los vectores vacíos (sin las secuencias que codifican para las proteínas virales) fueron utilizados como cultivos control.

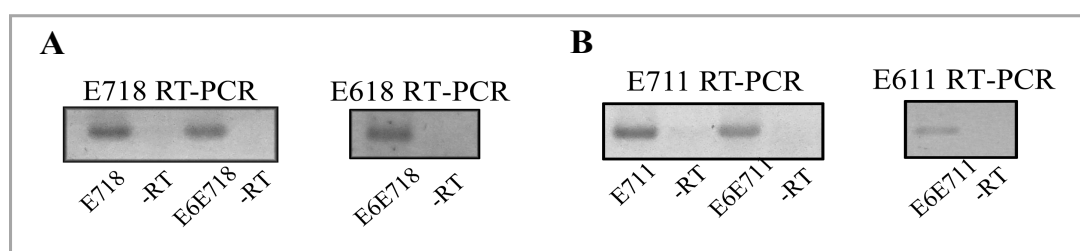
A continuación, analizamos la morfología de los tejidos generados mediante tinción por HE de las correspondientes secciones de los cultivos incluidos en parafina.

Como era esperado, observamos que la presencia de E7 y E6/E7 de HPV-18 se asoció con un engrosamiento de las capas estratificadas del epitelio, al comparar con los tejidos control. Además, en presencia de dichas oncoproteínas se evidenció la conservación de núcleos en todo el epitelio, incluyendo las capas superiores y tal como había sido previamente reportado (Figura 4.1.3.A) (Delury et al., 2013). Por otro lado, los tejidos expresando las proteínas del HPV-11, de bajo riesgo oncogénico y presentados en la Figura 4.1.3.B, mostraron un engrosamiento del epitelio al comparar con los cultivos control. Esto se asoció a un incremento en el número de células conformando el estrato espinoso. Sin embargo, las alteraciones morfológicas fueron mucho menos evidentes que en los cultivos expresando las proteínas del HPV de alto riesgo. Estos cambios observados ante la expresión de oncoproteínas virales, reproducen lo observado en epitelios naturalmente infectados por HPV, habiéndose podido recrear lo observado en lesiones *in vivo* (Doorbar, 2006).

Luego, nos propusimos validar los cultivos obtenidos. En primer lugar, nos abocamos a corroborar la expresión de los transcritos correspondientes a las proteínas virales. Diseñamos cebadores específicos para amplificar en forma diferencial los transcritos de E7 y E6 de ambos tipos de HPV. Los mismos se detallan en la sección 3.7.10 de Materiales y métodos, junto con los ciclados optimizados para la detección de los transcritos correspondientes. Así, mediante ensayos de RT-PCR, se pudo verificar la presencia de los transcritos esperados y se verificó mediante reacciones sin RT la ausencia de ADN contaminante (Figura 4.1.4).



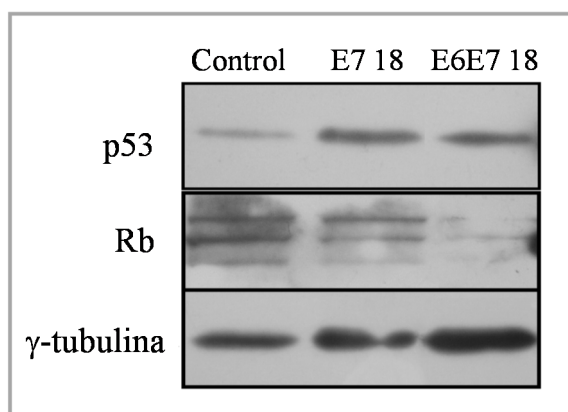
**Figura 4.1.3: Análisis de la morfología de los cultivos *raft* generados.** Secciones de los cultivos organotípicos obtenidos incluidos en parafina se tiñeron con HE con el fin de evaluar los detalles morfológicos de los tejidos. Se muestran secciones representativas de los cultivos control y de aquellos expresando las proteínas E7 y E6/E7 de HPV-18 (A) y de HPV-11 (B). Barra de tamaño 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4.1.4: Detección de los transcritos virales en los cultivos *raft* desarrollados.** Extractos de ARN de los cultivos *raft* fueron sometidos a reacción de RT, seguidas de las reacciones de PCR correspondientes para cada caso. Se muestran las amplificaciones obtenidas para el caso de los cultivos expresando E7 o E7 en conjunto con E6 tanto para el caso de HPV de alto (A) como de bajo riesgo (B). -RT: Control sin reacción de RT.

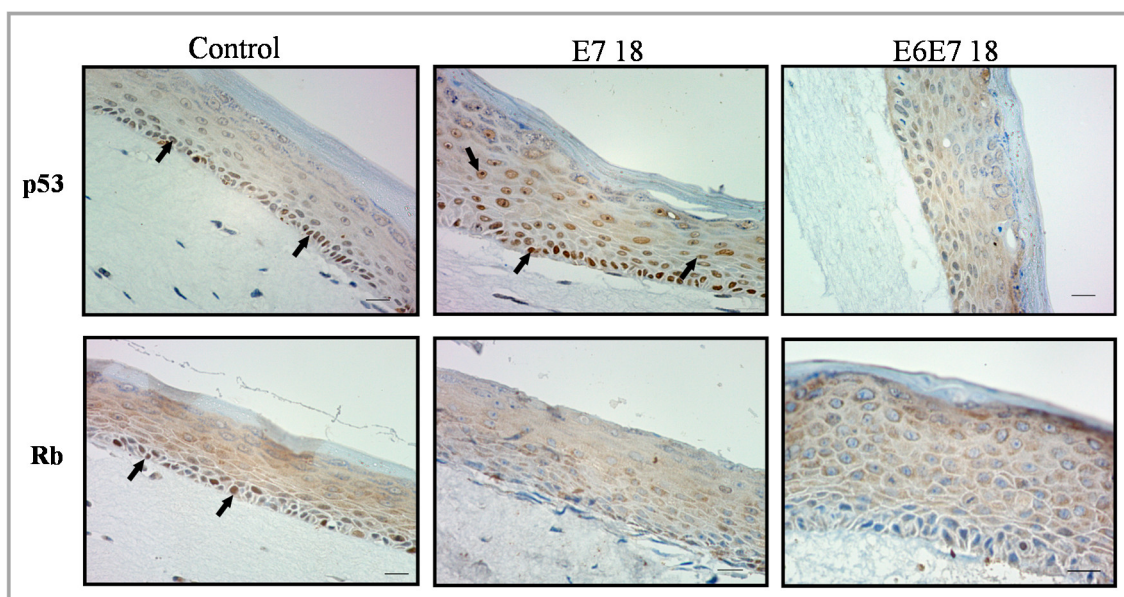
Posteriormente continuamos corroborando la expresión y funcionalidad de las oncoproteínas de HPV-18 en los tejidos generados, mediante la evaluación de la expresión de Rb y p53, respectivos blancos celulares de E7 Y E6 de alto riesgo. Los experimentos de WB presentados en la Figura 4.1.5 muestran que la expresión de E7 18 indujo una reducción de Rb y un aumento en los niveles de la proteína p53, como fuera descrito previamente (Flores et al., 2000; Munger et al., 2001; Seavey et al., 1999; Thomas and Laimins, 1998). Para el caso de los *raft* E6E7 18, se observó un leve descenso en la

expresión de p53 al comparar con los cultivos E7 18 y en relación al control de carga (Flores et al., 2000).



**Figura 4.1.5: Análisis de la expresión funcional en los cultivos *raft* de las oncoproteínas de HPV-18 mediante estudio de la expresión de sus blancos celulares por WB.** La expresión y funcionalidad de E7 y E6 fue corroborada analizando los niveles de sus respectivos blancos celulares Rb y p53. Se partió de 60 µg de proteína en cada caso; γ-tubulina fue utilizada como control de carga.

Aún con mayor relevancia, el efecto de las proteínas virales sobre sus blancos celulares se corroboró también mediante IHQ en cortes seriados de los tejidos generados, y los resultados se presentan en la Figura 4.1.6. En los cultivos control, la expresión de p53 estuvo restringida a las capas basales del epitelio, como era esperado (Flores et al., 2000; Wang et al., 2004). Sin embargo, en los cultivos expresando E7 18 la proteína p53 se detectó también en los estratos suprabasales, probablemente como resultado de los procesos de replicación celular fuera de programa mediados por E7 (Doorbar et al., 2015; Flores et al., 2000; Seavey et al., 1999). A su vez, los cultivos E6E7 18 mostraron una clara reducción en la expresión nuclear de p53 en todo el epitelio. Estos resultados señalan que E7 18 incrementó los niveles de p53 en los estratos suprabasales y ratifican la expresión funcional de E6, que de acuerdo a sus actividades específicas estaría induciendo la degradación de p53 (Mantovani et al., 2001). Para el caso de la proteína Rb, sus niveles resultaron especialmente altos en los núcleos de las células basales de los tejidos control. En cambio, Rb se encuentra notablemente disminuida en los cultivos E7 18 y E6E7 18, tal como fuera previamente reportado (Munger et al., 2001). Por lo tanto, los resultados presentados en las Figuras 4.1.5 y 4.1.6 corroboran, en conjunto, la expresión funcional de las proteínas E7 y E6/E7 de HPV-18.



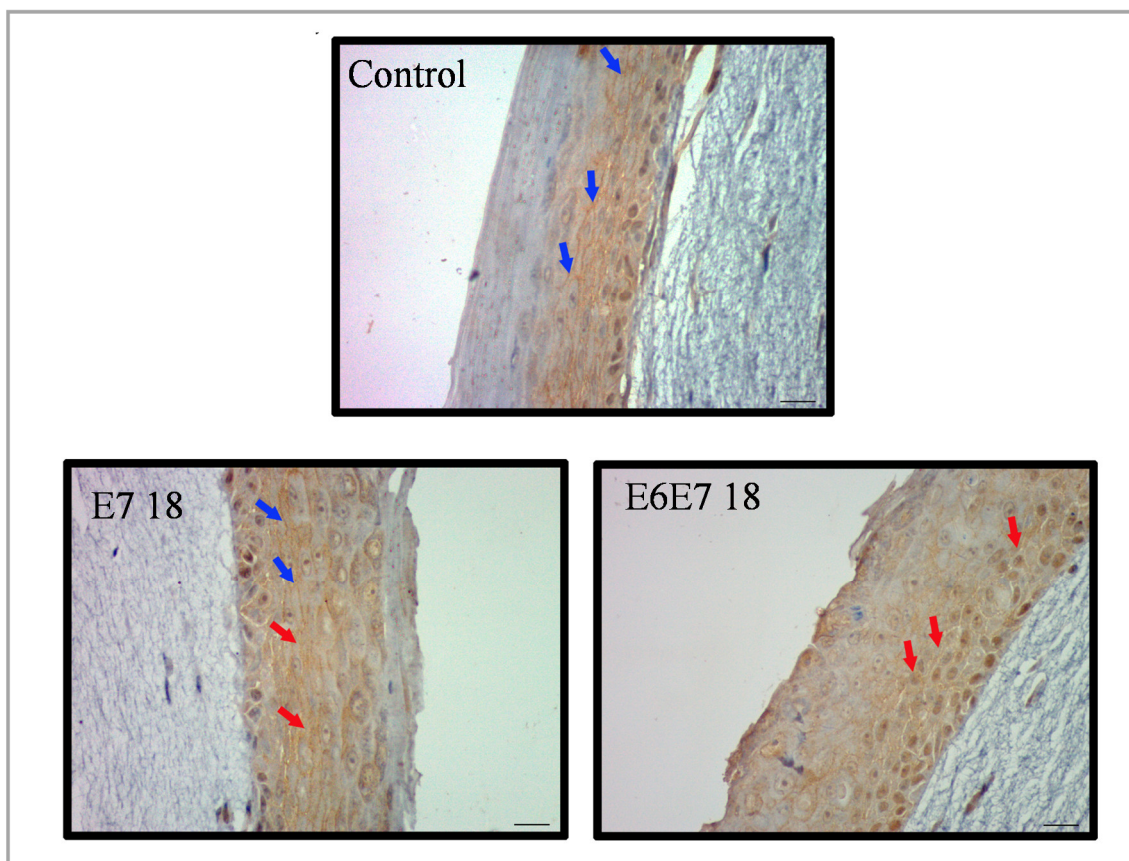
**Figura 4.1.6: Análisis de la expresión funcional en los cultivos *raft* de las oncoproteínas de HPV-18 mediante estudio de la expresión de sus blancos celulares por IHQ.** Secciones de los cultivos incluidos en parafina se analizaron por el protocolo de IHQ (sección 3.9.7 Materiales y métodos) usando anticuerpos anti-p53 o anti-Rb (tinción marrón) y se realizó una contra-tinción con hematoxilina. En la figura se muestra un ensayo representativo para cada tipo de cultivo. Las flechas negras indican la expresión nuclear de las correspondientes proteínas celulares (p53 o Rb) en los diferentes cultivos. Barra de tamaño: 10  $\mu$ m.

#### *4.1.1.2.2 Análisis del efecto de la expresión de proteínas de HPV-18 en el patrón de expresión de DLG1*

Posteriormente, habiendo corroborado la expresión funcional de las proteínas virales, continuamos con nuestro objetivo principal de estudiar más detalladamente el efecto de las proteínas de HPV en la expresión de DLG1. Comenzamos analizando el patrón de expresión de DLG1 en el contexto de los cultivos epiteliales escamosos producidos, en presencia o ausencia de las oncoproteínas E7 y E6/E7 de HPV-18. Para ello, y como se detalla en la sección 3.9.7 de Materiales y métodos, cortes de tejidos *raft* parafinados fueron procesados y analizados mediante la técnica de IHQ para DLG1. Así, como se muestra en la Figura 4.1.7, para los cultivos control obtuvimos una marcación de DLG1 localizada principalmente en los estratos basales y parabasales, pero mayoritariamente ausente en los estratos superiores más diferenciados. DLG1 se localizó preferentemente en el citoplasma de las células basales, mientras que en las capas suprabasales se encontró predominantemente en las regiones de contacto célula-célula. Asimismo, pudimos observar tinción positiva para DLG1 a nivel nuclear, especialmente

en el estrato basal. En conjunto, estas observaciones estuvieron de acuerdo con lo esperado y como fuera reportado previamente para biopsias normales de tejido cérvico-uterino (Figura 1.10, Introducción) (Cavatorta et al., 2004; Watson et al., 2002).

A continuación, estudiamos los patrones de expresión de DLG1 en cultivos *raft* derivados de queratinocitos expresando las oncoproteínas de HPV. La tinción general de DLG1 fue más intensa en estos casos, comparándolos con lo obtenido para cultivos control. Asimismo, en presencia de las proteínas virales, la expresión de DLG1 se observó en todos los estratos epiteliales. Más aún, la localización celular resultó ser preferentemente citoplasmática tanto en las células basales como en las capas superiores, a la vez que la presencia de DLG1 se vio disminuida a nivel de los contactos celulares. Este efecto fue aún más evidente en los cultivos expresando E6/E7 de HPV-18, donde la expresión de DLG1 en los bordes celulares resultó relevantemente reducida. De manera interesante, también se observó un incremento en la tinción nuclear de DLG1 (Figura 4.1.7). Cabe la pena recalcar que las observaciones descriptas se asemejan a la expresión de DLG1 reportada en SIL (Figura 1.10, Introducción) (Cavatorta et al., 2004). Por lo dicho, estos resultados indicarían que la proteína E7 de HPV-18 es capaz de inducir cambios tanto en la localización subcelular, como en la distribución a lo largo del epitelio escamoso de DLG1, siendo estos efectos aún más importantes cuando ambas oncoproteínas virales se expresan en forma conjunta.



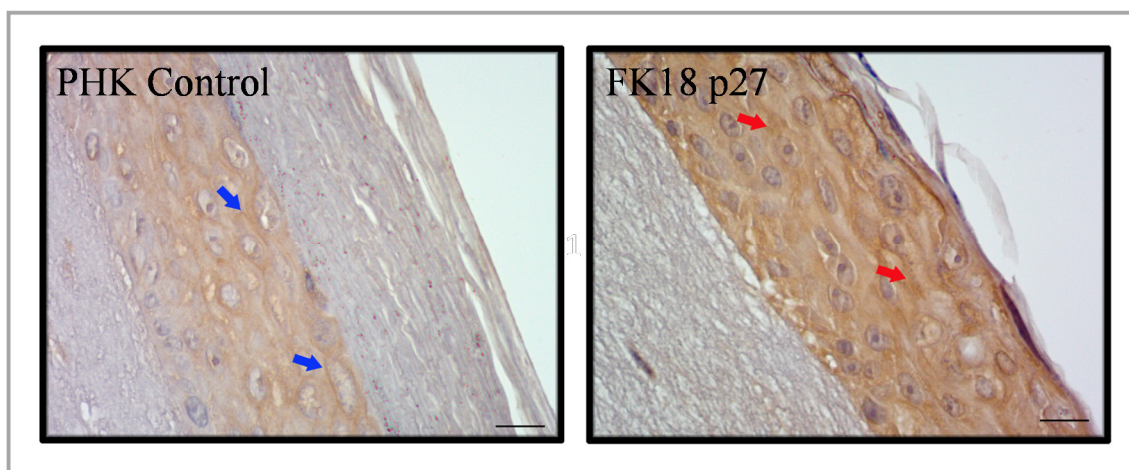
**Figura 4.1.7: Análisis por IHQ de la expresión y localización de DLG1 en cultivos *raft* control, E7 18 y E6E7 18.** Se muestran secciones parafinadas de los cultivos que fueron analizados para la expresión de DLG1 (marrón) usando anticuerpo anti-DLG1 según el protocolo (sección) y contrateñidos con hematoxilina. Las flechas azules indican la localización de DLG1 a nivel de los bordes celulares en los cultivos control y algunas áreas de los *raft* E7 18. Las flechas rojas muestran la redistribución de DLG1 hacia el citoplasma, tanto en cultivos E7 18 como E6E7 18. Barra de tamaño: 10  $\mu$ m.

#### *Estudio de la expresión de DLG1 en presencia del genoma completo de HPV-18*

A continuación, nos propusimos analizar el patrón de expresión de DLG1 en el contexto del genoma completo de HPV. Para ello, utilizamos cultivos organotípicos a partir de PHK conteniendo la totalidad del genoma de HPV-18, en pasaje celular número 27 (FK18 p27), desarrollados por nuestra colaboradora Dra. Renske Steenbergen (Departamento de Patología, Centro Médico VU, Amsterdam, Holanda). Estos tejidos resultaron ser de gran interés dado que los mismos presentan características morfológicas e histológicas reminiscentes de una lesión correspondiente a una displasia leve a moderada *in vivo* (Steenbergen et al., 1998).

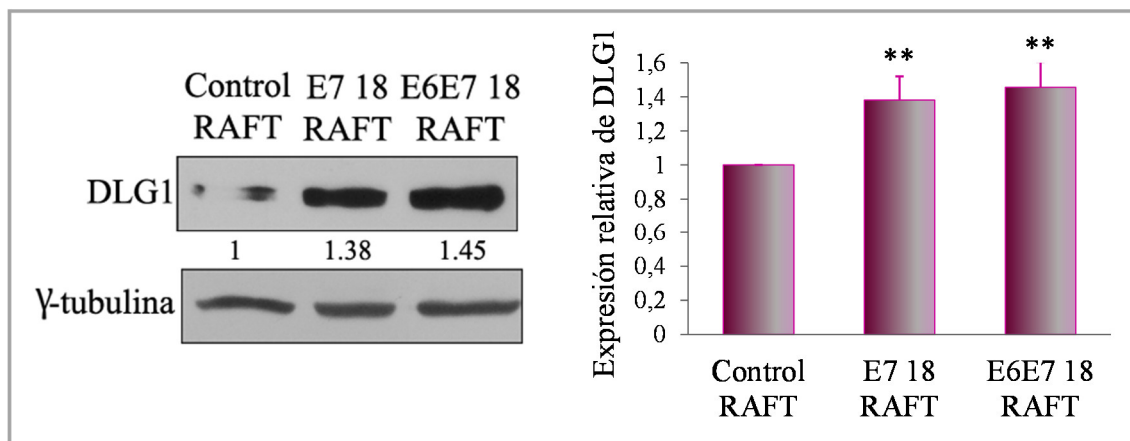
Como puede observarse en la Figura 4.1.8, en estas muestras con el genoma completo de HPV la tinción de DLG1 resultó mucho más intensa comparando con los

cultivos control. Además, DLG1 se expresó en todo el espesor del epitelio, mostrando una distribución predominantemente citoplasmática y encontrándose muy disminuida de los bordes celulares. Notablemente, estos resultados concuerdan y reafirman nuestros datos previos presentados para los cultivos expresando únicamente las oncoproteínas E6/E7 de HPV-18.



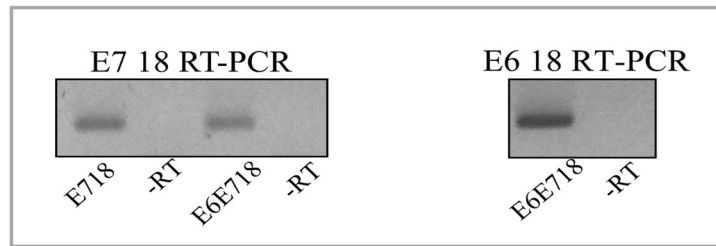
**Figura 4.1.8: Análisis por IHQ de la expresión y localización de DLG1 en presencia del genoma completo de HPV-18.** Se muestran secciones parafinadas de cultivos *raft* control y desarrollados con PHK transfectados con el genoma viral en pasaje 27 (FK18 p27) que fueron analizados para la expresión de DLG1 (marrón) usando anticuerpo anti-DLG1 según el protocolo (sección) y contrateñidos con hematoxilina. Las flechas azules indican la localización de DLG1 a nivel de los bordes celulares en los cultivos control. Las flechas rojas muestran la redistribución de DLG1 hacia el citoplasma en los cultivos con el genoma completo de HPV-18. Barra de tamaño: 10  $\mu$ m.

Como puede apreciarse en la Figuras 4.1.7 y 4.1.8, al mismo tiempo que encontramos cambios en la distribución de DLG1 en presencia de las proteínas de HPV-18 en los cultivos organotípicos, notamos también un cambio en su abundancia. A fin de evaluar cuantitativamente estas observaciones, se analizaron los niveles de DLG1 por WB usando extractos de proteínas derivados de los diferentes cultivos organotípicos expresando o no las oncoproteínas virales. Los resultados de dichos ensayos se muestran en la Figura 4.1.9, indicando que las proteínas E7 y E6/E7 de HPV-18 fueron capaces de incrementar significativamente los niveles de DLG1, al comparar con los cultivos control.



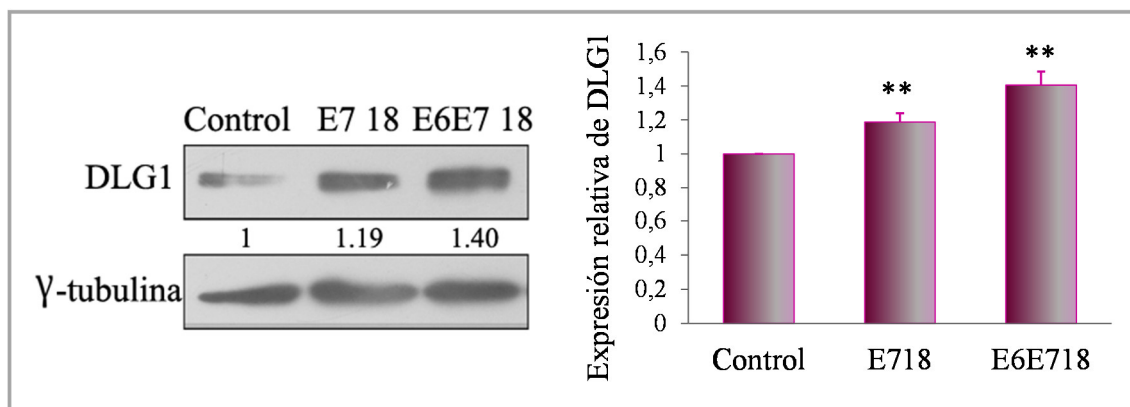
**Figura 4.1.9: Estudio por WB de los niveles de expresión de DLG1 en raft en presencia de las proteínas E7 y E6/E7 de HPV-18.** Extractos proteicos de cultivos raft control, E7 18 o E6E7 18 fueron analizados para la expresión de DLG1. Se partió de 60  $\mu$ g de proteína en cada caso;  $\gamma$ -tubulina fue utilizada como control de carga. Los números representan los cambios en la intensidad de banda correspondiente a de DLG1 en cultivos expresando proteínas virales y en forma relativa al control (sin expresión de proteínas virales, considerado 1). A la derecha se muestra gráficamente el análisis por densitometría de los WB para los niveles de DLG1 en forma relativa al control y considerando el control de carga,  $\gamma$ -tubulina, en cada condición (media  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ ). Se indican con asteriscos el aumento significativo en los niveles de expresión de DLG1 en presencia de las correspondientes proteínas virales (\*\*  $p < 0.01$ ).

El aumento en la expresión total de la proteína de polaridad podría vincularse al hecho de que en aquellos tejidos expresando las proteínas virales, la misma se expresó en todos los estratos, mientras que DLG1 sólo estuvo presente en las capas más basales de los cultivos control. Considerando esta posibilidad, nos propusimos evaluar si la presencia de E7 de HPV-18 podría estar implicada en la regulación de los niveles intracelulares de DLG1, en una forma independiente del contexto del tejido. Para ello, analizamos el efecto de la expresión de las proteínas virales en células epiteliales en cultivo (HEK293). Dichas células fueron transfectadas de manera transiente con los vectores adecuados para la expresión de una o ambas proteínas virales de interés (E6 o E6/E7) (sección 3.5 de Materiales y métodos). También confirmamos que las condiciones experimentales eran adecuadas corroborando la presencia de los transcritos virales esperados en cada caso por ensayos de RT-PCR (Figura 4.1.10).



**Figura 4.1.10: Detección de los transcritos de HPV-18 en las células HEK293 transfectadas.** Extractos de ARN las células transfectadas con los correspondientes vectores para la expresión de E7 y E6 de HPV-18 fueron sometidos a reacción de RT, seguidas de las reacciones de PCR correspondientes para cada caso para el análisis de los transcritos. Se muestran las amplificaciones obtenidas para el caso de los cultivos expresando E7 o E7 en conjunto con E6 de HPV-18. –RT: Control sin reacción de RT.

Luego, a partir de extractos proteicos obtenidos de las mencionadas células en cultivo, realizamos ensayos de WB y evaluamos la abundancia de DLG1 en cada caso. Varios estudios han demostrado que en ciertas condiciones experimentales E6 de HPV-18 es capaz de promover la degradación de DLG1 a través de mecanismo proteolítico dependiente del proteasoma (Gardiol et al., 2002; Gardiol et al., 1999). Sin embargo, es importante entender la regulación de las proteínas celulares en el contexto de la infección en el cual ambas proteínas se expresan en conjunto. Como puede apreciarse en la Figura 4.1.11, en concordancia a los resultados obtenidos en los ensayos de luciferasa y a lo observado mediante IHQ en los cultivos *raft*, la presencia de E7 de HPV-18 indujo un aumento moderado de DLG1. Lo mismo se encontró para el caso de la coexpresión de E7 y E6 de HPV-18, al parecer prevaleciendo y soslayando los efectos de degradación mediados por E6 observados previamente (observaciones personales) (Gardiol et al., 2002; Gardiol et al., 1999).



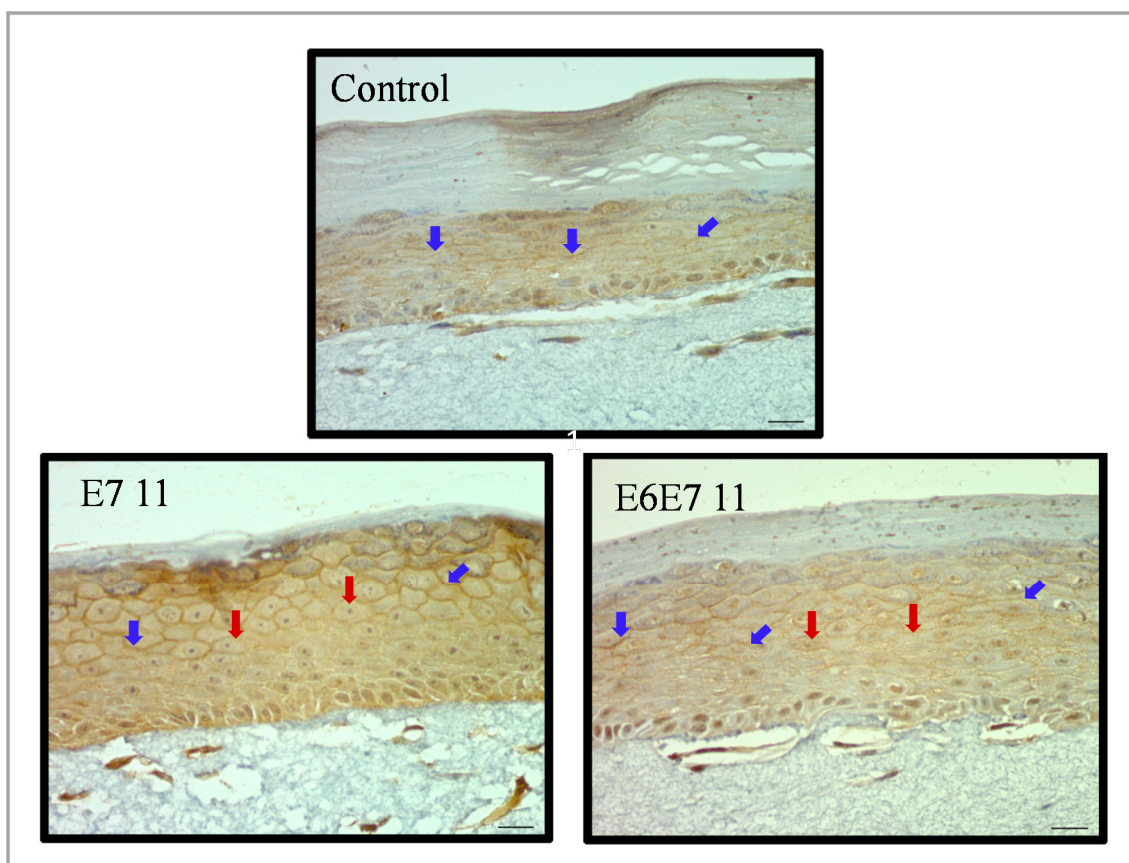
**Figura 4.1.11: Estudio por WB de los niveles de expresión de DLG1 en células en cultivo expresando E7 y E6/E7 de HPV-18.** Extractos proteicos de células HEK293 transfectadas con los vectores de expresión para E7 o E6/E7 de HPV-18 se analizaron para determinar los niveles de expresión de DLG1. Se partió de 100  $\mu$ g de proteína;  $\gamma$ -tubulina fue utilizada como control de carga. Los números representan los cambios en la intensidad de banda correspondiente a DLG1 en células expresando proteínas virales y en forma relativa al control correspondiente (sin expresión de proteínas virales, considerado 1). A la derecha se muestra gráficamente el análisis por densitometría de los WB para los niveles de DLG1 en forma relativa al control y considerando el control de carga,  $\gamma$ -tubulina, en cada condición (media  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ ). Se indican con asteriscos el aumento significativo en los niveles de expresión de DLG1 en presencia de las correspondientes proteínas virales (\*\*  $p < 0.01$ ).

#### 4.1.1.2.3 Análisis del efecto de la expresión de proteínas de HPV-11 en el patrón de expresión de DLG1

Habiendo encontrado que los niveles y localización de DLG1 se alteran por efecto de las proteínas del HPV de alto riesgo oncogénico, nos propusimos analizar si existía algún efecto de las proteínas de HPV de bajo riesgo sobre la expresión de la mencionada proteína celular. Con dicho objetivo, nos abocamos a analizar las consecuencias en la expresión de DLG1 ante la presencia de proteínas E7 y E6/E7 de HPV-11, utilizando los cultivos *raft* desarrollados (Figura 4.1.3.B).

Evaluamos la expresión de DLG1 aplicando a los distintos cultivos generados la metodología de IHQ, detallada en la sección 3.9.7 de Materiales y métodos. Como puede apreciarse en la Figura 4.1.12, mientras que para el cultivo organotípico control se obtuvo la tinción previamente descrita, en forma sorprendente se evidenciaron algunos cambios al expresarse las proteínas virales de bajo riesgo. Se observó un aumento general de la abundancia de DLG1, a la vez que se expresó también en los estratos más diferenciados. Especialmente en el cultivo E7 11, DLG1 estuvo presente en altos niveles en los bordes celulares, y sólo se evidenció una leve reducción de DLG1 a nivel de dicha

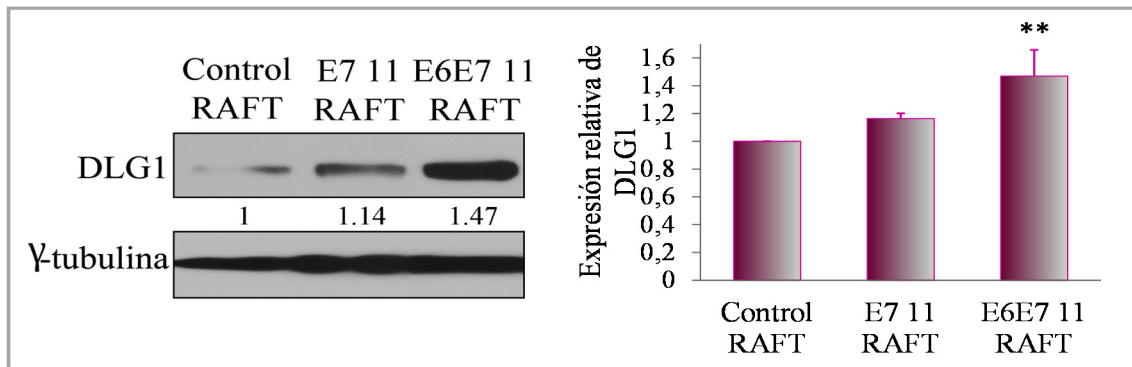
localización en los cultivos E6E7 11. En ambas condiciones se pudo también apreciar un aumento en la expresión citoplasmática de DLG1 en comparación al control. Por tanto, se observó una redistribución de DLG1 a lo largo de epitelio en presencia de proteínas de HPV-11, de bajo riesgo oncogénico, pero sin alteraciones notables de su localización subcelular.



**Figura 4.1.12: Análisis por IHQ de la expresión y localización de DLG1 en cultivos *raft* control, E7 11 y E6E7 11.** Se muestran secciones parafinadas de los cultivos que fueron analizados para la expresión de DLG1 (marrón) usando anticuerpo anti-DLG1 según el protocolo (sección) y contrateñidos con hematoxilina. Las flechas azules indican la localización de DLG1 a nivel de los bordes celulares en los cultivos control y algunas áreas de los *raft* E7 11 y E6E7 11. Las flechas rojas muestran la expresión citoplasmática de DLG1, tanto en cultivos E7 11 como E6E7 11. Barra de tamaño: 10  $\mu$ m.

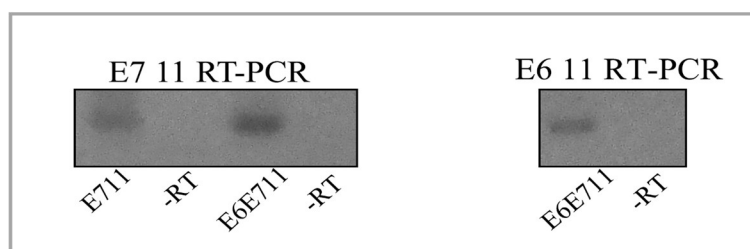
Luego, se ensayó mediante WB si la presencia de E7 y E6/E7 de HPV-11 en estos cultivos generados podía producir un cambio en la abundancia de DLG1. Como se muestra en la Figura 4.1.13, ante la expresión de la proteína E7 de HPV-11 se observó un leve incremento en los niveles de DLG1, mientras que este efecto fue más pronunciado para los cultivos E6E7 11. El sorprendente incremento de los niveles de DLG1 en

presencia de las proteínas de HPV-11 estuvo en concordancia con lo apreciado en los experimentos de luciferasa e IHQ presentados previamente.



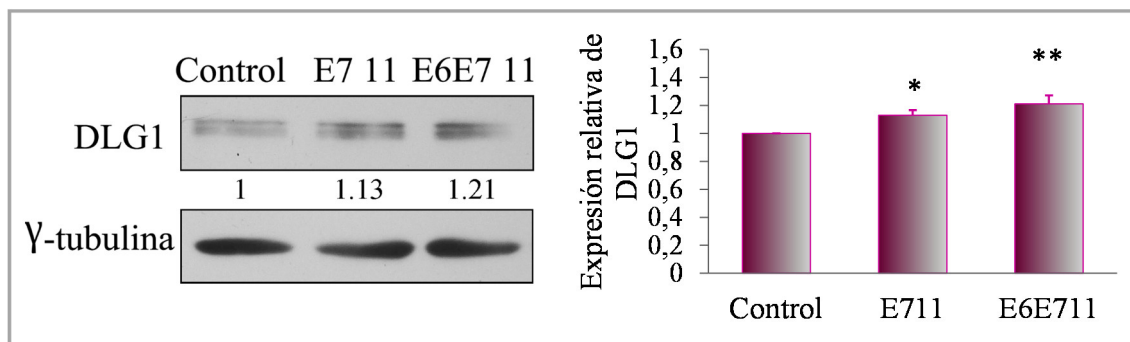
**Figura 4.1.13: Estudio por WB de los niveles de expresión de DLG1 en raft en presencia de las proteínas E7 y E6/E7 de HPV-11.** Extractos proteicos de cultivos *raft* control, E7 11 o E6E7 11 fueron analizados para la expresión de DLG1. Se partió de 60  $\mu$ g de proteína en cada caso;  $\gamma$ -tubulina fue utilizada como control de carga. Los números representan los cambios en la intensidad de banda correspondiente a DLG1 en cultivos *raft* expresando proteínas virales y en forma relativa al control correspondiente (sin expresión de proteínas virales, considerado 1). A la derecha se muestra gráficamente el análisis por densitometría de los WB para los niveles de DLG1 en forma relativa al control y considerando el control de carga  $\gamma$ -tubulina, en cada condición (media  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ ). Se indican con asteriscos el aumento significativo en los niveles de expresión de DLG1 en presencia de las correspondientes proteínas virales (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

A continuación, con el objeto de estudiar el potencial efecto de las proteínas de HPV-11 en los niveles de expresión de DLG1 en el orden intracelular, se transfectaron células HEK293 con los plásmidos correspondientes para la expresión de E7 y E6/E7 de HPV-11. La expresión de las secuencias virales se corroboró mediante RT-PCR y se evidenció la ausencia de ADN contaminante (Figura 4.1.14).



**Figura 4.1.14: Detección de los transcritos de HPV-11 en las células HEK293 transfectadas.** Extractos de ARN las células transfectadas con los correspondientes vectores para la expresión de E7 y E6 de HPV-11 fueron sometidos a reacción de RT, seguidas de las reacciones de PCR correspondientes para cada caso para el análisis de los transcritos. Se muestran las amplificaciones obtenidas para el caso de los cultivos expresando E7 o E6/E7 de HPV-11. –RT: Control sin reacción de RT.

Además, como se puede apreciar en la Figura 4.1.15, la expresión de E7 y E6/E7 de HPV-11 en las mencionadas células en cultivo fue capaz de inducir aumentos significativos en los niveles de expresión de DLG1, ensayado mediante WB.



**Figura 4.1.15: Estudio por WB de los niveles de expresión de DLG1 en células HEK293 expresando las proteínas E7 y E6/E7 de HPV-11.** Extractos proteicos de las células transfectadas con los vectores de expresión para E7 o E6/E7 de HPV-11 se analizaron para determinar los niveles de expresión de DLG1. Se partió de 100 µg de proteína;  $\gamma$ -tubulina fue utilizada como control de carga. Los números representan los cambios en la intensidad de banda correspondiente a DLG1 en células expresando proteínas virales y en forma relativa al control correspondiente (sin expresión de proteínas virales, considerado 1). A la derecha se muestra gráficamente el análisis por densitometría de los WB para los niveles de DLG1 en forma relativa al control y considerando el control de carga  $\gamma$ -tubulina, en cada condición (media  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ ). Se indican con asteriscos el aumento significativo en los niveles de expresión de DLG1 en presencia de las correspondientes proteínas virales (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

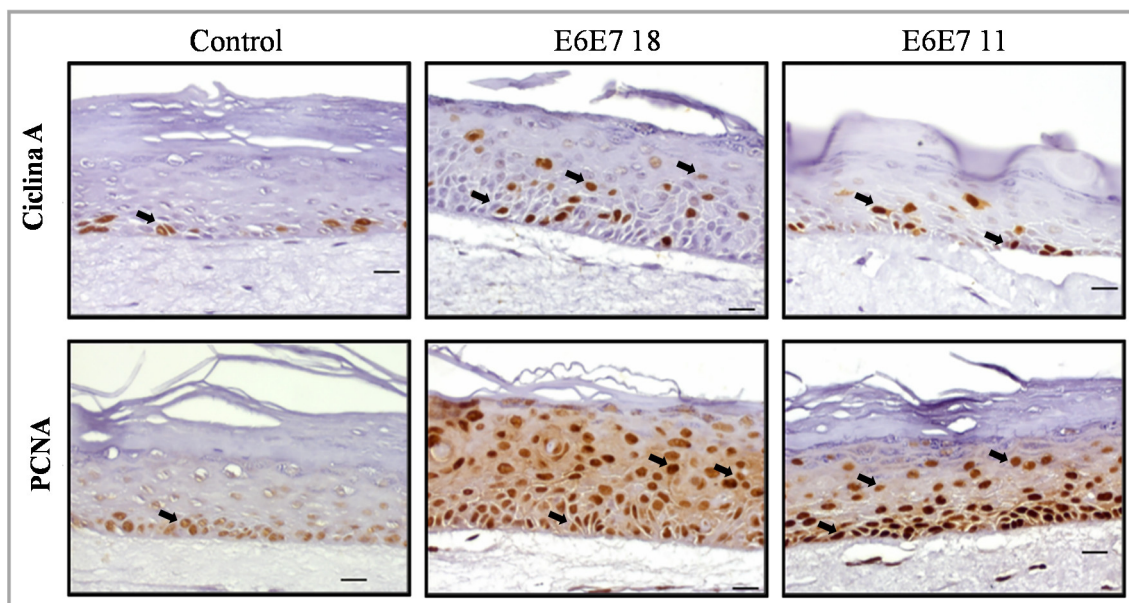
Por lo tanto, los datos presentados dejan en evidencia que las proteínas E7 y E6/E7 del HPV-11 son capaces de alterar la expresión de DLG1, en forma similar a lo encontrado para HPV-18. Esto sugiere la probable existencia de un mecanismo común para HPV de bajo y alto riesgo oncogénico ligado a cambios en la expresión de DLG1, aunque con diferencias importantes entre ambos tipos virales en los efectos sobre su localización subcelular. La existencia de dicho mecanismo viral común sería indicador de la importancia de DLG1 para el virus, probablemente a nivel de su ciclo de replicación, como se discutirá posteriormente.

#### **4.1.1.1.4 Análisis de marcadores de proliferación en cultivos expresando las proteínas virales**

A continuación, para evaluar el efecto de la presencia de las proteínas virales sobre el programa de proliferación de las células que componen los epitelios analizados

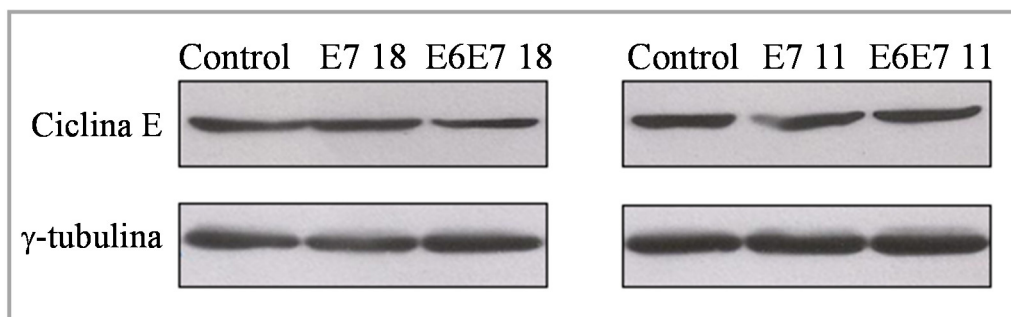
y su posible relación con nuestros hallazgos en cuanto a proteínas de polaridad, nos abocamos a estudiar la expresión de marcadores de entrada y progresión al ciclo celular: Ciclina A y PCNA (del inglés *proliferating cell nuclear antigen*). La Ciclina A es requerida para la progresión de la fase S (Sherr and Roberts, 1999), mientras que PCNA es necesario para la replicación de ADN y es habitualmente utilizado como marcador de replicación (Kubben et al., 1994). Para analizar su expresión usamos cortes seriados de los cultivos *rafts* analizados previamente para la expresión de DLG1, y llevamos a cabo experimentos de IHQ y según se detalla en la sección 3.9.7 de Materiales y métodos.

Como se muestra en la Figura 4.1.16, las proteínas celulares Ciclina A y PCNA sólo se expresaron en los núcleos de algunas células pertenecientes al estrato basal de los cultivos control, como era esperado. En cambio, la expresión de las proteínas E6/E7 del HPV-18 indujo la expresión de ambos marcadores de proliferación en los estratos más diferenciados suprabasales, tal como fuera previamente descrito (Flores et al., 2000; Wang et al., 2009). A su vez, los HPV de bajo riesgo también son capaces de inducir la re-iniciación del ciclo celular y la síntesis de ADN fuera de programa en una fracción de células post-mitóticas diferenciadas en los estratos medios y superiores de los epitelios infectados (Cheng et al., 1995; Doorbar et al., 2015; McCord et al., 2014; Wang et al., 2015). Por lo tanto, como se esperaba, las E6/E7 de HPV-11 también fueron capaces de inducir la expresión de Ciclina A y PCNA en los estratos epiteliales superiores, si bien en menor medida respecto a lo observado para HPV-18 (Figura 4.1.16). Estos resultados, en conjunto, demuestran que la progresión del ciclo celular fue afectada por la expresión de las proteínas virales, lo que podría estar funcionalmente ligado a los cambios en la expresión de DLG1 observados en las diferentes condiciones previamente analizadas.



**Figura 4.1.16: Análisis de la expresión y localización de marcadores de proliferación en cultivos *raft* expresando proteínas de HPV de alto y bajo riesgo.** Se muestran secciones de cultivos incluidos en parafina representativas de los *raft* desarrollados que fueron analizados para la expresión de Ciclina A (paneles superiores) o PCNA (paneles inferiores) usando los anticuerpos correspondientes según el protocolo (sección 3.9.7) y contrateñidos con hematoxilina. Tanto PCNA como Ciclina A mostraron una expresión nuclear en las células basales característica en los tejidos control. En los cultivos expresando las proteínas virales se observó la presencia de dichos marcadores también en los estratos superiores. Las flechas negras indican la expresión nuclear de las correspondientes proteínas celulares en los diferentes cultivos. Barra de tamaño: 10  $\mu$ m.

Posteriormente, quisimos evaluar el efecto de las proteínas virales sobre mecanismos de proliferación en células epiteliales en cultivo. Para ello utilizamos el marcador celular de fase S Ciclina E, cuyo protocolo de detección en WB había sido previamente optimizado en nuestro laboratorio (Marziali et al., 2015). Usamos extractos de las células en cultivo transfectadas para la expresión transiente de las correspondientes proteínas virales, obtenidos como se detalló en la sección 3.9.1 de Materiales y métodos, y se realizaron experimentos de WB cuyos resultados se muestran en la Figura 4.1.17. Como puede observarse, llamativamente las células HEK293 expresando E7 y E6/E7 tanto de HPV de alto (A) como de bajo riesgo (B) no mostraron alteraciones significativas en el marcador de fase S mencionado. Como se discutirá, estos resultados probablemente se asocien a las características del modelo celular transformado utilizado.



**Figura 4.1.17: Estudio por WB de los niveles de expresión de Ciclina E en presencia de las proteínas E7 y E6/E7 de HPV-18 y 11.** Extractos proteicos de células HEK293 transfectadas con los vectores de expresión para E7 o E6/E7 de HPV-18 y 11 se analizaron para determinar los niveles de expresión de Ciclina S, no habiéndose encontrado diferencias notorias en presencia o ausencia de las proteínas virales. Se utilizaron 100 µg de proteína;  $\gamma$ -tubulina fue utilizada como control de carga.

#### 4.1.2 Implicancia de proteínas de HPV en la regulación de la expresión de PAR3

Las observaciones referentes a la expresión de DLG1 previamente detalladas nos alentaron a ampliar el análisis a otras proteínas celulares también reportadas como blancos celulares de HPV, y que estuvieran involucradas en la polaridad celular. Como se detalló en la sección 1.3.2 de la Introducción, nuestro grupo ha reportado en forma reciente que HPV-18 es capaz de interferir con la proteína PAR3 (Facciuto et al., 2014), siendo esta proteína clave en la formación de las uniones celulares de tipo *tight* y en la regulación de señales que regulan la proliferación celular (Wu et al., 2007). Así, nos propusimos continuar nuestros estudios analizando el efecto de las proteínas de HPV en la expresión de la proteína PAR3.

##### 4.1.2.1 Estudio de la expresión de la proteína de polaridad celular PAR3 en presencia de proteínas de HPV en cultivos organotípicos

###### 4.1.2.1.1 Optimización de un protocolo de IHQ para el análisis de la expresión de PAR3

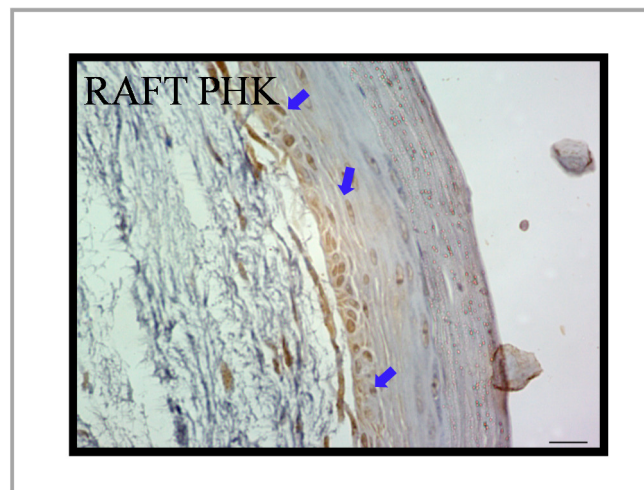
En primer lugar, nos abocamos a la optimización de una técnica de IHQ que nos permitiera analizar la expresión de PAR3 en tejidos expresando o no las proteínas virales de nuestro interés. Para la puesta a punto mencionada, partimos de metodologías desarrolladas previamente en nuestro laboratorio (Cavatorta et al., 2004; Gardiol et al., 2006) y utilizando los cultivos organotípicos desarrollados a partir de PHK (control) según se detalla en la sección 4.1.1.2.1 del presente Capítulo de Resultados.

Se estableció que un posible protocolo eficiente para la detección de PAR3 debía cumplimentar ciertas consignas, entre las cuales se consideró: i) presencia de marcación intracelular en las células epiteliales; ii) ausencia de marcación en capas superficiales, cuyo metabolismo está muy reducido y que presentan una expresión mayoritaria de queratinas; iii) baja marcación de fondo, incluyendo una reducida o incluso ausente marcación en el componente dérmico de los cultivos organotípicos. Para alcanzar la mencionada optimización, se consideraron los puntos más críticos de la técnica. Uno de los puntos clave durante los ensayos de IHQ es el paso en el que se fuerza la exposición del antígeno. Este proceso de recuperación puede llevarse a cabo mediante calentamiento en solución tampón adecuada. En este sentido, modificaciones en el tiempo y la intensidad de calentamiento, como así también en la solución amortiguadora utilizada, pueden resultar críticas a la hora de exponer los antígenos. Por esto, se probaron diversas formas de recuperación antigénica (utilizando distintos tampones y tiempos de calentamiento). Específicamente, para lograr una mejor recuperación del antígeno se ensayaron los tampones: Citrato 10 mM pH6, y Tris-EDTA (Tris 10mM pH 9 - EDTA 1mM pH 8,3), calentando a alta potencia en microondas durante tiempos totales de 8 a 20 min. La solución Tris-EDTA resultó más adecuada considerando los parámetros antes enumerados.

Por otra parte, debimos establecer cuál era la dilución de anticuerpo primario anti-PAR3 a utilizar (07-330, Millipore, EE.UU.). De esta manera, se abarcó un rango de diluciones en PBS del anticuerpo primario desde 1:200 a 1:2000. La dilución óptima elegida resultó ser 1:750, y fue seleccionada en base a la obtención de una marcación suficientemente fuerte pero minimizando marcaciones de fondo. Al mismo tiempo, se evaluaron lavados implicando distintos grados de astringencia; seleccionándose, finalmente, a la solución de PBS, de formulación más simple, como solución de lavado.

Así, la evaluación de las distintas combinaciones de los parámetros ensayados nos permitió seleccionar las mejores condiciones para realizar la técnica de IHQ de PAR3. En base a los resultados obtenidos, establecimos el protocolo de IHQ detallado en Materiales y métodos (sección 3.9.7). La marcación optimizada alcanzada en los cultivos organotípicos control desarrollados a partir de PHK se muestra en la Figura 4.1.18. Como puede observarse, dichos cultivos mostraron una distribución de PAR3

mayoritariamente nuclear a nivel de la capa basal, con una localización subcelular también citoplasmática y de mucha menor intensidad en las capas más diferenciadas de los epitelios. Llamativamente, no se evidenció una expresión de PAR3 a nivel de los bordes celulares, tal como esperábamos encontrar teniendo en cuenta: las funciones celulares de PAR3 a nivel de las uniones célula-célula (Goldstein and Macara, 2007), lo reportado en otros tejidos (Bonastre et al., 2015; McCaffrey et al., 2012; Xue et al., 2013) y nuestros estudios previos utilizando técnicas de inmunofluorescencia en células en cultivo (Facciuto et al., 2014). En cambio, observamos tinción positiva para PAR3 en núcleos, especialmente a nivel de las células basales y parabasales. En este sentido, había sido previamente reportada dicha localización nuclear para PAR3, con diversas implicancias en la reparación del ADN en algunas líneas celulares (Facciuto et al., 2014; Fang et al., 2007).



**Figura 4.1.18: Análisis por IHQ de la expresión y localización de PAR3 en cultivos raft.** Se muestra un ensayo representativo de una sección parafinada de cultivo organotípico raft de PHK analizada para la expresión de PAR3 (marrón) usando anticuerpo anti-PAR3 según el protocolo establecido (sección 3.9.7) y contrateñido con hematoxilina. Las flechas azules indican la localización de PAR3 observada en las células basales y parabasales. Barra de tamaño: 10  $\mu$ m.

#### ***Prueba de especificidad de la marcación de PAR3***

A continuación, una vez corroborada la reproducibilidad del ensayo de IHQ para PAR3, dada la marcación predominantemente nuclear y/o citoplasmática, y la ausencia en los contactos celulares que encontramos, nos abocamos a comprobar la especificidad de dicha señal. Esto con el fin último de dar mayor relevancia a los resultados obtenidos hasta el momento. Así, nos planteamos la necesidad de realizar un ensayo de bloqueo

antigénico, en el cual, como se explica en la sección 3.9.7 de Materiales y métodos, se preincuba el anticuerpo primario con el antígeno de interés, para luego utilizarlo en la técnica de IHQ a valorar. Si la detección del antígeno es específica para dicho marcador, se observa una importante disminución en la reacción de tinción correspondiente en el tejido.

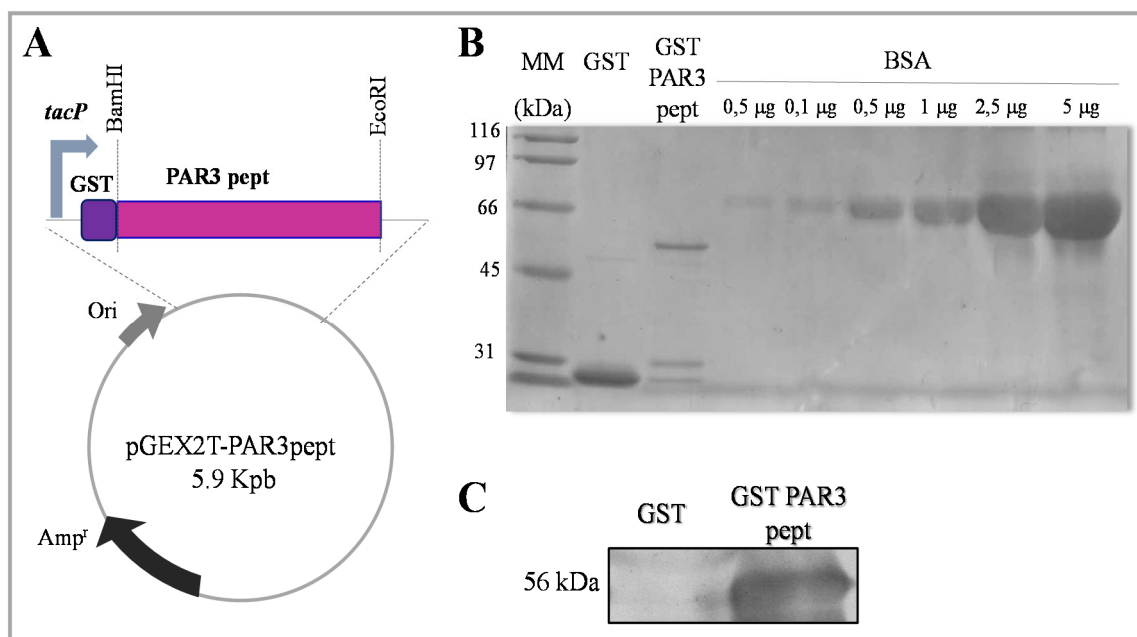
Puesto que no contábamos con un péptido comercial específico para la incubación con el anticuerpo anti-PAR3, procedimos a construir un vector que nos permitiera sobre-expresar la región antigénica reconocida por dicho anticuerpo. Así, en base a la información provista por el proveedor (07-330, Millipore, EE.UU.), las secuencias codificantes para la región aminoacídica utilizada como inmunógeno (PAR3 pept) se clonaron en el vector de expresión bacteriano pGEX-2T (Smith and Johnson, 1988), lo que nos permitiría obtener el antígeno mencionado como péptido de fusión a GST. Esta estrategia se llevó a cabo con el fin de poder obtener el polipéptido purificado por un método simple y en un único paso, mediante la utilización de la resina de afinidad glutatión-agarosa (MACHEREY-NAGEL, Alemania) (Figura 4.1.19.A). Para el clonado mencionado se consideró el marco de lectura y se diseñaron cebadores conteniendo en sus secuencias respectivas sitios de corte para las enzimas de restricción *BamHI* (en el cebador sentido) y *EcoRI* (cebador antisentido), que están también presentes en el sitio de múltiple clonado del vector pGEX-2T (ver sección 3.7.10 de Materiales y métodos), favoreciéndose de esta manera el clonado direccional. La identidad del constructo obtenido fue corroborada por técnicas de biología molecular con cortes con enzimas de restricción y por secuenciación.

A continuación, establecimos las condiciones apropiadas para la expresión y purificación del péptido fusionado a GST (GST-PAR3pept) y de la proteína GST sola a utilizar como control. Como se detalla en la sección 3.9.8 de Materiales y métodos, se indujo la expresión de las proteínas de interés y se obtuvieron los lisados correspondientes a cada uno de los cultivos bacterianos oportunamente inducidos. Después de obtener los extractos proteicos solubles por ruptura con ultrasonido de las células cosechadas y posterior centrifugación, la purificación proteica se llevó a cabo mediante su unión por afinidad a una suspensión de resina de glutatión-agarosa. Finalmente, las muestras se resolvieron en geles de poliacrilamida en condiciones

desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las proteínas fueron detectadas mediante tinción con Coomassie Brilliant Blue (Sambrook, 1989) y la concentración proteica alcanzada se estimó mediante comparación con una escala de cantidades conocidas de BSA utilizada como patrón y sembrada en el mismo gel (Figura 4.1.19.B). A tal fin, se compararon las bandas correspondientes a ambas proteínas purificadas (GST y GST-PAR3pept) con el rango de masas proteicas que abarcaba la mencionada curva de BSA.

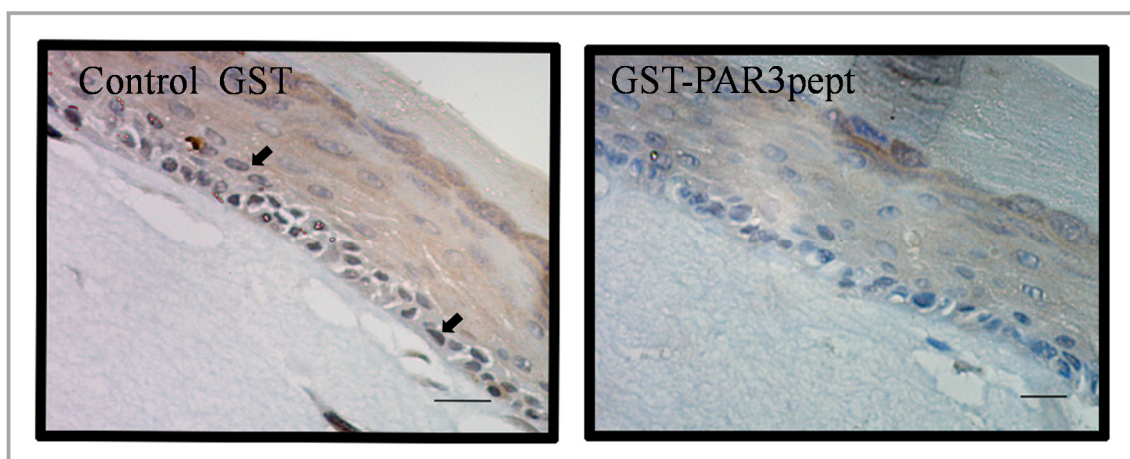
Al mismo tiempo, nos propusimos verificar el reconocimiento específico por parte del anticuerpo anti-PAR3 utilizado en IHQ del polipéptido PARpeptGST, expresado a partir del vector de expresión construido. Dicho reconocimiento fue corroborado mediante análisis por WB, a partir de la proteína purificada y utilizando la proteína GST sola como control negativo. Como se observa en la Figura 4.1.19.C, el anticuerpo anti-PAR3 identificó una banda de alrededor de 56 kDa solo en el caso de la expresión del péptido de fusión. Por lo tanto, luego de haber verificado el reconocimiento específico del anticuerpo y determinar las concentraciones obtenidas del péptido fusión GST-PAR3pept y GST, nos abocamos a realizar el ensayo de bloqueo antigénico, siguiendo los pasos detallados en la sección 3.9.7 de Materiales y métodos (Bancroft and Gamble, 2008).

Para dicho bloqueo, cantidades iguales de cada proteína se incubaron por una hora a temperatura ambiente y en agitación con el anticuerpo primario anti-PAR3. Posteriormente, se llevó a cabo el protocolo de IHQ optimizado utilizando estas soluciones de anticuerpo previamente sometidos a la interacción con la proteína (específica e inespecífica según correspondiera). Es importante aclarar en este punto que, para verificar la especificidad de reacción ensayada, la tinción obtenida cuando se pre-incuba el anticuerpo primario con el péptido de interés purificado (en este caso GST-PAR3pept) deber ser de una intensidad significativamente menor a aquella observada para el control, en el cual se incubaba al anticuerpo con una proteína inespecífica (en este caso GST).



**Figura 4.1.19: Expresión y purificación de la región antigénica de PAR3 reconocida por el anticuerpo utilizado en los ensayos de IHQ.** A) Representación esquemática del vector obtenido para la expresión de PAR3 pept fusionado a GST. Se indican los sitios de restricción del vector utilizados en el clonado. B) Inducción y purificación de las proteínas de interés. Las proteínas purificadas con resina de afinidad glutatión-agarosa se resolvieron mediante SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12%. En cada calle se sembraron 15 µl de resina unida a las proteínas, agregándose un volumen de solución de siembra adecuado. Se muestra también la escala de cantidades conocidas de BSA que sirvió como patrón para estimar la cantidad de proteínas de fusión purificadas. MM, Marcador de masa molecular. C) Reconocimiento específico del péptido GST-PAR3pept por parte del anticuerpo utilizado en los estudios de IHQ. Las proteínas purificadas y sometidas a SDS-PAGE se transfirieron y se revelaron utilizando el anticuerpo anti-PAR3 (07-330, Millipore, EE.UU.).

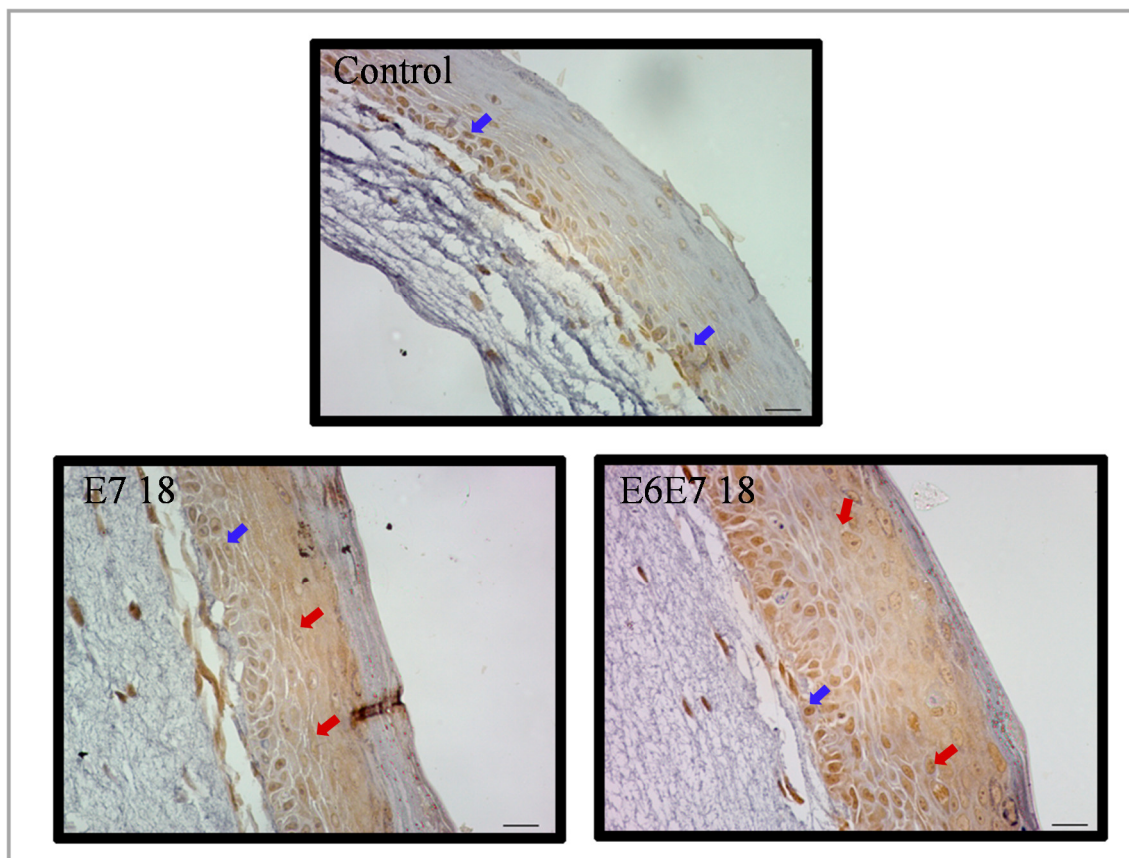
El ensayo completo se realizó por duplicado, utilizando cultivos organotípicos de PHK (control). Los resultados, que se presentan en la Figura 4.1.20, mostraron una marcación de PAR3 muy disminuida sólo para el caso de la pre-incubación del anticuerpo con el péptido GST-PAR3pept, no siendo este el caso para la tinción control pre-incubando el anticuerpo con la proteína GST. Estas observaciones sugieren que la marcación para PAR3 observada, predominantemente nuclear y/o citoplasmática, sería específica.



**Figura 4.1.20. Análisis de la especificidad de la marcación para PAR3 mediante ensayo de bloqueo antigénico.** Se muestran secciones de *raft* de PHK que fueron utilizadas en paralelo para la prueba del protocolo de IHQ para PAR3 (marrón) pre-incubando el anticuerpo primario anti-PAR3 con las proteínas purificadas GST y GST-PAR3pept. Los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina. Las flechas negras indican la marcación de PAR3 en los cultivos control, que se pierde al pre-incubar el anticuerpo con el péptido específico. Barra de tamaño: 10  $\mu$ m.

#### ***4.1.2.1.2 Análisis del efecto de la expresión de proteínas de HPV-18 en el patrón de expresión de PAR3***

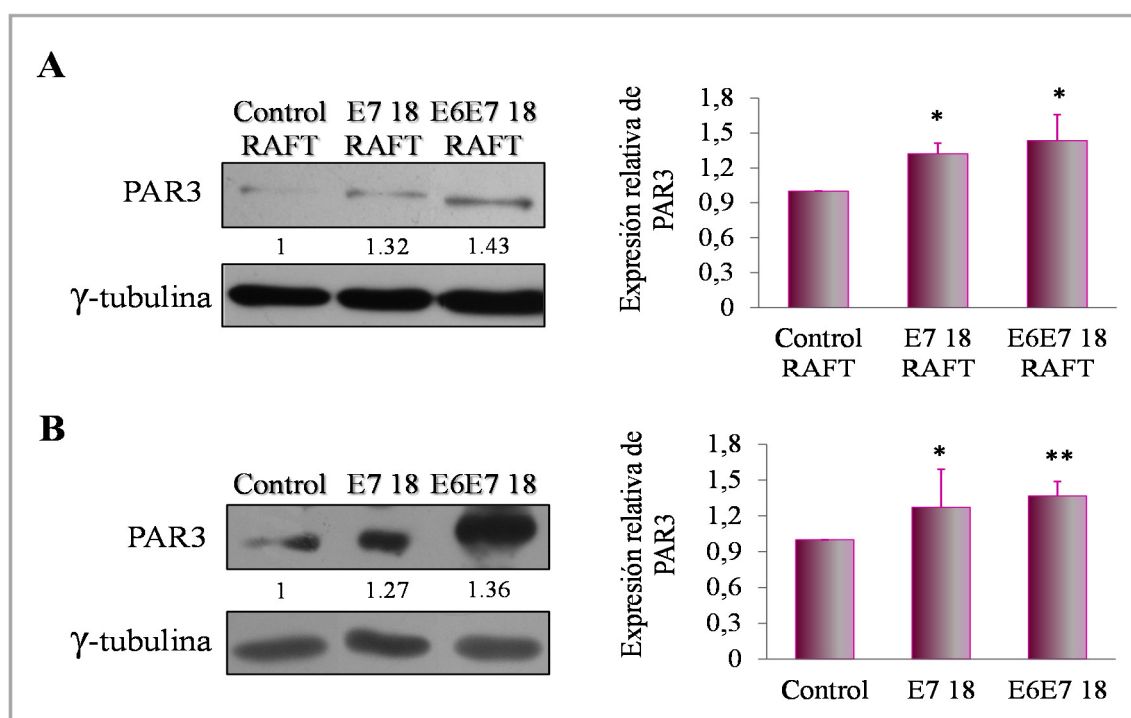
Habiendo corroborado el reconocimiento específico de PAR3 por parte del anticuerpo primario utilizado en los ensayos de IHQ, a continuación llevamos a cabo el análisis del patrón de expresión de PAR3 en los cultivos organotípicos expresando proteínas virales, y que fueran previamente analizados para la expresión de la proteína de polaridad DLG1. Por lo tanto, utilizando el protocolo de IHQ previamente detallado, nos abocamos a estudiar la expresión de PAR3 en presencia de las oncoproteínas E7 y E6/E7 de HPV-18, con el fin de detectar posibles interferencias en dicha expresión por parte de las proteínas virales con respecto al control. Como puede observarse en la Figura 4.1.21, PAR3 presentó mayor nivel de expresión en los cultivos E7 18 y E6E7 18 que en los *raft* control. Además, la expresión de PAR3 tuvo lugar en todos los estratos de los epitelios y no sólo en los estratos basales. A su vez, la localización de PAR3 resultó ser tanto nuclear como citoplasmática. Nuevamente, no pudimos identificar una tinción a nivel de bordes celulares.



**Figura 4.1.21: Análisis por IHQ de la expresión y localización de PAR3 en cultivos *raft* control, E7 18 y E6E7 18.** Se muestran secciones parafinadas de los cultivos que fueron analizados para la expresión de PAR3 (marrón) usando anticuerpo anti-PAR3 según el protocolo (sección 3.9.7) y contrateñidos con hematoxilina. Las flechas azules indican la localización de PAR3 en las células basales en los cultivos control como en aquellos expresando las proteínas virales. Las flechas rojas muestran la expresión de PAR3 en núcleo y citoplasma en todo el espesor del epitelio en los cultivos E7 18 y E6E7 18. Barra de tamaño: 10  $\mu$ m.

Dado que los ensayos de IHQ mostraban cambios en la abundancia de PAR3 en presencia de las proteínas virales, decidimos evaluar los niveles de dicha proteína celular mediante los ensayos más cuantitativos de WB. Para ello, utilizamos extractos de proteínas derivados de los diferentes cultivos organotípicos, aplicando la metodología detallada en la sección 3.9.8 de Materiales y métodos. Los resultados correspondientes que se presentan en la Figura 4.1.22.A muestran que las proteínas E7 y E6/E7 de HPV-18 fueron capaces de incrementar significativamente los niveles de PAR3, al comparar con los cultivos control. El hecho de que PAR3 se exprese en todos los estratos epiteliales podría estar vinculado con los niveles de expresión total de PAR3 encontrados en estos ensayos de WB.

En consecuencia, decidimos evaluar si la presencia de las proteínas de HPV-18 podría estar implicada en la regulación de los niveles de PAR3, en una forma independiente del contexto del tejido. Para ello, como se explicó anteriormente, indujimos la expresión de las proteínas virales en células epiteliales en cultivo (HEK293), transfectando con los correspondientes vectores de expresión para una o ambas proteínas virales (E7 o E6/E7) y obteniendo los extractos proteicos correspondientes. Luego, mediante ensayos de WB, evaluamos la abundancia de PAR3 en cada caso. Como puede apreciarse en la Figura 4.1.22.B, la presencia de E7 sola o junto a E6 de HPV-18 provocó un aumento en los niveles de PAR3, en concordancia con lo observado también mediante los cultivos *raft*.

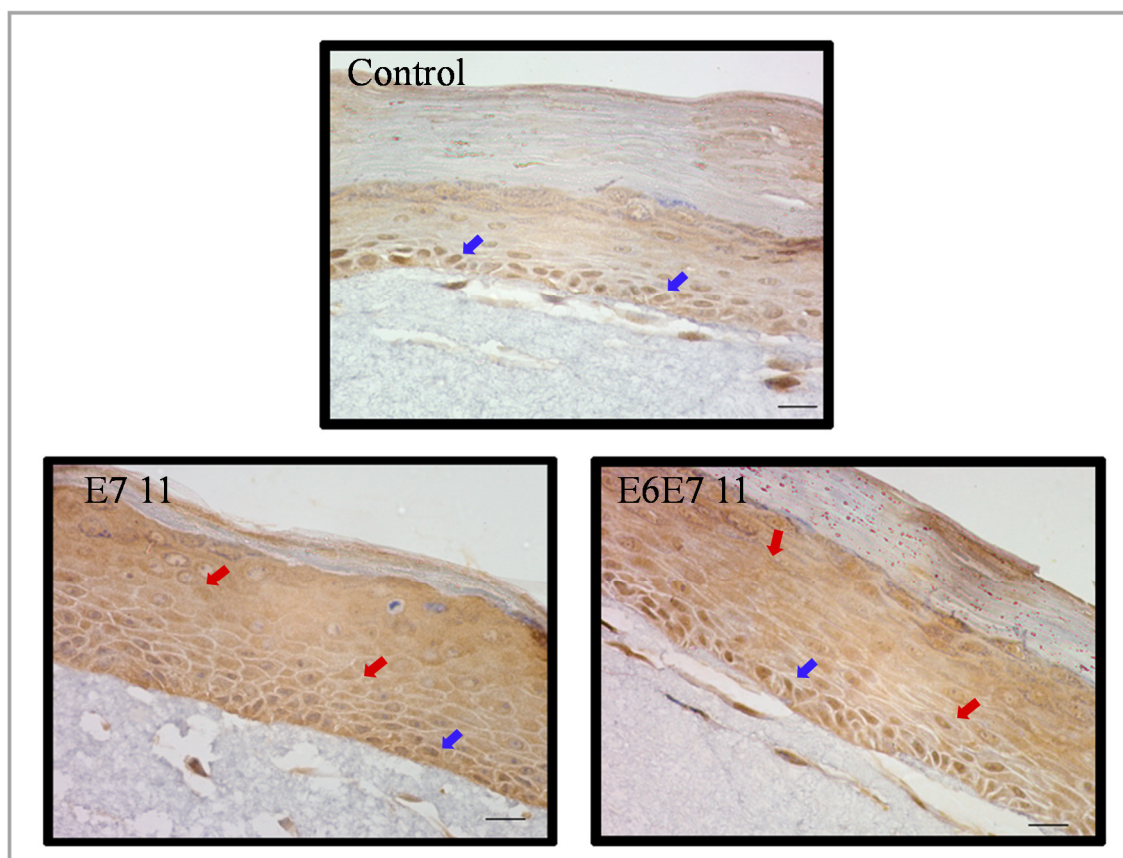


**Figura 4.1.22: Estudio por WB de los niveles de expresión de PAR3 en presencia de las proteínas E7 y E6/E7 de HPV 18.** A) Extractos proteicos de cultivos *raft* control o realizados a partir de PHK expresando E7 o E6/E7 de HPV-18 fueron analizados para la expresión de PAR3. Se sembraron 60  $\mu$ g de proteína en cada caso;  $\gamma$ -tubulina fue utilizada como control de carga. B) Extractos proteicos de las células transfectadas con los vectores de expresión para E7 o E6/E7 de HPV-18 se analizaron para determinar los niveles de expresión de PAR3. Se sembraron 100  $\mu$ g de proteína;  $\gamma$ -tubulina fue utilizada como control de carga. Los números representan los cambios en la intensidad de banda correspondiente a PAR3 en cultivos *raft* (A) o células (B) expresando proteínas virales y en forma relativa al control correspondiente (sin expresión de proteínas virales, considerado 1). En ambos casos, a la derecha se muestra gráficamente el análisis por densitometría de los WB para los niveles de PAR3 en forma relativa al control y considerando el control de carga  $\gamma$ -tubulina, en cada condición (media  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ ). Se indican con asteriscos el aumento significativo en los niveles de expresión de DLG1 en presencia de las correspondientes proteínas virales (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

Así, si bien en los experimentos detallados anteriormente no se pudo evidenciar la localización característica de PAR3 a nivel de los bordes celulares, tanto los ensayos de IHQ como de WB indicaron que las proteínas de HPV-18 pueden inducir un aumento significativo en los niveles de expresión de la proteína celular, lo cual podría tener implicancias importantes en el desarrollo de las patologías asociadas a las infecciones por HPV, como reportado en otros casos (Iden et al., 2012).

#### ***4.1.2.1.3 Análisis del efecto de la expresión de proteínas de HPV-11 en el patrón de expresión de PAR3***

Habiendo encontrado que los niveles y localización de PAR3 se veían alterados en presencia de proteínas de HPV-18 de alto riesgo, continuamos nuestros estudios analizando el probable efecto de las proteínas de HPV-11 de bajo riesgo oncogénico, sobre dicha proteína celular. Por lo tanto, evaluamos la expresión de PAR3 en los distintos cultivos *raft* desarrollados mediante la técnica de IHQ optimizada. Los resultados, que se presentan en la Figura 4.1.23, muestran nuevamente la tinción de PAR3 previamente descrita para los cultivos control, principalmente en los núcleos de las células basales. Además, se observaron cambios importantes en su expresión en presencia de E7 y E6/E7 de HPV-11. Se observó un aumento general pronunciado en la abundancia de PAR3 principalmente a nivel citoplasmático y en todos los estratos epiteliales. Estos resultados se diferencian notablemente de lo observado en los *raft* control, que presentaron una menor expresión de PAR3 y preferentemente a nivel de las capas inferiores, menos diferenciadas.

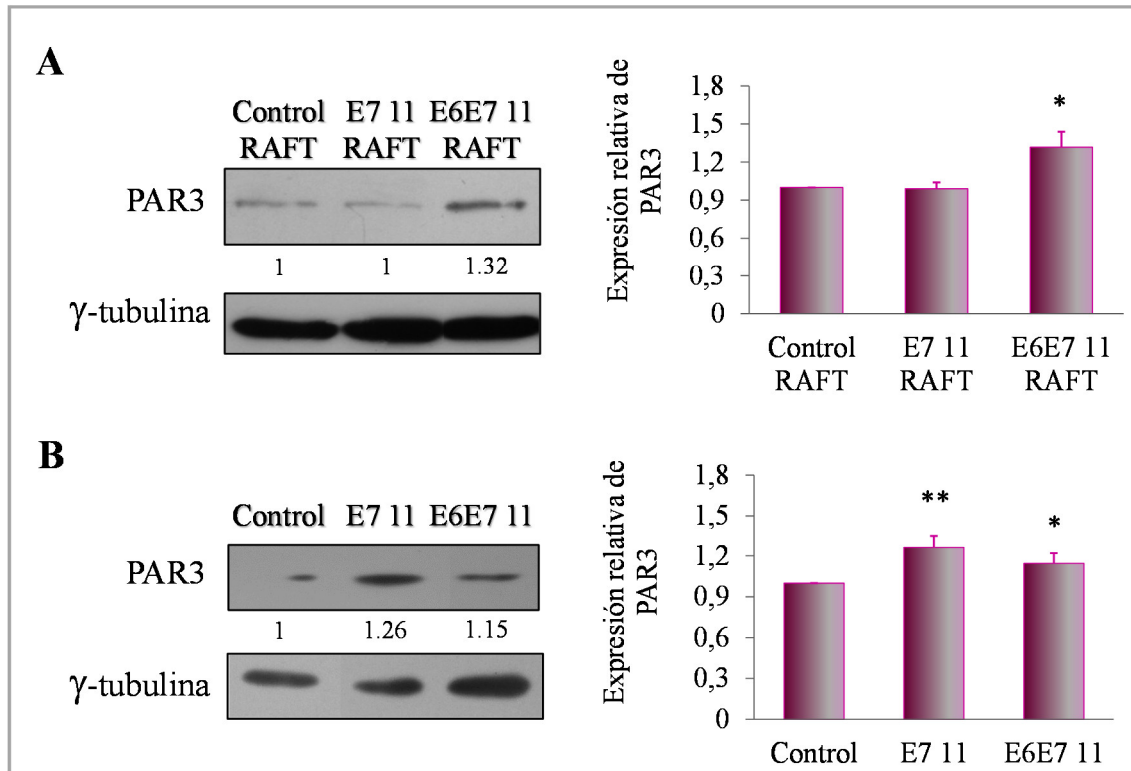


**Figura 4.1.23: Análisis por IHQ de la expresión y localización de PAR3 en cultivos raft control, E7 11 y E6E7 11.** Se muestran secciones parafinadas de los cultivos que fueron analizados para la expresión de PAR3 (marrón) usando anticuerpo anti-PAR 3 según el protocolo (sección 3.9.7) y contrateñidos con hematoxilina. Las flechas azules indican la localización de PAR3 en las células basales en los cultivos control como en aquellos expresando las proteínas virales. Las flechas rojas muestran la expresión de PAR3 en núcleo y citoplasma a lo ancho de todo el epitelio en los cultivos E7 11 y E6E7 11. Barra de tamaño: 10  $\mu\text{m}$ .

Ante estas observaciones en los ensayos de IHQ, estudiamos luego mediante la técnica de WB los probables cambios en la abundancia de PAR3 en presencia de E7 y E6/E7 de HPV-11. Como se muestra en la Figura 4.1.24.A, en los cultivos E6E7 11 se observó un incremento significativo en los niveles de expresión de PAR3. Sorprendentemente, estos ensayos no fueron capaces de poner en evidencia el aumento en los niveles de PAR3 que habíamos observado previamente en los cultivos E7 11 mediante la técnica de IHQ.

A continuación, con el objeto de estudiar el potencial efecto de las proteínas de HPV-11 en los niveles de expresión de PAR3 en el orden intracelular, se transfectaron células HEK293 con los plásmidos correspondientes para la expresión de E7 y E6/E7 de HPV-11, tal como se detalló anteriormente cuando fue evaluada la expresión de la

proteína de polaridad DLG1 (sección 4.1.1.2.3 y figura 4.1.15). Como se puede apreciar en la Figura 4.1.24.B, tanto la expresión de E7 como de E6/E7 de HPV-11 en las mencionadas células en cultivo fue capaz de inducir aumentos significativos en los niveles de expresión de PAR3.



**Figura 4.1.24: Estudio por WB de los niveles de expresión de PAR3 en presencia de las proteínas E7 y E6/E7 de HPV-11.** A) Extractos proteicos de cultivos *raft* control o realizados desde PHK expresando E7 o E6/E7 de HPV-11 fueron analizados para la expresión de PAR3. Se partió de 60  $\mu$ g de proteína en cada caso;  $\gamma$ -tubulina fue utilizada como control de carga. B) Extractos proteicos de las células transfectadas con los vectores de expresión para E7 o E6/E7 de HPV-11 se analizaron para determinar los niveles de expresión de PAR3. Se partió de 100  $\mu$ g de proteína;  $\gamma$ -tubulina fue utilizada como control de carga.

Los números representan los cambios en la intensidad de banda correspondiente a PAR3 en cultivos *raft* (A) o células (B) expresando proteínas virales y en forma relativa al control correspondiente (sin expresión de proteínas virales, considerado 1). En ambos casos, a la derecha se muestra gráficamente el análisis por densitometría de los WB para los niveles de PAR3 en forma relativa al control y considerando el control de carga  $\gamma$ -tubulina (media  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ ). Se indican con asteriscos el aumento significativo en los niveles de expresión de DLG1 en presencia de las correspondientes proteínas virales (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

En resumen, tanto la expresión de proteínas de HPV-18 como de HPV-11 se asociaron de igual manera a cambios en la expresión de PAR3. En consecuencia, estas observaciones indicarían un probable mecanismo común de alteración de la mencionada proteína celular por ambos tipos virales. De la misma forma, los resultados detallados

previamente evidenciaron también una regulación de la proteína DLG1 por parte de HPV de alto y bajo riesgo oncogénico. Por lo tanto, en conjunto, los datos aquí planteados sugieren la existencia de mecanismos de regulación de diferentes proteínas de polaridad por parte de proteínas de HPV, lo que podría tener importantes implicancias en las correspondientes infecciones virales y en las patologías asociadas.

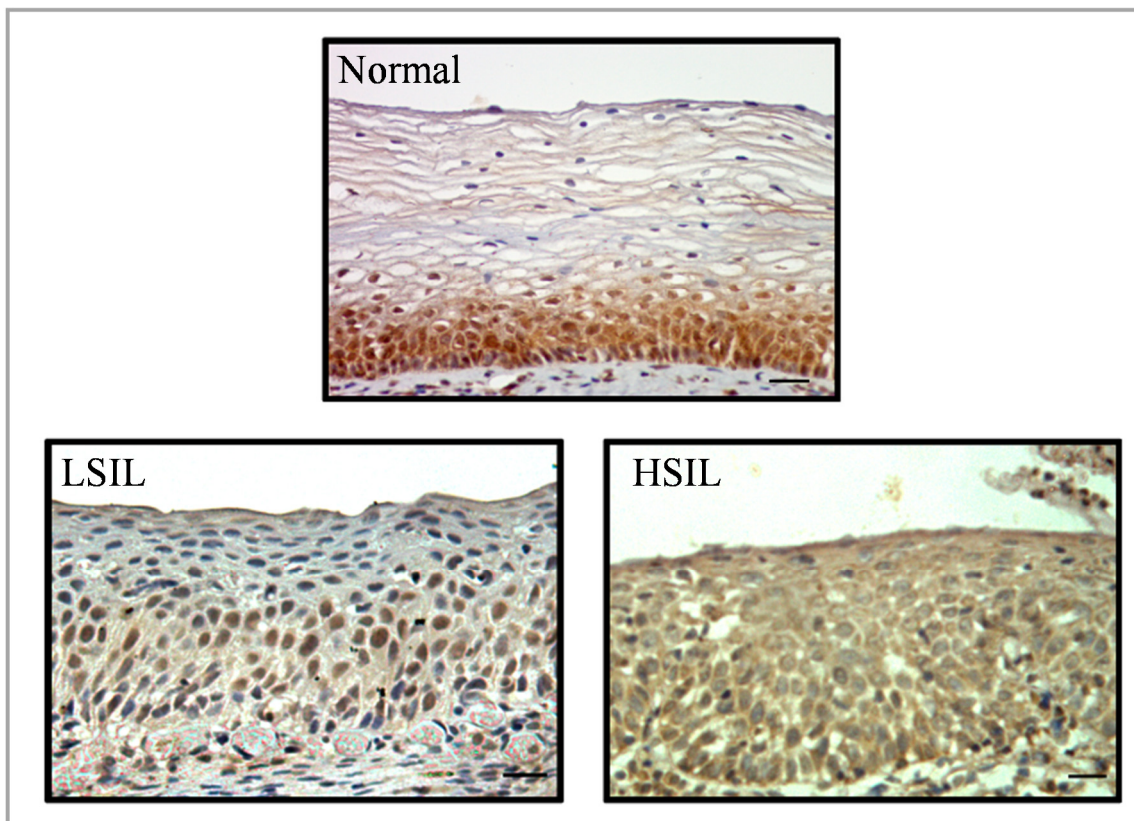
#### **4.1.2.2 Estudio de la expresión de PAR3 en biopsias cervicales: análisis preliminares**

Teniendo en cuenta el efecto de las proteínas virales observado para tejidos organotípicos, quisimos evaluar las posibles alteraciones de PAR3 en lesiones asociadas a infecciones por HPV. De esta forma, continuamos estudiando la incumbencia de las proteínas virales en la modulación de la expresión de PAR3 y su probable significancia en la progresión maligna.

Si bien ha sido señalada la importancia de PAR3 en la progresión-tumoral y metástasis, se han planteado controversias en cuanto a su rol como oncosupresor. Así, se ha sugerido una probable dependencia de su función con el entorno y tipo tumoral (Bonastre et al., 2015; Iden et al., 2012; McCaffrey et al., 2012; Xue et al., 2013). Por lo tanto, considerando los resultados presentados hasta el momento nos propusimos analizar la expresión de PAR3, blanco de HPV, en cortes histológicos provenientes de mucosa cervical.

Aplicamos el protocolo de IHQ para detección de PAR3 previamente optimizado a 3 biopsias de mucosa ecto-cervical, cada una de las cuales presentaba regiones correspondientes a tejido normal o SIL. Las muestras analizadas fueron cedidas y clasificadas histológicamente por la Dra. Ana Lía Nocito de la Cátedra de Anatomía y Fisiología Patológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Rosario. Como se puede observar en la Figura 4.1.25, PAR3 mostró una marcación nuclear y citoplasmática en los tejidos normales, y dicha marca se focalizó especialmente en los estratos menos diferenciados; resultados que concuerdan con la marcación obtenida para tejidos *raft* control. Estas observaciones en tejido cervical, al igual que en el caso de los tejidos organotípicos, sugieren que la diferenciación celular podría asociarse a cambios en la expresión de PAR3.

Posteriormente, analizamos los patrones de expresión y distribución de PAR3 en el epitelio cervical en biopsias asociadas a las distintas lesiones para evaluar las posibles variaciones respecto a los datos obtenidos para mucosa normal (Figura 4.1.25). Las biopsias de lesiones cervicales de distinta severidad mostraron en todos los casos también una marcación nuclear y citoplasmática de PAR3. De manera interesante, dicha proteína celular se observó en todos los estratos epiteliales en dichas lesiones, incluyendo también los estratos superiores. En particular en las muestras de HSIL, la marcación de PAR3 resultó significativamente aumentada tanto en comparación al control como a las lesiones de menor severidad. Estos hallazgos son reminiscentes de lo encontrado para los cultivos organotípicos expresando las proteínas de HPV, avalando por tanto nuestros resultados previos.



**Figura 4.1.25: Análisis por IHQ de la expresión de PAR3 en biopsias cervicales.** Se muestran secciones parafinadas de los cultivos que fueron marcados para la expresión de PAR3 (marrón) y contrateñidos con hematoxilina. Se observa una expresión nuclear y citoplasmática de PAR3 en los estratos menos diferenciados de los tejidos normales. En las muestras LSIL y HSIL se observó una tinción nuclear y citoplasmática de PAR3 pero en todo el epitelio. Dicha marcación presentó zonas más y menos intensas en los casos de carcinomas invasores. Barra de tamaño: 10  $\mu\text{m}$ .

El presente es un estudio preliminar dado el pequeño número de biopsias analizadas. No obstante, consideramos que las observaciones realizadas pueden resultar de relevancia para comprender los resultados ya descritos y delinear los futuros objetivos en el tema. Como se discutirá en profundidad a continuación, estos resultados contribuyen a comprender el rol de la mencionada proteína celular durante las infecciones virales y, más aún, durante la progresión maligna cervical.

## **4.2 CAPÍTULO 2: Estudio de la expresión génica de HPV en el microambiente epitelial**

Durante el ciclo viral de HPV, así como en el desarrollo de las lesiones neoplásicas asociadas a su infección, las proteínas virales se expresan diferencialmente a lo largo del epitelio escamoso (Doorbar et al., 2015). Particularmente, como se detalló en la sección 1.2.5 de la Introducción, una característica común a muchos HPV de alto riesgo es el patrón de *splicing* que se observa en el caso de los transcritos tempranos (Schneider-Gadicke and Schwarz, 1986). El procesamiento del correspondiente preARNm policistrónico conduce a la traducción de las distintas proteínas funcionales, E7, E6FL y E6\*, forma truncada de la oncoproteína E6 (Pim et al., 2009; Rosenberger et al., 2010). Así, nos resultó de gran interés estudiar la expresión génica viral en el contexto de los cultivos organotípicos desarrollados por nuestro grupo, y de esta manera poder comprender más profundamente la regulación de blancos celulares.

### **4.2.1 Análisis del *splicing* de los transcritos tempranos de HPV-18**

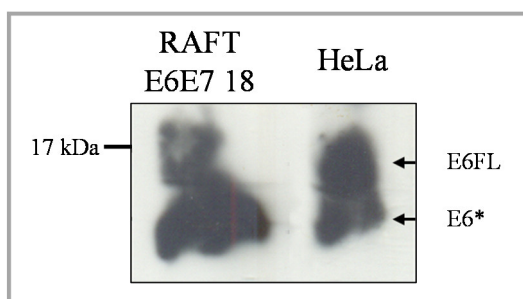
Conocer la expresión de las proteínas de HPV en el contexto del epitelio podría ser de gran ayuda, a fin de comprender los cambios en los blancos celulares que se producen como consecuencia de la presencia viral. Ejemplo de estas alteraciones son los cambios en la expresión de proteínas de polaridad, que fueron estudiados en detalle en el Capítulo 1 del presente Trabajo de Tesis.

Así, para conocer más profundamente la expresión de los genes de HPV en los cultivos *raft* que habíamos desarrollado, nos propusimos analizar la expresión de las isoformas de la proteína viral E6 en los cultivos E6E7 18. Esto considerando que la regulación del mencionado *splicing* en el contexto de la infección, así como la función respectiva de cada isoforma de E6 en los distintos estratos del epitelio, aún no han sido esclarecidos totalmente (Heer et al., 2011; Pim et al., 2009; Rosenberger et al., 2010). Asimismo, la información disponible resulta controversial en algunos casos y si bien ha sido reportada la expresión diferencial de ambas isoformas, aún no se conoce con

precisión la relación en que se expresan E6FL y E6\*, especialmente en el microambiente epitelial.

Como se detallara anteriormente, muy poco se conoce acerca del efecto que tiene la relación entre ambas isoformas virales sobre los blancos celulares de HPV. En este sentido, se han informado tanto funciones sinérgicas como antagónicas para E6FL y E6\* (Filippova et al., 2007; Pim and Banks, 1999; Pim et al., 2009; Storrs and Silverstein, 2007); a la vez que ha sido propuesto que el evento de *splicing* sería importante para la regulación de la expresión y la función de E6 (Pim and Banks, 1999). Por lo tanto, conocer más acerca de la expresión viral a partir del evento de *splicing* es de gran importancia a la hora de estudiar los efectos sobre proteínas celulares, como ser las proteínas de polaridad.

Para estudiar la expresión de ambas isoformas de E6 (E6FL y E6\*) en los epitelios estratificados E6E7 18 previamente generados, utilizamos la metodología de WB mediante el anticuerpo no comercial anti-E6 de HPV-18 (Arbor Vita Corporation; EE.UU.). Los resultados, que se presentan en la Figura 4.2.1, mostraron el reconocimiento de ambas isoformas en los extractos provenientes de la línea celular HeLa (HPV positiva, derivada de carcinoma cervical), como era esperado (Schneider-Gadicke et al., 1988), mientras que en los *raft* E6E7 18 se observó una expresión mayoritaria de la isoforma E6\*.



**Figura 4.2.1: Estudio por WB de la expresión de las isoformas de la proteína E6 en los cultivos *raft* E6E7 18.** Extractos proteicos de cultivos organotípicos E6E7 18 o de la línea celular HeLa se analizaron para estudiar la expresión de la proteína E6 y analizar la abundancia de cada una de las isoformas (E6FL y E6\*). En cada caso se partió de 100 µg de proteína.

En este punto, es interesante aclarar que ha sido reportado que el producto del procesamiento del preARNm conteniendo E6\* es requerido para la correcta expresión de E7, corriente abajo (Sedman et al., 1991; Tang et al., 2006). Por tanto, los resultados

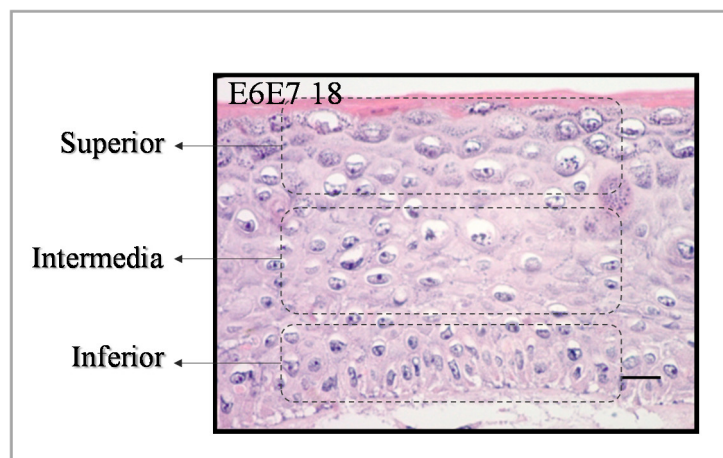
presentados en la Figura 4.2.1 concuerdan con lo esperado para un cultivo organotípico expresando activamente la oncoproteína viral E7.

Así, como se detalló en la sección 1.2.3 de la Introducción, durante la infección de HPV las distintas proteínas virales, tanto tempranas como tardías, restringen su expresión a determinadas capas epiteliales (Wang et al., 2011). Sin embargo, en estadios avanzados de la progresión tumoral se evidencia una expresión desregulada de los oncogenes virales, lo que es considerado un factor clave en el desarrollo de los tumores asociados (Doorbar, 2006; Doorbar et al., 2015). Por ello, consideramos de gran relevancia conocer la expresión viral en los distintos estratos de los cultivos organotípicos previamente generados en este trabajo de Tesis, y en particular estudiar de qué forma tiene lugar el evento de *splicing* del transcripto temprano en dichos cultivos *raft*.

En este sentido, ha sido planteado que el procesamiento del preARNm y los efectos de las correspondientes proteínas virales E6 FL, E6\* y E7 deben ser considerados en forma inter-relacionada, dado que las tres proteínas se expresarían en forma conjunta durante el ciclo de vida del HPV (Pim et al., 2009). Además, sólo algunos reportes han podido detectar E6\* por WB y actualmente no se cuenta con anticuerpos específicos para cada una de las isoformas, que puedan ser utilizados en ensayos de IHQ. Por lo tanto, los análisis realizados hasta el momento para el estudio de la expresión de las isoformas de E6 se han focalizado en la detección de los transcriptos correspondientes o subrogados. Más aún, la mayoría de los reportes se refieren al HPV-16 (Heer et al., 2011; Hong et al., 2015), mientras que es mínimo el número de investigaciones focalizadas en el HPV-18, tipo viral de mayor interés para nuestro grupo.

Así, para conocer la mencionada expresión viral en los distintos estratos de los cultivos organotípicos generados, hicimos uso de la metodología de LCM (sección 3.7.3 de Materiales y métodos). En primera instancia, como se esquematiza en la Figura 4.2.2, delimitamos sobre muestras de cultivos *raft* E6E7 18 las zonas correspondientes a la capa Inferior (estratos basal y parabasal), a la capa Intermedia (estrato escamoso) y a la capa Superior (estratos granular y córneo). Las muestras de dichos *raft* fijadas y parafinadas fueron disectadas y procesadas hasta la obtención del ADNc correspondiente, por el servicio de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas de la Universidad Nacional del

Litoral (Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, LETH). Las muestras así obtenidas fueron dispuestas para su análisis por qPCR.



**Figura 4.2.2:** Esquema de las capas epiteliales diseccionadas mediante LCM. En forma representativa se muestra una sección del cultivo E6E7 18 y se indican en línea punteada cada una de las zonas seleccionadas para su disección: Inferior, Intermedia y Superior. Barra de tamaño 10  $\mu\text{m}$ .

Para estudiar la expresión de las isoformas de E6 de HPV-18 mediante RT-qPCR, se diseñaron dos pares de cebadores que permitieran la amplificación específica y diferencial de ambas variantes, como se esquematiza en la Figura 4.2.3.A. A partir de dicho diseño, se establecieron los parámetros óptimos para cada reacción y, una vez lograda dicha optimización, se corroboró la eficiencia alcanzada en cada caso. Por último, los ensayos fueron validados utilizando plásmidos específicos para cada una de las isoformas de E6. Las condiciones de reacción, ciclados y el diseño de los cebadores se encuentran detallados en la sección 3.7.10 de Materiales y métodos. Todas las correspondientes etapas de diseño, optimización y validación de las mencionadas reacciones de amplificación fueron realizadas en conjunto con el Sr. Guido Barbieri, formando parte del su Trabajo de Tesina, desarrollado bajo mi co-dirección. Esta herramienta molecular para discernir entre la expresión de E6\* y E6FL de HPV-18 cobra mayor relevancia, al no haberse reportado hasta el momento métodos para cuantificar diferencialmente ambas isoformas de dicho tipo viral.

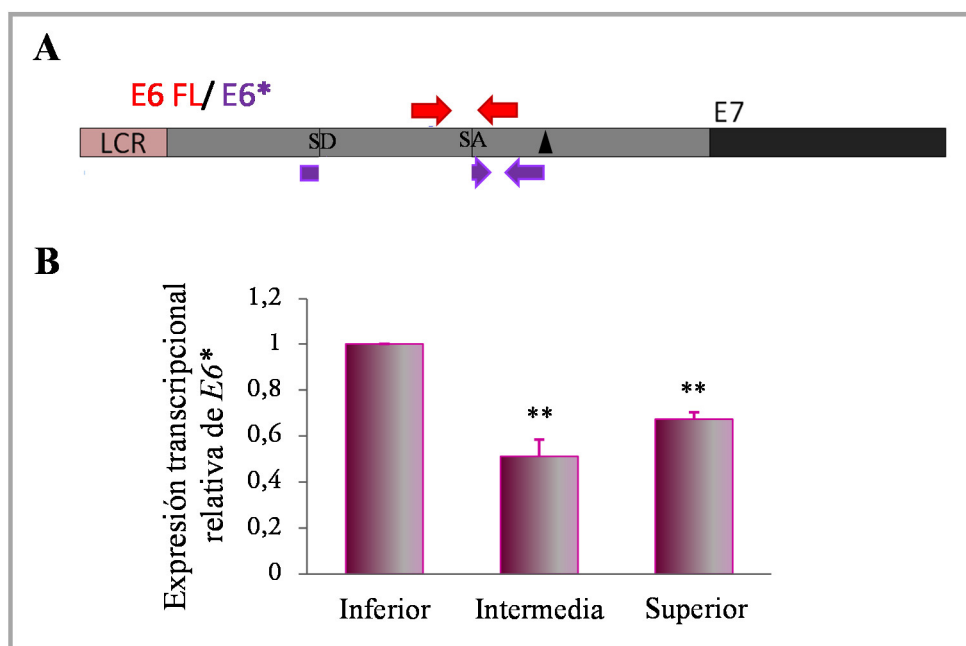
Para la detección específica del transcripto correspondiente a E6\* el cebador sentido fue complementario a regiones correspondientes a los sitios donador y aceptor del *splicing*. De esta manera, se lograron distinguir los productos esperados de la RT-qPCR de la amplificación a partir de ADN genómico probablemente contaminante. Esta

estrategia no fue posible para el diseño de cebadores correspondiente a E6 FL, por lo que se incluyeron controles sin enzima (-RT) para descartar la presencia de ADN genómico.

Lamentablemente, al analizar mediante qPCR las muestras de ADNc de cada una de las capas obtenidas por LCM de los cultivos organotípicos E6E7 18, dichas muestras presentaron un rendimiento relativamente bajo. Esto fue evidenciado mediante la amplificación del gen de referencia 18S, que presentó altos valores de CT en las muestras producto de LCM, en comparación a controles de líneas celulares. Como resultado, las reacciones previamente optimizadas para la detección de los transcritos correspondientes a la isoforma E6 FL no dieron lugar a amplificaciones en las muestras disectadas. Los análisis de los ensayos de qPCR demostraron que tales amplificaciones no se diferenciaban de los controles negativos de reacción como para poder ser consideradas productos de amplificación fehacientes. Así, no pudimos determinar la expresión de la isoforma E6 FL en las muestras de LCM debido, muy probablemente, a la baja recuperación de material en las muestras de LCM.

En cambio, al analizar en dichas muestras los transcritos correspondientes a la isoforma E6\*, la mayor abundancia de los mismos permitió su cuantificación. Se obtuvieron los resultados presentados en la Figura 4.2.3.B, observándose que dichos transcritos se expresaban en todas las capas epiteliales ensayadas. Esta mayor expresión de E6\* en relación a los transcritos E6FL (los cuales no pudieron ser determinados mediante esta metodología) está de acuerdo a lo esperado en cultivos expresando activamente la proteína E7 de HPV y a nuestras observaciones al analizar la abundancia proteica de E6 (Figura 4.2.1). Además, los transcritos correspondientes a E6\*, se encontraron en mayor cantidad en la capa Inferior del epitelio.

Es importante destacar que dicho evento de *splicing* conservado, además de asociarse a elevados niveles de expresión de E6\*, genera un incremento de la transcripción del oncogen E7 corriente abajo (Heer et al., 2011; Tang et al., 2006). Por lo tanto, los resultados presentados indicarían una expresión de los genes virales en todos los estratos epiteliales. Más aún, se expresarían en mayor proporción en las células basales en comparación a las capas superiores de los cultivos *raft* analizados.



**Figura 4.2.3: Análisis de la expresión de transcritos virales en cultivos organotípicos E6E7 18.** A) Se muestra la organización del preARNm codificante para E7, E6FL y E6\*. Con flechas rojas y violetas se indica la localización de los cebadores diseñados para para la detección por RT-qPCR de los transcritos de E6FL y E6\*, respectivamente. Además, se señalan los sitios donador (SD) y aceptor (SA) del *splicing*, junto al codón de terminación prematuro (triángulo). B) Se muestran los resultados de los experimentos de RT-qPCR (media  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ ) para el transcrito codificante para E6\* en las tres capas del epitelio E6E7 18, habiéndose utilizado el gen 18S como gen de referencia. Los datos se expresan en forma relativa a la capa Inferior (arbitrariamente considerada 1). Se indica con asteriscos la reducción significativa de la expresión del transcrito en las capas Intermedia y Superficial respecto a la capa Inferior (\*\*  $p < 0.01$ ).

Como se profundiza en la Discusión, estos resultados preliminares constituyen el punto de inicio de nuevas estrategias que están siendo abordadas para conocer en más detalle la expresión génica viral en particular en lo referente a la expresión de las isoformas de E6 y sus consecuencias a nivel de los blancos de HPV.

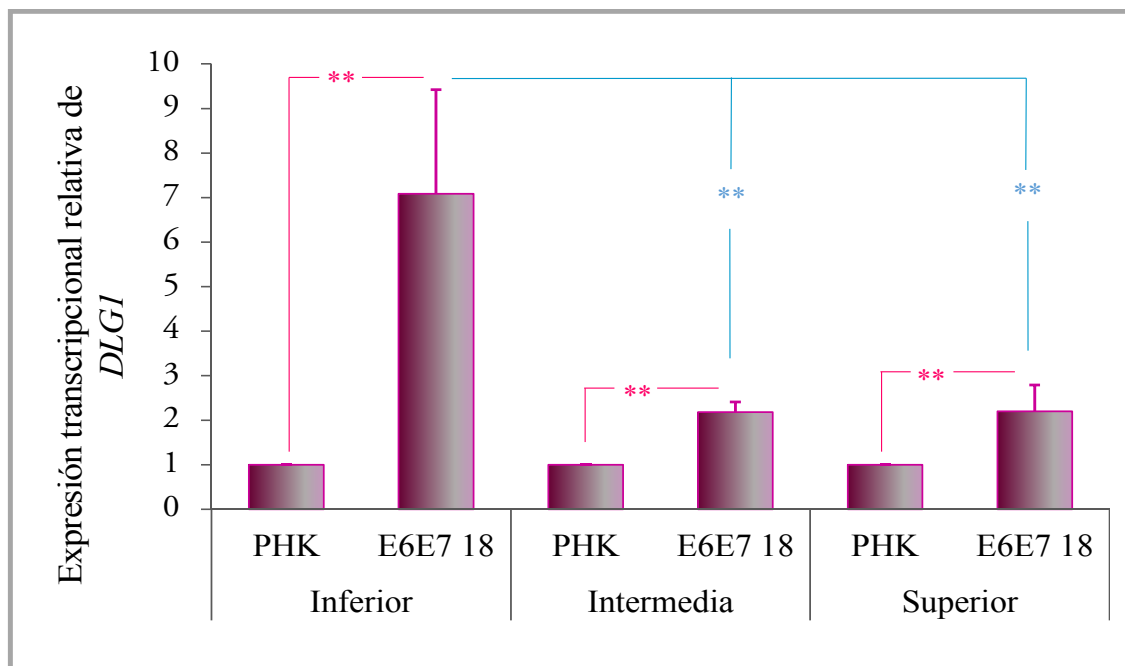
#### 4.2.2 Análisis transcripcional de DLG1, blanco celular de HPV, en los estratos epiteliales de cultivos *raft*

Habiendo analizado la expresión génica viral en los cultivos organotípicos E6E7 18, a continuación nos propusimos indagar en la posible relación de dicha expresión con la transcripción de los blancos celulares de HPV en los diferentes estratos epiteliales.

En particular, estudiamos el blanco DLG1, proteína para la cual habíamos realizado nuestros estudios previos y disponemos de más información acerca de su expresión transcripcional (Figura 4.1.1 Capítulo 1, (Cavatorta et al., 2008)). Además,

estos análisis podrían servir de base para explicar los probables mecanismos implicados en los cambios observados en los niveles de *DLG1* en los cultivos organotípicos expresando proteínas virales (Capítulo 1). Así, utilizando las mismas muestras obtenidas por la técnica de LCM, correspondientes a los distintos estratos del tejido E6E7 18, nos abocamos a evaluar la transcripción de *DLG1*.

A partir de los cebadores detallados en la sección 3.7.10 de Materiales y métodos, se analizó la expresión de *DLG1* en cada uno de los estratos epiteliales de cultivos *raft* E6E7 18 y en comparación con los mismos estratos derivados de cultivos organotípicos control PHK, sin expresar proteínas virales (*raft* PHK). Como puede observarse en la Figura 4.2.4, en todas las capas los cultivos E6E7 18 evidenciaron aumentos significativos en los niveles de transcritos de *DLG1* respecto a los cultivos control. Además, notablemente, la capa Inferior que había sido la que mayor expresión viral relativa había mostrado, fue la que presentó un aumento significativamente mayor en la expresión transcripcional de *DLG1*.



**Figura 4.2.4: Análisis de la expresión de transcripcional de *DLG1* en los distintos estratos de cultivos organotípicos E6E7 18.** Se muestran los resultados de los experimentos de RT-qPCR (media  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ ) para el transcrito codificante para *DLG1*, habiéndose utilizado el gen 18S como gen de referencia. Los datos se expresan en forma relativa al valor obtenido para PHK control en cada una de las capas correspondientes (arbitrariamente considerado 1). En celeste se indican los cambios significativos en la transcripción de *DLG1* entre las distintas capas del cultivo E6E7 18; en rosa se indica el aumento transcripcional significativo en cada estrato de los cultivos E6E7 18 respecto a las correspondientes capas control del cultivo PHK (\*\*  $p < 0.01$ ).

Así, los resultados presentados muestran la existencia de cambios en los patrones transcripcionales de *DLG1* en relación con la expresión de las proteínas virales, de acuerdo a lo obtenido para cada capa epitelial analizada del cultivo E6E7 18. Además, esta regulación transcripcional de *DLG1* en presencia de las correspondientes proteínas virales concuerda con nuestros resultados previos obtenidos mediante ensayos de luciferasa para análisis de la actividad promotora de *DLG1* (Capítulo 1).

En resumen, estas observaciones, si bien preliminares, sugieren que la expresión génica viral se asociaría a aumentos en la transcripción del blanco celular estudiado, *DLG1*. Por lo tanto, los datos aquí presentados podrían contribuir en parte a comprender los aumentos previamente observados en la proteína *DLG1*, tanto en cultivos organotípicos en el contexto de expresión de HPV como en lesiones cervicales asociadas a infecciones de dicho virus. Resta analizar los mecanismos precisos responsables de esta inducción de la expresión génica.

Estos resultados, en conjunto con los presentados en el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral, profundizan el entendimiento de los cambios en la expresión de blancos de polaridad en el contexto de la infección por HPV.

### **4.3 CAPÍTULO 3: Análisis de la regulación de la proteína de polaridad DLG1 por procesos independientes de infecciones virales, mecanismos epigenéticos**

Habiendo analizado exhaustivamente un modelo de cáncer asociado a HPV, nos propusimos estudiar otros factores independientes de la expresión de proteínas virales que pudieran estar implicados en la progresión maligna. Así, considerando la participación de la proteína de polaridad DLG1 en procesos oncogénicos y la dualidad en su función (Roberts et al., 2012), resulta interesante estudiar la participación de factores independientes de infecciones virales en las alteraciones de expresión de DLG1 observada en distintos tipos de tumores (Boussioutas et al., 2003; Cavatorta et al., 2004; Fuja et al., 2004; Gardiol et al., 2006; Liu et al., 2002).

Considerando que la regulación de los niveles de DLG1 podría producirse por diferentes mecanismos en distintos tumores, nos preguntamos si procesos de regulación epigenética podrían estar implicados. En particular, como se detalla en la sección 1.3.4 de la Introducción, la metilación del ADN constituye un importante mecanismo de regulación génica en tumores. Así, han sido ampliamente descritos ejemplos de represión transcripcional por hipermetilación específica de promotores (Daniel et al., 2011) y, en menor medida, eventos de hipometilación de regiones promotoras y reactivación de expresión génica (Hoffmann and Schulz, 2005) durante procesos de transformación y metástasis.

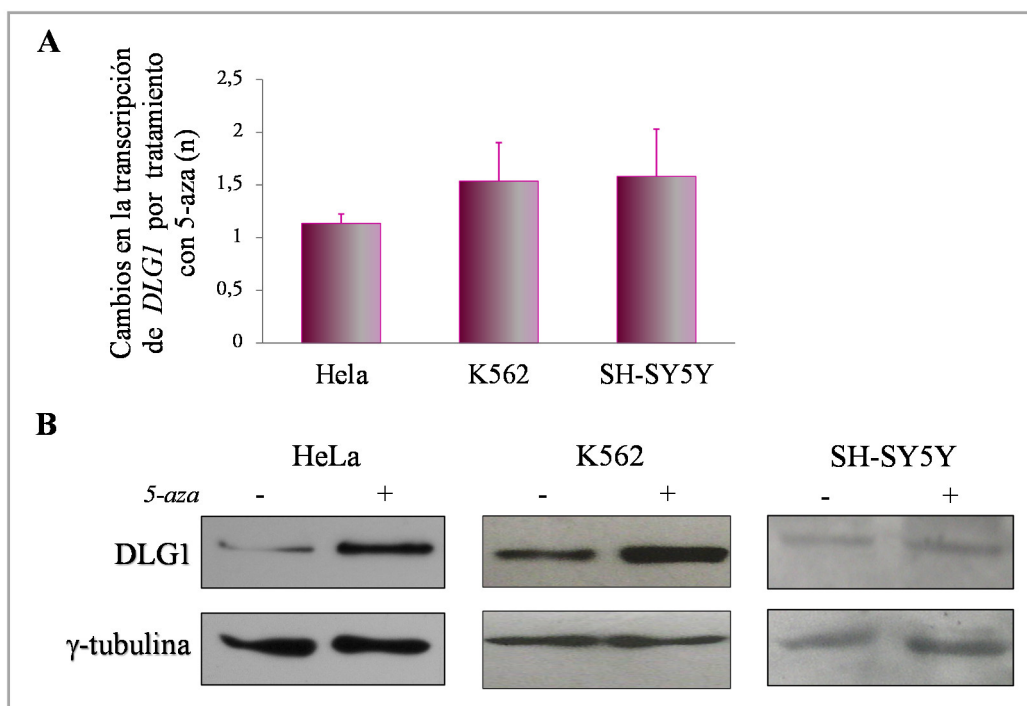
Además, análisis bioinformáticos de las secuencias correspondientes al promotor de *DLG1*, mostraron la presencia de una región con una alta densidad de dinucleótidos CpG indicando probables dominios tipo “islas CpG” (Cavatorta et al., 2008). Por ello, decidimos abocarnos a analizar si mecanismos de metilación del ADN podían estar implicados en la regulación de la expresión de DLG1, dada también su participación en procesos oncogénicos.

#### 4.3.1 Tratamiento con el inhibidor de metilación 5-aza

En primer lugar, realizamos tratamientos con la droga inhibidora de las enzimas ADN metiltransferasas, 5-aza, que es capaz de reactivar la expresión de genes silenciados por metilación (Christman, 2002). Resultados preliminares habían mostrado que al tratar con 5-aza células C33A, con bajos niveles de transcripción para *DLG1*, se producía un aumento en el nivel proteico correspondiente (Dra. Daniela Gardiol, observaciones personales). Para profundizar el estudio de la injerencia de la inhibición de ADN metiltransferasas en la regulación de *DLG1*, escogimos otras líneas celulares con bajos niveles de expresión para dicha proteína. Nos basamos en el trabajo desarrollado por el Lic. Federico Marziali en su Tesina. Así, seleccionamos las líneas K562, SHSY-5Y y HeLa, que presentaban niveles transcripcionales de *DLG1* bajos en comparación a otras células, de manera de poder detectar posibles aumentos en la expresión de *DLG1* ante el tratamiento.

Las distintas líneas celulares fueron cultivadas en presencia de 5-aza, según se detalla en la sección 3.6 de Materiales y métodos. A continuación, se realizaron extractos de ARN y la transcripción de *DLG1* se analizó mediante RT-qPCR (ver sección 3.7.10 de Materiales y métodos). Tal como se muestra en la Figura 4.3.1.A, las tres líneas celulares ensayadas mostraron aumentos en los niveles de transcritos en presencia de la droga 5-aza, con respecto a la condición sin tratamiento para cada línea celular. Los resultados sugieren una probable represión mediada por metilación del gen en estudio.

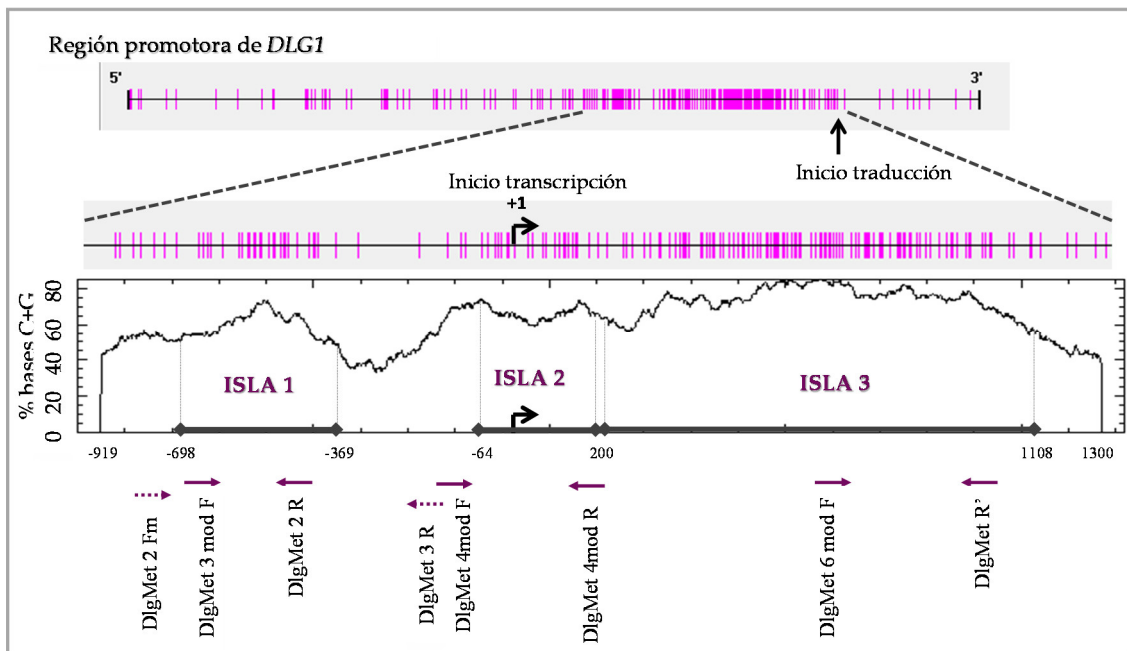
Alternativamente, se obtuvieron los correspondientes extractos proteicos, y los mismos fueron analizados mediante WB para la expresión de *DLG1*. Los resultados, presentados en la Figura 4.3.1.B, demuestran que no se produjeron cambios para la línea SH-SY5Y, mientras que se evidencia un aumento en la expresión de *DLG1* ante el tratamiento con 5-aza en la línea K562 y, aún más pronunciadamente, en las células de la línea HeLa. Esto último sugeriría una probable regulación de la proteína *DLG1* por procesos de metilación del ADN, al menos para las líneas celulares HeLa y K562 (Christman, 2002).



**Figura 4.3.1: Análisis del efecto de 5-aza, inhibidor de ADN metiltransferasas sobre la expresión de *DLG1*.** A) 5-aza incrementa la transcripción de *DLG1*. En la figura se muestran los cambios (*fold*, n veces) en la transcripción de *DLG1* ante el tratamiento con la droga inhibidora de enzimas ADN metiltransferasas, para las distintas líneas celulares ensayadas, en relación a las células sin tratar (arbitrariamente consideradas 1 en cada caso). Los transcritos de *DLG1* se determinaron por RT-qPCR, utilizando a *SDH* como gen de referencia. Los experimentos se realizaron por triplicado. B) 5-aza aumenta los niveles proteicos de *DLG1* en las líneas HeLa y K562. Se muestran los cambios en la expresión de *DLG1* ante un tratamiento con la droga 5-aza ensayados mediante WB. Se sembraron 70  $\mu$ g de proteína en cada caso y se establecieron los niveles de  $\gamma$ -tubulina como control de carga.

#### 4.3.2 Estudio del estado de metilación de la región promotora de *DLG1*

A partir de los resultados antes detallados, nos abocamos más directamente al estudio del estado de metilación del promotor de *DLG1*, de manera de investigar si nuestras observaciones (Figura 4.3.1) correspondían con lo observado para otras regiones promotoras (Christman, 2002). Inicialmente, procedimos al análisis bioinformático de la región promotora utilizando distintas aplicaciones, como CpG plot EMBOSS, CpG Island Searcher y Methyl Primer Express. Así, se identificaron tres zonas de alta densidad de CpG y se confirmó la presencia de tres Islas CpG en el promotor de *DLG1*, como se esquematiza en la Figura 4.3.2.



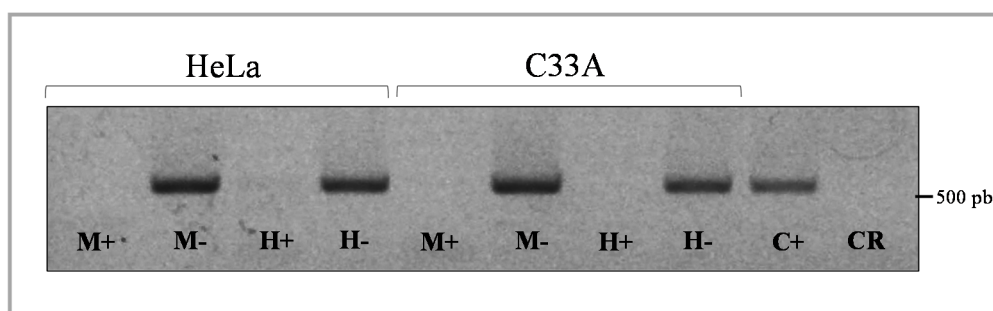
**Figura 4.3.2: Islas CpG en el promotor de *DLG1* y cebadores diseñados y utilizados para su estudio.** Se esquematiza el promotor de *DLG1*, los residuos CpG presentes en el mismo (líneas rosas) y el correspondiente inicio de la transcripción (+1). En la región inferior se muestra el porcentaje de bases G+C en cada zona y la consecuente identificación de tres islas CpG (1, 2 y 3), mediante la herramienta bioinformática EMBOSS CpGplot. Además, se esquematizan los pares de cebadores utilizados para el estudio de las ISLAS CpG, específicamente diseñados para amplificar preferencialmente sobre ADN modificado por tratamiento con bisulfito (flechas llenas) y el par de cebadores utilizado para amplificar el total de la ISLA 1 sobre ADN genómico (flechas punteadas).

#### 4.3.2.1 Digestión con enzimas sensibles al estado de metilación y PCR

Para comenzar a estudiar la metilación del promotor de *DLG1*, realizamos experimentos de digestión del ADN con enzimas de restricción sensibles al estado de metilación seguida de PCR, según el protocolo detallado en la sección 3.7.7 de Materiales y métodos. Brevemente, la enzima de restricción *HpaII* (sitio de reconocimiento CCGG) es capaz de llevar a cabo la restricción sólo si el sitio no se encuentra metilado. Por el contrario, la enzima *MspI* (mismo sitio de reconocimiento que *HpaII*) digiere el ADN en forma independiente al estado de metilación del mismo. A continuación de la digestión del ADN a analizar con una u otra enzima, se lleva a cabo la reacción de PCR. Dado el mencionado comportamiento diferencial de ambos isoesquizómeros ante el estado de metilación del sitio de reconocimiento, la aplicación de la metodología de digestión enzimática seguida de PCR es una buena aproximación para estudiar el estado de metilación de la región amplificada ulteriormente. Así, resultados positivos de

amplificación indican la falta de digestión enzimática, mientras que ausencia de productos de amplificación son indicadores de digestión exitosa (Li et al., 2004; Razin and Cedar, 1991; Stoger et al., 1993; Waalwijk and Flavell, 1978).

Por lo tanto, nos abocamos a digerir con ambas enzimas de restricción (*MspI* y *HpaII*) ADN genómico de las líneas celulares HeLa y C33A, para las cuales habíamos observado previamente aumentos en la expresión de DLG1 ante tratamientos con inhibidores de metil-transferasas (sección 4.3.2.1). Posteriormente, partiendo de los ADN genómicos digeridos, se procedió a la amplificación de la ISLA 1 a partir de los cebadores DlgMET 2Fm y DlgMET 3R, los cuales flanquean la mencionada Isla CpG (ver Figura 4.3.2) y siguiendo las condiciones detalladas en la sección 3.7.10 de Materiales y métodos. Como puede observarse en la Figura 4.3.3, para ambas líneas no se obtuvieron productos de amplificación al utilizarse como molde ADN genómico tratado con cualquiera de las dos enzimas de restricción en cuestión. Se descartó la degradación de los ADN durante el tratamiento, al obtenerse amplificados para el ADN genómico tratado en las mismas condiciones pero en ausencia de enzima.



**Figura 4.3.3: Ensayos de digestión de ADN genómico con enzimas de restricción sensibles al estado de metilación, seguidos de PCR.** Se muestran los productos de amplificación sobre la ISLA1 partiendo como molde de ADN genómico de las líneas HeLa o C33A previamente digerido con las enzimas *MspI* (M+, no dependiente del estado de metilación del ADN base) o con la enzima *HpaII* (H+, sólo capaz de digerir ADN no metilado). Se incluyeron controles sin enzima (M- y H-), un control positivo de reacción, utilizando como molde ADN sin tratamiento, (C+) y un control de reactivos de la reacción de amplificación (CR).

Estos resultados son acordes a regiones promotoras no metiladas, en las que ambas enzimas son capaces de llevar a cabo la restricción. Sin embargo, el método aplicado de Digestión sensible a metilación seguida de PCR, es un método que es sólo capaz de monitorear el estado de metilación de los residuos CpG incluidos en los sitios de restricción específicos (sitios CCGG) (Herman et al., 1996). Así, en nuestro caso la zona

amplificada contiene más de 25 residuos CpG plausibles de ser metilados, de los cuales sólo 8 han podido ser analizados mediante esta técnica. Por lo tanto, estos ensayos realizados sólo nos brindan información del estado de metilación de una porción de los sitios CpG dentro de la Isla analizada.

#### 4.3.2.2 Tratamiento con bisulfito sódico, PCR y secuenciación

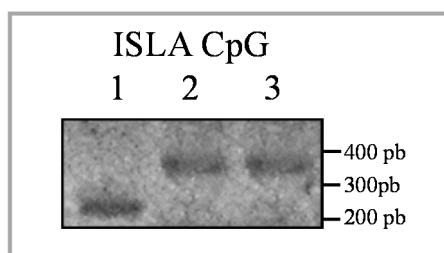
##### *Análisis en células en cultivo*

A partir de los resultados anteriores, nos propusimos continuar el estudio del estado de metilación del promotor de *DLG1* pero utilizando una técnica más sensible que nos proveyera información detallada del estado de metilación de las regiones de interés. Así, a continuación realizamos estudios por amplificación de ADN tratado con bisulfito sódico y posterior análisis por secuenciación. Las condiciones de tratamiento, amplificación y secuenciación se detallan, respectivamente, en las secciones 3.7.6, 3.7.10 y 3.7.11 de Materiales y métodos. Brevemente, el bisulfito modifica químicamente las bases C no metiladas, convirtiéndolas en U y sin afectar las C metiladas. De esta forma, se marcan de forma fidedigna e individual el estado metilado o no metilado de los dinucleótidos CpG, y este ADN modificado puede entonces ser amplificado y secuenciado, suministrando información detallada del estado de metilación de todos los sitios CpG en la región amplificada (Frommer et al., 1992; Oakeley, 1999). Para realizar estos ensayos, utilizamos un *kit* comercial de alta *performance* como es el EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN, Alemania).

En primer lugar, nos abocamos al diseño de cebadores específicos para la amplificación de regiones dentro de cada una de las Islas CpG identificadas en el promotor de *DLG1*. Nos propusimos llevar a cabo los estudios subsiguientes mediante cebadores que amplificaran el ADN en forma independiente al estado de metilación de los dinucleótidos CpG incluidos en cada zona estudiada (cebadores MIP, del inglés *methylation independent-specific primers*), dado que no teníamos conocimiento hasta el momento del estado de metilación de dichos residuos. Dicho diseño es complejo, dado la composición del ADN luego de la modificación por el tratamiento con bisulfito (Barekati et al., 2010). En nuestro caso, además, el promotor de *DLG1* presenta una gran densidad de dinucleótidos CpG, plausibles de ser metilados pero cuyo estado de

metilación desconocíamos. Para dicho diseño, se reparó en minimizar el número de sitios CpG y se consideró una conversión total de los residuos C no presentes en sitios CpG, de manera de favorecer la amplificación del ADN tratado. Además, se consideró la fragmentación del ADN propia del tratamiento con bisulfito sódico, por lo que los amplificadores fueron en todo los casos menores a 350 pb, siguiendo recomendaciones de este y otros equipos comerciales. De los múltiples pares de cebadores diseñados, se seleccionaron aquellos que presentaron mejor eficiencia para amplificar sobre el material genómico tratado, siendo estos últimos los detallados en la sección 3.7.10 de Materiales y métodos.

Así, partiendo de ADN genómico de células en cultivo tratado con bisulfito sódico y purificado, se llevaron a cabo las amplificaciones correspondientes a las tres islas CpG. Se utilizaron para ello los cebadores esquematizados con flechas llenas en la Figura 4.3.2 pudiéndose obtener los amplicones correspondientes, tal como se muestra en la Figura 4.3.4 a modo de ejemplo para la línea celular HeLa.



**Figura 4.3.4: Amplificación de las tres Islas CpG del promotor de *DLG1* a partir de ADN celular tratado con bisulfito.** Se muestran los productos de amplificación obtenidos a partir de 50 – 100 ng de ADN tratado de líneas celulares (en este caso, HeLa), siguiendo las condiciones detalladas en la sección 3.7.10 de Materiales y métodos.

Los resultados de la secuenciación de los productos de amplificación obtenidos mostraron en todos los casos un tratamiento muy efectivo, dado que se logró una conversión de C no presentes en residuos CpG mayor al 90%. Más aún, validamos el sistema al corroborar, como fuese reportado, el estado de hipermetilación del promotor de otro gen importante para la polaridad celular: el gen de E-cadherina (Chen et al., 2003). En conjunto estos datos brindan confianza sobre los datos obtenidos en cuanto a *DLG1*.

Así, en la Figura 4.3.5 se indican las líneas analizadas y se muestran los resultados de secuenciación para cada una de las Islas CpG de la región promotora de *DLG1*. En

forma interesante, se observó que todas las bases CpG analizadas en las tres Islas modificaban su identidad tras el tratamiento por bisulfito sódico, indicando un estado de-metilado del promotor de *DLG1*. En este sentido, para el caso de las ISLA 2 fueron analizadas las líneas celulares HeLa, K562 y C33A, de bajo nivel de expresión de *DLG1*. Para la ISLA 3, se estudiaron las líneas K562 y C33A; incorporándose también al análisis la línea epitelial HaCaT, con mayores niveles de *DLG1*.

Si bien todas las regiones adyacentes al inicio de la transcripción pueden ser metiladas (Deaton and Bird, 2011), numerosos reportes muestran que las Islas CpG *upstream* de dicho sitio suelen tener mayor injerencia en las regulaciones epigenéticas (Rincon-Orozco et al., 2009), siendo este el caso de la ISLA 1 en el promotor de *DGL1*. Así, se analizó el estado de metilación de dicha Isla en las líneas celulares HeLa, K562, C33A y HaCaT; pero incorporándose también al análisis otra línea con altos niveles de expresión de *DLG1*: la línea celular derivada de carcinoma de colon CaCo2. Nuevamente para esta Isla CpG todas las bases analizadas se encontraron en un estado de-metilado (Figura 4.3.5). En conjunto, de los resultados se desprende que para el caso de las líneas celulares analizadas, el estado de metilación del promotor de *DLG1* no sería el determinante del grado de expresión de la proteína *DLG1*. Así, los resultados indican que la expresión transcripcional de *DLG1* no estaría relacionada a diferencias en el estado de metilación del promotor, habiéndose encontrado en todos los casos un estado de-metilado.

Sin embargo, las células analizadas hasta el momento eran células transformadas o bien inmortales (HaCaT). Por ello, a continuación decidimos incorporar a nuestros análisis células normales, como son los queratinocitos humanos primarios, PHK. Como puede observarse en la Figura 4.3.5, estas células también evidenciaron un estado de-metilado del promotor en estudio.



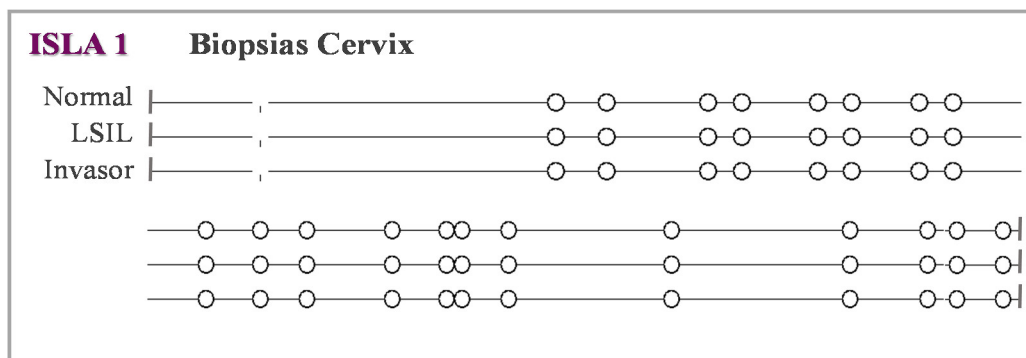
Así, todos los resultados derivados del análisis en células en cultivo señalan claramente un estado de-metilado del promotor de *DLG1*, estando estos resultados en concordancia con los ensayos de digestión con enzimas sensibles a la metilación realizados previamente. A su vez, como se discutirá más profundamente a continuación, dado que los patrones de hipometilación encontrados no explican nuestras observaciones previas en líneas celulares tratadas con inhibidores de ADN metiltransferasas, los resultados en conjunto sugieren que otros mecanismos epigenéticos distintos a la metilación del promotor podrían estar teniendo un rol en la regulación de la expresión de *DLG1*.

#### *Análisis en muestras histológicas*

A continuación, nos preguntamos si los resultados obtenidos en células en cultivo para el análisis de la incumbencia de mecanismos de regulación epigenéticos reflejarían también lo que ocurre para el caso de muestras histológicas. Así, partimos de muestras cedidas y clasificadas histológicamente por la Dra. Ana Lía Nocito de la Cátedra de Anatomía y Fisiología Patológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Rosario.

En primer lugar, nos propusimos establecer si, independientemente de los resultados obtenidos en líneas celulares en cultivo, los mencionados mecanismos epigenéticos podrían de todas formas estar relacionados con los cambios en la expresión de *DLG1* evidenciados durante la progresión maligna en diversos tumores (Facciuto et al., 2012) (Figura 1.10 Introducción). Como se mencionara anteriormente, *DLG1* muestra una expresión aumentada en los estadios intermedios de dicha progresión maligna, mientras que se encuentra muy disminuida o incluso ausente en los estadios más severos (Figura 1.10 Introducción) (Cavatorta et al., 2004; Gardiol et al., 2006; Watson et al., 2002). Por ello, y considerando la probable mayor relevancia de la ISLA 1 en los mecanismos epigenéticos en estudio, nos propusimos iniciar el análisis del estado de metilación de dicha Isla CpG en biopsias. En primer término, analizamos biopsias cervicales considerando los patrones de expresión de *DLG1* que habíamos obtenido por IHQ en estos tejidos (Figura 1.10 Introducción) (Cavatorta et al., 2004). Utilizamos muestras tanto normales como derivadas de lesiones de distinta severidad. La Figura 4.3.6,

muestra los resultados de los correspondientes ensayos de tratamiento del ADN extraído del tejido con bisulfito, seguido de PCR y secuenciación (secciones 3.7.3, 3.7.6, 3.7.10 y 3.7.11 de Materiales y métodos). En todos los casos y en todos los tipos de muestras no se pudieron identificar bases metiladas. Estos ensayos, si bien preliminares, indicarían que los cambios en la expresión de *DLG1* observados durante la progresión maligna cervical no estarían asociados a mecanismos de regulación epigenéticos de la región promotora correspondiente.

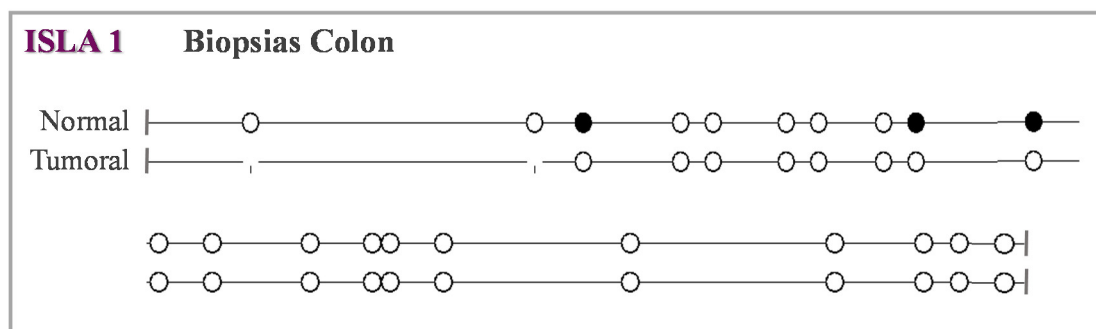


**Figura 4.3.6: Estado de-metilado del promotor de *DLG1* en biopsias cervicales analizado por tratamiento de ADN con bisulfito, PCR y secuenciación.** Se muestra un diagrama de cada uno de los residuos CpG analizados dentro de la ISLA 1 del promotor de *DLG1*, en biopsias cervicales (Normal, LSIL, e Invasor) y utilizando el programa *BiQ Analyzer*. Cada círculo representa un residuo CpG de la región. Círculos blancos representan bases no metiladas, mientras que círculos negros representarían, de ser el caso, bases metiladas. También se muestran los residuos que no pudieron identificarse en los datos de las secuenciaciones (,).

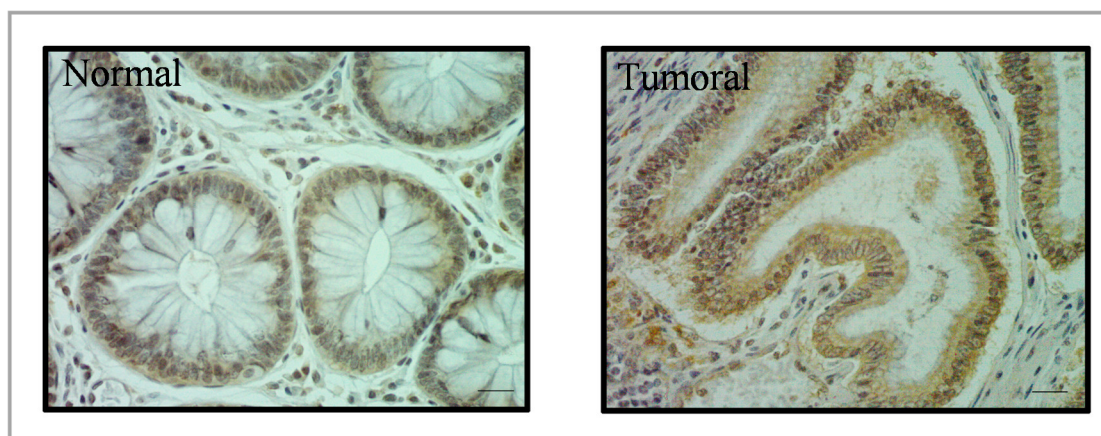
Luego, nos abocamos a estudiar la probable incumbencia de la metilación del promotor de *DLG1* en la regulación de la expresión proteica durante el desarrollo de tumores de colon, donde se observó una expresión diferencial en los distintos estadios (Figura 1.10 Introducción) (Gardiol et al., 2006). Así, procedimos a analizar el estado de metilación de la ISLA 1 en el ADN extraído de biopsias derivadas de colon normal y de adenocarcinoma bien diferenciado, siguiendo el protocolo descrito. Como se esquematiza en la Figura 4.3.7, los resultados arrojados por la secuenciación de la zona mencionada indicaron la presencia de 3 bases CpG metiladas en el caso del colon normal analizado, que están ausentes en la muestra tumoral de colon.

Este resultado cobra relevancia al considerar la expresión de *DLG1* característica de cada uno de los tipos de tejido de colon analizados. En este sentido, *DLG1* se encuentra muy disminuida en los estadios más severos pero, en cambio, en estadios

intermedios como la muestra utilizada (adenocarcinoma bien diferenciado) se evidencia una sobre-expresión de dicha proteína con cambios en la localización de la misma (Gardiol et al., 2006; Roberts et al., 2012). Esta expresión de DLG1 fue corroborada específicamente en las muestras usadas en este trabajo mediante ensayos de IHQ, como se muestra en la Figura 4.3.8 y donde se puede apreciar la expresión diferencial de DLG1.



**Figura 4.3.7: Análisis comparativo del estado de metilación del promotor de *DLG1* en muestras de Colon Normal y Tumoral.** Se muestra un diagrama realizado mediante el programa *BiQ Analyzer* de cada uno de los residuos CpG analizados dentro de la ISLA1 del promotor, para las biopsias de colon normal y tumoral según se detalla a la izquierda. Cada círculo representa un residuo CpG de la región. Círculos blancos representan bases no metiladas, mientras que círculos negros señalan bases metiladas. También se muestran los residuos que no pudieron identificarse en los datos de secuenciaciones (,).



**Figura 4.3.8: Análisis por IHQ de la expresión de *DLG1* en las biopsias de colon analizadas para el estado de metilación del promotor.** Se muestran las secciones de los tejidos parafinados que fueron analizadas para la expresión de *DLG1* (marrón) y contrateñidos con hematoxilina. Puede observarse que la muestra de adenocarcinoma de colon bien diferenciado presenta una sobre-expresión de los niveles de *DLG1* cuando se lo compara con la expresión en la muestra normal. Barra de tamaño: 10  $\mu\text{m}$ .

En conjunto y de manera preliminar, los datos al momento sugerirían que un aumento en los niveles de *DLG1* en las lesiones neoplásicas intermedias de colon podría correlacionarse con un proceso de cambios en el estado de metilación de su promotor.

Estos hallazgos plantean un panorama muy interesante para el estudio de la real injerencia de mecanismos epigenéticos en la regulación de la expresión de DLG1 durante el desarrollo oncogénico. En este sentido, otras metodologías y el análisis de un mayor número de muestras serían necesarias.

*En resumen, los hallazgos presentados en este Trabajo de Tesis contribuyen a incrementar el conocimiento acerca de la expresión de proteínas de polaridad celular y su regulación durante procesos de transformación maligna en general, y en particular aquellos asociados a infecciones por HPV.*

*Más aún, en el presente Trabajo hemos desarrollado, por primera vez en nuestro medio, cultivos organotípicos tipo raft. Los mismos representan herramientas de gran importancia para el estudio de los mecanismos asociados a infecciones por HPV dado que mimetizan su entorno natural de infección. En este sentido, los resultados obtenidos aportan al entendimiento de mecanismos subyacentes a infecciones por HPV, tanto de bajo como de alto riesgo oncogénico. En particular, nos focalizamos en el estudio de la regulación de proteínas de polaridad como DLG1 y PAR3 en el entorno de dichas infecciones virales. Además, hemos iniciado el análisis de la injerencia de mecanismos epigenéticos en la regulación de la expresión de DLG1, no estudiados hasta el momento.*

*Por lo tanto, considerando que la disrupción de la polaridad celular es un evento clave de los procesos tumorales, los resultados aquí presentados son relevantes para el entendimiento de la biología del cáncer.*

## **5. DISCUSIÓN**



El objetivo general del presente trabajo de Tesis Doctoral consistió en profundizar el conocimiento de los diversos mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de proteínas de polaridad celular. La relevancia de estos estudios radica en el hecho de que los procesos de transformación maligna están frecuentemente asociados a la pérdida de polaridad celular y la consecuente desestructuración de las uniones intercelulares. De esta forma, estudiamos distintos factores virales y celulares que están implicados en eventos de alteración de la polaridad, focalizándonos particularmente en aquellos con incumbencia en la progresión de lesiones asociadas a infecciones por el virus HPV, agente etiológico del cáncer cervical. Además, analizamos otros procesos independientes de la infección viral y su probable incumbencia en la progresión tumoral. Así, los datos arrojados por este estudio ayudan a comprender la biología del cáncer en general, pudiendo contribuir en el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas.

En primer lugar, nos orientamos a estudiar el efecto de las proteínas virales sobre la expresión de la proteína de polaridad DLG1. Como se comentó anteriormente, distintos estudios han demostrado que la abundancia y la localización de DLG1 se ven modificados durante diversos procesos oncogénicos, incluyendo la progresión maligna cervical (Cavatorta et al., 2004; Fuja et al., 2004; Gardiol et al., 2006; Watson et al., 2002). Así, al analizar los estadios intermedios en dichos procesos se observa un marcado incremento en los niveles de expresión de DLG1, junto a una inusual distribución citoplasmática. Además, otra característica relevante de estas observaciones es la pérdida gradual de dicha proteína de su localización a nivel de los contactos celulares, donde cumple funciones importantes en el mantenimiento de la polaridad. Más aún, ha sido propuesto que la ausencia de DLG1 de los bordes celulares contribuiría en la progresión maligna (Cavatorta et al., 2004). Sin embargo, el entendimiento de los mecanismos asociados a esta expresión de DLG1 es aún incompleto y, en cierta forma, da lugar a controversias. En este sentido, es necesario comprender en forma más integral los eventos que llevan a la expresión de DLG1 reportada, a la vez que se desconoce cuál es la real función de DLG1 en este entorno y su verdadera contribución a la patología.

Más aún, como se planteó en la Introducción, es materia de discusión si estas alteraciones en la expresión de *DLG1* representan una causa o una consecuencia de la alteración patológica.

Por ello, inicialmente nos abocamos al estudio de la incidencia de distintas proteínas de HPV sobre la actividad promotora de *DLG1*, mediante ensayos de actividad luciferasa. La actividad de dicho promotor no evidenció cambios ante la presencia de la proteína E5 derivada de HPV de alto riesgo. En contraste, fueron observados aumentos significativos en dicha actividad promotora como consecuencia de la expresión de las proteínas E6 y E7 de HPV, tanto de alto como de bajo riesgo oncogénico (Figura 4.1.1). Por lo tanto, estos resultados sugirieron un efecto activador por parte de dichas proteínas virales sobre el promotor de *DLG1*, evidenciado por el aumento en la actividad luciferasa. Cabe mencionar que, en base a los datos obtenidos, no se puede dilucidar el mecanismo preciso por el cual dichas proteínas virales llevan a cabo su acción sobre la actividad promotora de *DLG1*. En este sentido, han sido reportados efectos transcripcionales de HPV con distintos mecanismos implicados, muchos de los cuales no han sido completamente dilucidados (Doorbar et al., 2015; Roman and Munger, 2013; Vande Pol and Klingelutz, 2013; Wanichwatanadecha et al., 2012). Así, las proteínas virales podrían, por ejemplo, inducir la acción de ciertos factores de transcripción que regulen *DLG1*. Independientemente del mecanismo molecular involucrado, y considerando la sobre-expresión de *DLG1* observada en distintas patologías, resultó muy interesante estudiar el efecto de las proteínas virales sobre la expresión de dicha proteína de polaridad.

A continuación, analizamos los efectos de tales proteínas virales en un modelo de gran relevancia para el entendimiento de las infecciones por HPV y de las lesiones asociadas. Hicimos uso de la metodología de cultivos organotípicos *raft*, implementando esta metodología por primera vez en nuestro ámbito de investigación. Como se detalló, dada la estrecha dependencia entre el ciclo viral del HPV y la diferenciación de los epitelios, la puesta a punto de dichos cultivos fue de gran importancia, puesto que nos permitió reproducir *in vitro* la estructura tisular adecuada y realizar nuestros estudios en un medio que mimetiza el entorno natural de las mencionadas infecciones virales.

Si bien gran número de estudios analizan los efectos de la proteína oncogénica E6 sobre proteínas de polaridad (Facciuto et al., 2012; Gardiol et al., 1999; Pim et al., 2012), poco se ha estudiado sobre los posibles roles de E7 en la regulación de dichas proteínas celulares. Por lo que sería interesante comprender su probable influencia. Esto podría ser relevante considerando que E7 es requerido para la transformación celular causada por el virus y la progresión tumoral (Doorbar et al., 2015). Por ende, desarrollamos cultivos organotípicos a partir de queratinocitos expresando las proteínas E7 y, además, cultivos expresando E6/E7 de HPV-18. Esto último de manera de reproducir más fehacientemente lo que ocurre en una infección, donde ambas oncoproteínas son expresadas simultáneamente a partir de un mismo preARNm policistrónico. La expresión de las proteínas virales se corroboró mediante la detección de los transcritos correspondientes (Figura 4.1.4) y a través de subrogados celulares (Figuras 4.1.5 y 4.1.6), como se utiliza habitualmente dada la gran dificultad de observar directamente las proteínas virales mediante IHQ o WB (principalmente por la falta de anticuerpos comerciales adecuados y de buena *performance*) (Heer et al., 2011). En este caso utilizamos los blancos mejor caracterizados de E7 y E6: respectivamente, Rb y p53.

Según se observa en la Figura 4.1.7, la presencia de las mencionadas proteínas de HPV-18 indujo un cambio en la distribución celular y tisular de DLG1 en comparación a los cultivos organotípicos control. Más aún, nuestros resultados claramente se asemejan a los patrones de DLG1 observados en SIL (Figura 1.10, sección Introducción). Así, a partir de la expresión de las proteínas de HPV, DLG1 se encontró en todas las capas epiteliales, en contraposición a la expresión de dicha proteína de polaridad en los cultivos control, restringida a las capas inferiores menos diferenciadas. En este sentido, los patrones de diferenciación celular podrían alterarse a partir de la expresión de las proteínas virales, lo que se evidencia mediante el análisis morfológico de los tejidos generados (Figura 1.4.3). Así, ha sido sugerido que las capas epiteliales de los cultivos expresando proteínas de HPV presentarían un estado de diferenciación no equivalente a los correspondientes estratos en los cultivos control (Delury et al., 2013; Doorbar, 2006). Esto indicaría, entonces, que las capas más superficiales de los tejidos podrían estar ocupadas por células de tipo basal, explicando los cambios en la expresión de DLG1.

En forma concordante a estas observaciones, ha sido demostrado que la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV perturban el programa de diferenciación de las células infectadas (Doorbar et al., 2015; Pei et al., 1998; Zehbe et al., 2009). Más aún, recientemente se reportó que dichas oncoproteínas inhiben la expresión de diferentes genes de diferenciación (Gyongyosi et al., 2012). Este hecho sería importante para una replicación viral productiva, al inducir la maquinaria de replicación celular en queratinocitos diferenciados.

Además, como puede apreciarse en la Figura 4.1.11, en concordancia a los resultados obtenidos en los ensayos de luciferasa y a lo observado mediante IHQ en los cultivos *raft*, la presencia de las oncoproteínas de HPV-18 indujo también aumentos de los niveles de expresión de DLG1 en el contexto del cultivo de células epiteliales en monocapa. Esto indicaría que la presencia de tales proteínas está implicada en la regulación de los niveles de la mencionada proteína de polaridad, y al menos parcialmente en una forma independiente del contexto tisular. Esto cobra aún más relevancia porque, como se muestra en la Figura 4.1.9, en cultivos organotípicos los niveles de expresión total de DLG1 se vieron incrementados significativamente en presencia de las oncoproteínas virales. En este punto cabe considerar que este aumento en los niveles de la proteína celular se podría explicar, al menos en parte, por el aumento en el número de capas epiteliales donde se expresa DLG1.

Una de las características más relevantes de los resultados presentados en la Figura 4.1.7 es la pérdida de DLG1 de los bordes celulares en forma conjunta al incremento hacia citoplasma y núcleo, en presencia de las oncoproteínas virales. Este patrón de expresión es similar al observado en biopsias y se considera un evento fundamental en la progresión maligna (Cavatorta et al., 2004). Por lo tanto, estos datos indican un probable rol de las proteínas virales ensayadas en los patrones de expresión de DLG1 observados en la neoplasia cervical.

En este sentido, no es clara la función de dicha acumulación de DLG1 en núcleo y citoplasma. Ha sido demostrado que una sobre-expresión de DLG1 puede provocar un bloqueo de la progresión del ciclo celular de G0/G1 a S, indicando su participación en la regulación negativa de la proliferación (Ishidate et al., 2000). Como se detalló en la Introducción, esta y otras observaciones apoyan las funciones oncosupresoras de DLG1,

por lo que los aumentos de dicha proteína podrían vincularse a un evento celular compensatorio, con el objetivo de intentar reprimir la transformación tisular.

Sin embargo, también ha sido hipotetizado que DLG1 tendría un rol dual dependiente de su contexto, esto a partir de que se reportase que DLG1 desarrolla funciones oncogénicas en presencia de ciertas oncoproteínas virales (Frese et al., 2006; Krishna Subbaiah et al., 2012; Roberts et al., 2012). Así, se ha propuesto que ciertas proteínas celulares podrían ser utilizadas por el virus para formar complejos y activar señales importantes para la proliferación celular (Frese et al., 2006). Por tanto, otra posibilidad cierta es que la acumulación en el citoplasma de dicha proteína esté cumpliendo funciones de significancia oncogénica.

En este sentido, la agregación de complejos con DLG1 en el citosol celular se ha propuesto que inhibiría sus funciones oncosupresoras al impedir la interacción con sus correspondientes *partners*, probablemente a nivel de membrana (García-Mata et al., 2007). Además, si bien diversos estudios demostraron que E6 de HPV de alto riesgo induce la degradación de DLG1, como detallado en la Introducción, afecta sólo a ciertos *pools* subcelulares específicos de la proteína celular (Mantovani et al., 2001) y parece ser incompleta. Así, niveles significativos de DLG1 se observan en líneas celulares tumorales HPV positivas, a la vez que formas celulares específicas se mantienen activamente en relación a la expresión continua de E6 y E7 (Krishna Subbaiah et al., 2012). Subbaiah y colaboradores demostraron recientemente que formas residuales de DLG1 unidas al citoesqueleto modifican la actividad de la proteína G pequeña RhoG, proteína traductora de señales importante en procesos de proliferación y diferenciación. DLG1 logra dicha alteración formando complejos con el factor regulador de RhoG, SGEF (del inglés *SH3-domain-containing RhoG guanine nucleotide exchange factor*), en presencia de las oncoproteínas de HPV. Estas funciones cooperativas de E6 y E7, promoviendo las funciones de RhoG, podrían ser de relevancia para la replicación viral en el contexto tisular, y consecuentemente contribuirían con las características invasivas de las células tumorales (Krishna Subbaiah et al., 2012). En conjunto, estas observaciones podrían ayudar a explicar los resultados de la Figura 4.1.7, donde DLG1 es mantenida en el citoplasma probablemente mediante la formación de complejos con proteínas celulares involucradas en el crecimiento celular.

En cuanto a la reducción de DLG1 a nivel de los contactos célula-célula en los cultivos generados expresando las oncoproteínas de HPV-18 (Figura 4.1.7), es importante destacar que la expresión de E7 en un contexto epitelial lleva a la reducción de los niveles de la proteína de adhesión celular E-cadherina, la cual está relacionada con la localización de DLG1 en los sitios de contacto celular (Hellner et al., 2009; Reuver and Garner, 1998). Se sabe que E-cadherina es responsable de reclutar a DLG1 hacia dichas regiones en asociación a componentes del citoesqueleto. De esta forma, esto podría ayudar a comprender la disminución de DLG1 en estas regiones. Más aún, la reducción de DLG1 en los contactos celulares fue más evidente en los cultivos E6E7 18, por lo que es posible especular que la presencia de E6 en este caso podría contribuir a estas observaciones, probablemente dirigiendo la degradación preferencial de las formas de DLG1 asociadas a membrana (Massimi et al., 2006).

Es importante también destacar que particularmente en los cultivos E6E7 18 se observó un incremento en la expresión nuclear de DLG1. De hecho, han sido propuestos dos escenarios contrarios para las funciones de proteínas de polaridad a nivel nuclear: en contextos normales donde se mantiene el grado de polarización epitelial la presencia nuclear de proteínas de polaridad prevendría el desarrollo tumoral; en cambio en entornos en donde la polarización se ve alterada, las proteínas de polaridad en núcleo favorecerían la proliferación y la invasión (Lelievre, 2010). También ha sido reportado que en condiciones de disrupción de la polaridad celular, las proteínas constituyentes de uniones celulares pueden migrar hacia el núcleo y de esta forma cumplir funciones reguladoras de la transcripción (Polette et al., 2005).

Especialmente en el caso de DLG1 en células no transformadas, su relocalización nuclear contribuiría a la diferenciación y a la supresión tumoral (Borden, 2002; Garcia-Mata et al., 2007). Además, se ha reportado la participación de DLG1 en núcleo en mecanismos relacionados a la maquinaria de respuesta al daño en ADN (Dubash et al., 2011). Este evento podría estar relacionado con el aumento del daño al ADN por parte de HPV (McKinney et al., 2015). Por otro lado, Narayan y colaboradores demostraron que la localización nuclear de DLG1 depende estrechamente de su fosforilación diferencial por CDK1 y CDK2 durante la progresión del ciclo celular, quinasas cuya actividad es alterada por las oncoproteínas de HPV (Narayan et al., 2009a). La

complejidad de estos mecanismos de regulación deja en evidencia la necesidad de profundizar su entendimiento.

A su vez, no es posible descartar que otros mecanismos inducidos por la presencia de las oncoproteínas virales también puedan promover cambios en las propiedades de unión de DLG1 a ciertos *partners* y que dicha interacción redirija su localización. Esto guarda consistencia con la hipótesis de que diferentes *pools* de DLG1 podrían cumplir distintos roles y, posiblemente, llevar a cabo funciones opuestas en cuanto a la progresión maligna (Roberts et al., 2012).

Más aún, también se observaron cambios semejantes en la abundancia y en la localización de DLG1 en cultivos organotípicos portando el genoma completo de HPV-18 (Figura 4.1.8). Estos resultados remarcan la significancia de las observaciones correspondientes a los cultivos organotípicos expresando únicamente las oncoproteínas virales, indicando que dicha expresión sería la principal responsable de las alteraciones observadas en la expresión de DLG1.

De igual forma, también cabe subrayar la relevancia de estos datos en luz de la expresión de la mencionada proteína de polaridad en biopsias cervicales. Así, los cultivos con genoma completo utilizados exhiben alteraciones morfológicas reminiscentes de displasias leves a moderadas (Steenbergen et al., 1998), en las cuales habíamos reportado la sobre-expresión de DLG1 y su pérdida de los bordes celulares (Cavatorta et al., 2004).

En forma sorprendente, la presencia de las correspondientes proteínas E7 y E6/E7 del HPV-11 también se asoció con cambios en la expresión de DLG1. La mayoría de los estudios sobre la interferencia de HPV en la polaridad celular se han focalizado en los HPV de alto riesgo oncogénico y, específicamente, en la habilidad de las oncoproteínas E6 de interaccionar con proteínas de polaridad con dominios PDZ. De hecho, no existen reportes sobre la expresión de DLG1, y en general de proteínas de polaridad, durante infecciones de HPV de bajo riesgo. En este sentido, los cultivos organotípicos que desarrollamos expresando las proteínas de HPV-11 exhibieron características morfológicas concordantes con displasias leves (Figuras 4.1.3 y 4.1.12), presentando alteraciones histológicas, aunque de menor extensión que aquellos cultivos con las proteínas de HPV-18 (Fang et al., 2006; Thomas et al., 2001a). Estas observaciones

concuerdan con lo reportado para las lesiones desarrolladas a partir de infecciones por HPV de bajo riesgo, los cuales se asocian a alteraciones en la diferenciación del epitelio e inducen hiperproliferación en algunos estratos epiteliales (McCord et al., 2014).

En efecto, como se muestra en la Figura 4.1.12, en los cultivos E7 11 y E6E7 11, la expresión de DLG1 resultó estar alterada en comparación a los cultivos control. Específicamente, DLG1 se expresó en todas las capas epiteliales de los cultivos con proteínas virales. Esto posiblemente también se asocie a cambios en el estado de diferenciación celular inducido por la presencia de dichas proteínas de HPV (Fang et al., 2006; Thomas et al., 2001a). En este sentido, es importante remarcar que en el caso de las infecciones por HPV de bajo riesgo oncogénico, también se induce levemente la entrada al ciclo celular con el objetivo de permitir la amplificación genómica (Banerjee et al., 2011; Chow et al., 2010; Doorbar et al., 2012). En contraste, a diferencia de lo observado para HPV-18, DLG1 se mantuvo a nivel de los bordes celulares y esto podría ser relevante si se considera la diferente capacidad transformante y promotora de progresión maligna de cada tipo viral. Así, se refuerza la propuesta de que la pérdida de DLG1 de los bordes celulares contribuiría a la desregulación de las uniones y a alterar vías de transducción de señales involucradas en el control de la proliferación celular.

La expresión de las proteínas de HPV-11 también se vinculó a un incremento en los niveles de DLG1, tanto en cultivos organotípicos (Figura 4.1.13) como en células epiteliales en cultivo en monocapa (Figura 4.1.15). Es posible que dichos aumentos en la abundancia de DLG1 formen parte de una actividad viral crítica conservada entre distintos tipos virales, que podría favorecer la replicación de HPV en el contexto epitelial. De hecho, se ha demostrado que algunas funciones de E7 se conservan entre los HPV de alto y bajo riesgo (Pim and Banks, 2010). Por lo tanto, E7, sola o más aún al expresarse junto a E6, podría ser capaz de inducir mecanismos moleculares involucrados en la regulación observada en los niveles de DLG1.

Con el objeto de estudiar probables mecanismos involucrados, analizamos posibles asociaciones entre los patrones de expresión de DLG1 observados y probables cambios en la inducción del ciclo celular por parte de HPV. Para ello, analizamos, la expresión de marcadores de entrada y progresión del ciclo celular, corroborando la concordancia de dicha expresión en nuestros cultivos con la localización nuclear

esperada de acuerdo a sus funciones reportadas (Darzynkiewicz et al., 2015). Los resultados de los ensayos de IHQ para los marcadores de fase S del ciclo celular PCNA y Ciclina A (Figura 4.1.16) demuestran que la presencia de las proteínas virales indujo la expresión de dichos marcadores de proliferación en los estratos más diferenciados suprabasales, tal como fuera previamente descrito (Flores et al., 2000; Wang et al., 2009), tanto para los HPV de alto como de bajo riesgo. En el caso de estos últimos, el efecto fue menor que el observado para HPV-18, como se esperara de acuerdo a la inducción diferencial del ciclo celular por parte de ambos tipos virales (Doorbar et al., 2012; Schutze et al., 2014).

Contrariamente, los ensayos en la línea celular HEK293, presentados en la Figura 4.1.17, indicarían que en dichas células las proteínas virales no son capaces de modificar los niveles del marcador de progresión del ciclo celular ciclina E. Sin embargo, dicha línea es transformada y sus puntos de control del ciclo celular se encuentran notoriamente alterados *per se*. Esto podría explicar, en parte, el hecho de que los cambios en los niveles de DLG1 en presencia de las proteínas virales hayan sido más marcados en los casos de cultivos organotípicos que en los ensayos en monocapa.

El modelo organotípico no presenta las restricciones mencionadas del modelo en células transformadas. Por lo tanto, las observaciones realizadas en estos cultivos son suficientes para señalar que las alteraciones en el ciclo celular generadas por las proteínas virales, muy probablemente estén relacionadas con los cambios obtenidos en las proteínas de polaridad en este entorno; aunque no se puede descartar la participación de otros mecanismos relevantes.

Entre tales probables mecanismos cabe considerar la diferenciación celular. En este sentido, ha sido reportado que las proteínas de HPV podrían inhibir la diferenciación epitelial con el objetivo de favorecer la síntesis de ADN en las capas suprabasales del epitelio. Por otro lado, como se mencionó, la regulación de la expresión y funciones de DLG1 implica un complejo conjunto de mecanismos celulares dependientes de la diferenciación celular. Entre ellos se incluyen procesos de *splicing* alternativo así como fosforilaciones específicas, que en conjunto ayudan a definir su abundancia y distribución subcelular (Roberts et al., 2012). Teniendo en cuenta que las proteínas virales E6 y E7 se asocian con desregulaciones del programa de diferenciación,

es probable que tales eventos, se encuentren alterados en las infecciones virales, con el consecuente cambio en la expresión de DLG1.

Como descripto, se ha demostrado la inhibición de marcadores de diferenciación por acción de proteínas de HPV tanto de alto como de bajo riesgo (Duffy et al., 2003; Flores et al., 2000; Gyongyosi et al., 2012; Kravchenko-Balasha et al., 2009; Schutze et al., 2014; Wan et al., 2008; Zhang et al., 2006). Además, se ha reportado que dichos marcadores disminuyen en lesiones cervicales (Santin et al., 2005; Wong et al., 2006). Por lo tanto, una perspectiva importante del presente trabajo radicará en determinar la incumbencia de los cambios en la diferenciación epitelial en relación a los resultados obtenidos utilizando cultivos *raft*. Estudios ulteriores analizando por IHQ marcadores de diferenciación en las distintas condiciones serían necesarios, puesto que un mayor entendimiento de estos procesos podría ser crucial a la hora de comprender en detalle las variaciones de DLG1 durante las infecciones por HPV y su relevancia en la infección viral.

Por otro lado, a partir de los datos obtenidos para DLG1, nos propusimos ampliar el análisis a otra proteína celular de polaridad también reportada como blanco celular de HPV: la proteína PAR3 (Facciuto et al., 2014); siendo esta proteína clave en la formación de las UT y en la regulación de señales que regulan la proliferación celular (Wu et al., 2007). Para poder estudiar la expresión de PAR3 en presencia de las proteínas virales en el contexto de los cultivos organotípicos desarrollados, en primer lugar nos abocamos a establecer y validar un protocolo de IHQ para dicha proteína, tal como se detalla en la sección 4.1.2.1.1. Es importante remarcar que logramos corroborar tanto la reproducibilidad como la especificidad de la marca obtenida.

La marcación alcanzada para PAR3 en los cultivos control fue predominantemente nuclear a nivel de las capas basales, con una localización subcelular también citoplasmática y de mucha menor intensidad en las capas más diferenciadas de dicho epitelios. La principal sorpresa de estos resultados radica en no haber podido evidenciar una expresión de PAR3 a nivel de los bordes celulares, tal como se esperaría si se consideran sus funciones a nivel de las uniones celulares, así como lo observado previamente (Bonastre et al., 2015; Facciuto et al., 2014; Goldstein and Macara, 2007; McCaffrey et al., 2012; Xue et al., 2013). Sin embargo, como se mencionó, sí había sido

reportada una localización nuclear para PAR3, con diversas implicancias en la reparación del ADN en algunas líneas celulares (Facciuto et al., 2014; Fang et al., 2007).

Al analizar mediante dicho protocolo de IHQ los cultivos organotípicos expresando las proteínas virales de alto y bajo riesgo (Figuras 4.1.21 y 4.1.23), PAR3 presentó mayores niveles que en los *raft* control, mientras que la localización de dicha proteína resultó ser tanto nuclear como citoplasmática. Al mismo tiempo, PAR3 se expresó en todos los estratos de los epitelios y no sólo en los estratos basales, lo que recuerda a lo observado para la proteína DLG1 y que podría relacionarse a un cambio en los patrones de diferenciación con presencia de células de tipo basales en las capas más superficiales.

Estos aumentos generales en la abundancia de PAR3 en presencia de las proteínas virales de HPV-18 y -11 fueron a su vez corroborados mediante ensayos de WB. Si bien algunos resultados no reflejan los aumentos observados mediante la técnica de IHQ, en general dichos ensayos cuantitativos mostraron que las proteínas virales inducirían significativamente la expresión de PAR3. Dicho efecto fue corroborado también en líneas celulares en cultivo (Figura 4.1.22 y 4.1.24).

De acuerdo a los hallazgos detallados, sería oportuno ser prudente en cuanto a las conclusiones que pudieran surgir a partir de los datos en relación a la localización de PAR3 observada por IHQ. Esto último considerando la ausencia de marcación en los bordes celulares, distribución esperada de acuerdo a los reportes de nuestro y otros laboratorios utilizando células o bien muestras histológicas (Facciuto et al., 2014). No obstante, muchas más certezas surgen a partir del análisis de los niveles de expresión de PAR3 en estas condiciones, utilizando incluso ensayos de WB optimizados previamente. Así, en conjunto, podemos aseverar que dicha proteína de polaridad presenta aumentos significativos ante la presencia de las proteínas virales estudiadas. Más aún, tal expresión viral en cultivos organotípicos se vinculó con una expresión de PAR3 a nivel de todas las capas epiteliales, en forma opuesta a la expresión circunscripta a las capas basales observada en cultivos control.

De esta forma, tanto la expresión de proteínas de HPV-18 como de HPV-11 se asociaron de igual manera a cambios en la expresión de PAR3, indicando un probable mecanismo común de alteración de la mencionada proteína celular por ambos tipos

virales. Estos resultados son reminiscentes de lo observado para la proteína de polaridad DLG1, regulada también por HPV de alto y bajo riesgo oncogénico. Por lo tanto, conjuntamente los datos sugieren la existencia de mecanismos comunes de regulación de diferentes proteínas de polaridad por parte de proteínas de HPV, lo que podría tener importantes implicancias en las correspondientes infecciones virales y en las patologías asociadas.

Teniendo en cuenta los resultados hasta aquí referidos, también consideramos de interés poder evaluar las posibles alteraciones de PAR3 en lesiones asociadas a infecciones por HPV. Esto con el fin último de entender su rol en la mencionada progresión maligna y ayudar a comprender los resultados obtenidos en cultivos organotípicos. Existen controversias en cuanto a la real función de PAR3 en la progresión tumoral y metástasis. Se ha observado tanto aumentos como disminuciones en su expresión en distintos tumores (particularmente en mama), así como deslocalización y redistribución hacia el citoplasma. Por ello, ha sido sugerido que su función en la progresión maligna depende del entorno y del tipo tumoral (Bonastre et al., 2015; Dugay et al., 2014; Iden et al., 2012; Jan et al., 2013; McCaffrey et al., 2012; Xue et al., 2013).

Considerando lo expuesto, realizamos un estudio preliminar de la expresión de PAR3 en muestras normales y lesiones cervicales, aplicando para ello el protocolo de IHQ previamente desarrollado. Como se observa en la Figura 4.1.25, la marcación de PAR3 en el cérvix normal estuvo de acuerdo con lo que habíamos encontrado previamente en cultivos *raft* sin expresar proteínas virales. Esto es, PAR3 se expresó a nivel nuclear y citoplasmático y especialmente en los estratos inferiores del epitelio. En cambio, las biopsias de lesiones cervicales de distinta severidad mostraron también una marcación nuclear y citoplasmática de PAR3. Relevantemente, dicha proteína celular se expresó tanto en los estratos basales como en los superiores. Además, las muestras de HSIL mostraron una marcación aumentada respecto de las lesiones de menor severidad y las muestras normales. Si bien es necesario considerar que los presentados son resultados preliminares incluyendo un muy bajo número de muestras, la utilidad de estas observaciones radica en que las mismas concuerdan con lo previamente obtenido en cultivos organotípicos tanto en presencia como en ausencia de proteínas de HPV. Considerando que las SIL se clasifican en distintos grados de acuerdo a la extensión del

epitelio normal diferenciado que es reemplazado por células no diferenciadas de tipo basaloides, estos datos obtenidos en tejido cervical sugieren también que la diferenciación celular podría estar asociada a los cambios en la expresión de la proteína de polaridad PAR3.

Si bien los resultados referentes a los niveles de expresión de PAR3 son en sí mismos interesantes, dado que consolidan la existencia de mecanismos de regulación de proteínas de polaridad por HPV, cabe destacar que (al igual que en tejidos organotípicos) no se evidenció marcación de PAR3 a nivel de los contactos celulares en las biopsias cervicales analizadas. Esto es llamativo considerando que PAR3 forma y regula las UT y que, para llevar a cabo algunas de sus funciones regulatorias reportadas, requiere una localización asociada a membrana (Pieczynski and Margolis, 2011). Por ello, consideramos que sería interesante contar con un protocolo de IHQ que nos permita estudiar fehacientemente no sólo los niveles sino también la localización de PAR3 con mayores certezas. En este sentido, creemos que sería de gran valor poder re-optimizar un protocolo de IHQ para la marcación de PAR3 con una mayor sensibilidad para poder distinguir la localización en los contacto celulares. De hecho, en el último tiempo nuevos anticuerpos primarios anti-PAR3 indicados específicamente para ensayos de IHQ se encuentran disponibles en el mercado: orb162298 (Biorbyt, EE.UU.), STJ94955 (St John's Laboratory, Reino Unido), 135908 (United States Biological, EE.UU), ENT3590 (Elabscience, China), 11916031 (Raybiotech Inc., EE.UU), ab64646 y ab64840 (Abcam, Reino Unido). El número y diversidad de anticuerpos que han surgido en los últimos años son fiel indicador de la relevancia de esta proteína en estudios científicos desarrollados a nivel mundial.

El conjunto de resultados obtenidos tanto en biopsias como en cultivos *raft* para PAR3, subrayan también la posible relevancia de las formas nucleares de esta proteína específicamente en procesos asociados a HPV. Como se mencionó, Polette y colaboradores reportaron que en un contexto de disrupción de la polaridad celular, la migración al núcleo de proteínas de polaridad podría cumplir funciones reguladoras de la transcripción (Polette et al., 2005). La localización nuclear de PAR3 fue reportada recientemente en nuestro grupo en células expresando la oncoproteína E6 de HPV-18 (Facciuto et al., 2014). Dicha localización también había sido señalada por otros autores

en células HPV positivas y en células derivadas de carcinoma epidermoide, además de que por análisis bioinformáticos se indicó que PAR3 contaría con una señal de localización nuclear (Fang et al., 2007).

A partir de que cada vez es más conocida la localización nuclear de proteínas de polaridad en contextos sin la polaridad celular alterada, se ha planteado la posibilidad de que dichas proteínas celulares estén cumpliendo funciones nucleares en el control de la expresión génica en un contexto fenotípico normal (Lelievre, 2010). Así, ha sido sugerido que PAR3 podría tener una función específica como proteína nuclear durante procesos de reparación del ADN (Fang et al., 2007), y en este punto es importante recalcar, tal como fue mencionado previamente, que las oncoproteínas de HPV tienen funciones conocidas en la inducción de mecanismos celulares de respuesta al daño de ADN (Gillespie et al., 2012; McKinney et al., 2015). A partir de lo dicho, queda en claro que sería importante realizar nuevos estudios para comprender la real significancia de la expresión de PAR3 a nivel nuclear, al igual que su sobre-expresión en el citoplasma, de manera de poder inferir cuáles son los efectos biológicos subyacentes a los cambios en esta y otras proteínas de polaridad asociados a infecciones por HPV.

En conjunto, y dado que nuestros resultados sugieren la existencia de mecanismos comunes de regulación para ciertas proteínas de polaridad (en este caso DLG1 y PAR3), sería relevante dilucidar detalladamente dichos mecanismos en los procesos asociados a infecciones por HPV, particularmente durante las progresiones tumorales asociadas y considerando su potencial uso como biomarcadores.

A continuación, habiendo estudiado la expresión de tales proteínas de polaridad en presencia de las proteínas de HPV utilizando cultivos *raft*, consideramos de gran interés conocer más profundamente cómo estaba teniendo lugar la expresión de los genes virales correspondientes. Estudiar la expresión génica viral en los cultivos organotípicos desarrollados es relevante para comprender con más profundidad lo observado en cuanto a la regulación de blancos celulares de polaridad en este contexto, principalmente si se tiene en cuenta la característica expresión diferencial a lo largo del epitelio de las proteínas virales (Doorbar et al., 2015).

En este sentido, nos propusimos analizar el fenómeno de *splicing* en los transcriptos tempranos de HPV de alto riesgo que da lugar a distintas isoformas para la

oncoproteína E6. Es importante remarcar que si bien las diferencias bioquímicas de las correspondientes isoformas E6FL y E6\* son conocidas, la regulación del mencionado mecanismo de *splicing* en el contexto de la infección, así como la función respectiva de cada isoforma dentro del epitelio durante la replicación viral o el desarrollo de patología, aún no han sido esclarecidos totalmente (Heer et al., 2011; Pim et al., 2009; Rosenberger et al., 2010). Más aún, la información disponible resulta controversial.

De hecho, los reportes disponibles inicialmente sobre E6\* indicaban funciones oncosupresoras y de limitación de la infección viral. Así, E6\* disminuiría la degradación mediada por E6 de p53 (Pim and Banks, 1999) y de procaspasa-8 (Filippova et al., 2007), regulando la inhibición de los mecanismos de apoptosis en células HPV positivas. Por otro lado, se ha propuesto que E6\* podría interferir con distintos blancos de HPV, mediante ensayos en células en cultivo, aunque con gran incertidumbre sobre los probables mecanismos implicados (Pim et al., 2009; Storrs and Silverstein, 2007). De esta forma, hasta al momento no ha sido confirmado ningún blanco celular específico de E6\* (Vande Pol and Klingelutz, 2013).

Además, y en línea con las controversias planteadas, cada vez son más las evidencias que señalan roles oncogénicos de E6\*. Se ha evidenciado que la prevalencia de dicha isoforma aumentaría con la severidad de las lesiones. Más aún, la forma transcripcional de E6\* se reconoce como la más abundante presente en cáncer cervical o líneas celulares derivadas (Bohm et al., 1993; Hafner et al., 2008; Rosenberger et al., 2010). En el mismo sentido, recientemente se han evidenciado funciones anti-apoptóticas mediadas por E6\* (Filippova et al., 2009). Además, Williams y colaboradores plantearon que E6\* podría tener un rol importante en la mutagénesis inducida por el virus, al incrementar las especies reactivas del oxígeno y el concomitante daño del ADN celular (Williams et al., 2014) y disminuyendo la acción de agentes terapéuticos (Filippova et al., 2014).

Así, E6\* podría modular las funciones de E6 con distintas consecuencias de acuerdo al blanco de E6 que se analice, y de este modo este *splicing* alternativo constituiría un evento importante que permitiría regular, no sólo la expresión, sino también la función de las proteínas virales. Sin embargo, esto no ha sido aún analizado

en el contexto del epitelio estratificado en relación a una infección por HPV, ni tampoco su implicancia en el desarrollo tumoral.

Considerando lo expuesto, y dado que no existen anticuerpos específicos de E6\* (Heer et al., 2011), desarrollamos una metodología molecular que nos permitiera analizar la expresión transcripcional correspondiente a dicha isoforma en los cultivos E6E7 18 generados. Relevantemente, pudimos establecer mediante WB la expresión de la isoforma E6\* en dichos cultivos, en concordancia con lo observado a nivel proteico mediante la utilización del correspondiente anticuerpo no comercial de la compañía Arborvita (Figura 4.2.1). Además, la presencia de E6\* en estos *raft* se condice con lo esperado en cultivos expresando activamente E7 a partir del ARN policistrónico (Heer et al., 2011; Tang et al., 2006).

Dada la expresión diferencial de las proteínas de HPV según las capas epiteliales (Meyers and Laimins, 1994), decidimos estudiar la mencionada expresión de E6\* en los distintos estratos de los cultivos E6E7 18 generados. Para ello, haciendo uso de la metodología de LCM (sección 3.7.3 de Materiales y métodos), delimitamos tres zonas distintas (Inferior, Intermedia y Superior) en dichos epitelios para su disección y posterior análisis. Mediante ensayos de qPCR (Figura 4.2.3.B) demostramos que dichos transcriptos se expresan en todas las capas epiteliales, pero con mayor abundancia relativa en la capa Inferior. Considerando que se ha reportado la expresión de E6\* y E7 a partir de los mismos transcriptos (del Moral-Hernandez et al., 2010; Heer et al., 2011; Schwartz, 2013; Tang et al., 2006), estos resultados indican una probable mayor expresión viral en dichas células basales en comparación a las capas superiores. Estos resultados, aunque preliminares, son interesantes en el conocimiento de la transcripción viral en el contexto epitelial. Así, hemos podido determinar por primera vez la expresión de E6\* de HPV-18 en los distintos estratos de cultivos organotípicos.

Por otro lado, y en contraste a la determinación de los transcriptos propios de E6\*, no pudimos establecer en estas muestras la expresión transcripcional correspondientes a la isoforma E6FL en la muestras disectadas. La expresión de E6FL en los cultivos organotípicos E6E7 18 desarrollados, aunque probablemente baja en comparación a los niveles de E6\*, queda en evidencia tanto por su detección a nivel proteico utilizando muestras totales de *raft* (Figura 4.2.1) como por la expresión de su

blanco celular p53 (Figuras 4.1.5 y 4.1.6) (Pim and Banks, 1999). En este sentido, cabe aclarar que aún en bajas cantidades E6FL podría cumplir su función de inducir la degradación de p53, dada la gran eficiencia con la que es capaz de inducir dicha degradación (Pim and Banks, 2010). Más aún, ha sido señalado previamente que E6FL se expresa en niveles mucho menores que los respectivos a E6\* (Hafner et al., 2008; Heer et al., 2011). Así, el hecho de no haber podido determinar la expresión de E6FL se debe, más probablemente, a la baja recuperación del ARN desde el material analizado a partir de las muestras disectadas por LCM, que a una ausencia de expresión de dicha isoforma.

Por lo tanto, pudimos establecer la expresión de E6\* en el epitelio pero no en forma relativa a E6FL. En este sentido, ha sido ampliamente propuesta la importancia de estudiar la relación entre ambas isoformas, indicándose que su expresión relativa podría tener efectos profundos en la biología celular de las células infectadas durante el ciclo viral y también en la progresión maligna (Heer et al., 2011; Pim et al., 2009), y se ha indicado que diferentes relaciones entre ambas isoformas podrían tener efectos celulares muy diferentes (Filippova et al., 2009). Más aún, reportes recientes estudian en detalle la relación entre las isoformas de E6 de HPV-16 en lesiones y tumores (Cricca et al., 2009; Hong et al., 2015). Así, estos y otros estudios evidencian la gran relevancia que ha adquirido en los últimos años el estudio de E6\* y, en particular, la relación entre ambas isoformas de E6 en el contexto oncogénico (Gheit et al., 2014; Kosel et al., 2007). Cabe destacar que la mayoría de los reportes hasta el momento se refieren al HPV-16 (Heer et al., 2011; Hong et al., 2015), mientras que es mínimo el número de investigaciones focalizadas en el HPV-18, tipo viral de mayor interés para nuestro grupo y tipo de HPV más agresivo (Lace et al., 2009; Walker et al., 1989; Zhang et al., 1995)

Por todo lo dicho, y en base a que ya hemos desarrollado metodologías orientadas a conocer la expresión de ambas isoformas de E6 de HPV-18, una posibilidad sería intentar mejorar el rendimiento de las muestras. Por ejemplo, podrían utilizarse metodologías de criodisección, las cuales, aunque mucho más complejas, han sido asociadas a muy buenas recuperaciones de ARN (Bottner et al., 2010; Yang et al., 2008). Además, hemos comenzado a desarrollar nuevos cultivos expresando únicamente la oncoproteína E6 de HPV-18 (*raft* E6 18). Así, entre las perspectivas de esta parte del proyecto, que forman parte del trabajo de Tesina de Guido Barbieri, nos abocaremos a

evaluar ambas isoformas tanto en los cultivos E6E7 18 como en los nuevos E6 18, con especial énfasis en lograr una mejor recuperación del ARN desde el material. De obtenerse resultados satisfactorios sería factible poder establecer la relación en la expresión de ambas isoformas y, por ende, profundizar en el entendimiento de la infección viral en el contexto del microambiente epitelial. A su vez, los *raft* E6 18 nos permitirán detectar posibles diferencias en la expresión génica ante la presencia o no del marco abierto de lectura correspondiente a E7.

Habiendo analizado la expresión génica viral en dichos cultivos, nos propusimos también estudiar su posible relación con la transcripción de blancos celulares de HPV. Así, nos focalizamos en el estudio de *DLG1*, para la que habíamos realizado estudios previos demostrando mayor actividad transcripcional de su promotor en presencia de proteínas virales (Figura 4.1.1 Capítulo 1) (Cavatorta et al., 2008). Utilizando las mismas muestras obtenidas por la técnica de LCM, observamos que la transcripción de *DLG1* se incrementa en presencia de las proteínas virales en todos los estratos epiteliales del tejido E6E7 18 (Figura 4.2.4), en concordancia con nuestros ensayos de luciferasa para el análisis de la actividad promotora de *DLG1*. Más aún, la capa Inferior de dicho tejido, que había sido la que mayor expresión viral relativa había mostrado, fue la que presentó un aumento significativamente mayor en la expresión transcripcional de *DLG1*. Estos resultados sugieren una relación entre la expresión génica viral y los patrones transcripcionales de *DLG1* en los distintos estratos epiteliales del cultivo E6E7 18.

Mientras varios estudios analizan los efectos de E6 sobre la expresión proteica de ciertas proteínas celulares, también ha sido reportado que E6\* podría cumplir actividades de regulación transcripcional de ciertos blancos. Se ha propuesto que, dada la diferente conformación de E6\* respecto a E6FL, podrían presentar capacidades diferenciales de interacción con factores de transcripción y por ende de regulación génica (Wanichwatanadecha et al., 2012). A partir de esto puede especularse que E6\* podría ser relevante para los aumentos en los niveles de transcritos de *DLG1* observados en los cultivos organotípicos, aunque no es posible descartar la participación de las otras proteínas virales y por lo que más estudios serán necesarios. Estos datos constituyen un avance en el camino de dilucidar el complejo entramado molecular que permita explicar

los aumentos en la proteína DLG1 tanto en cultivos *raft* como en lesiones cervicales, asociadas a infecciones de HPV.

Sin embargo, dada la característica preliminar de los resultados expuestos, continuaremos evaluando la expresión de DLG1 en el contexto epitelial en presencia de proteínas de HPV. En este sentido, esperamos poder relacionar los datos que obtengamos en cuanto a la expresión viral, y especialmente en cuanto a la expresión relativa de las isoformas de E6, con la expresión de blancos celulares de HPV. Así, se podrán contrastar nuevos datos con los resultados presentados en el Capítulo 1 de esta Tesis. Es de gran relevancia para nuestro grupo continuar estudiando el mencionado evento de *splicing* y poder conocer con mayor exactitud la potencial funcionalidad de este evento en el contexto natural de infecciones por HPV y los procesos oncogénicos asociados. Esto con el fin último de comprender cómo la regulación espacio-temporal de las proteínas virales puede asociarse a cambios en los arquetipos de expresión de las proteínas de polaridad celular y, más aún, evaluar su potencial uso como biomarcadores.

Por otro lado, y como se indicó anteriormente, la expresión de DLG1 se encuentra alterada durante procesos oncogénicos tanto asociados como independientes de HPV. En este sentido, dado que el desarrollo oncogénico es un proceso biológico complejo y multifactorial, otros mecanismos independientes de la infección viral podrían estar contribuyendo a los cambios de la expresión de DLG1 observados en biopsias (Boussioutas et al., 2003; Cavatorta et al., 2004; Fuja et al., 2004; Gardiol et al., 2006; Liu et al., 2002). Así, alteraciones epigénéticas y, en particular modificaciones en el patrón de metilación del ADN, han sido implicadas en el desarrollo y progresión tumoral. (Daniel et al., 2011; Rodenhiser, 2009). Por ello, nos propusimos estudiar la participación de estos mecanismos en la regulación de la expresión de DLG1. Cabe considerar que la región promotora de *DLG1* presenta gran densidad de dinucleótidos CpG. De hecho, identificamos tres Islas CpG en dicho promotor (Figura 4.3.2), señalando la posibilidad de que sea regulado por metilación.

Al realizar ensayos tratando ADN genómico de las líneas celulares HeLa y C33A con enzimas de restricción sensibles al estado de metilación sobre la ISLA 1 del promotor de *DLG1*, los resultados resultaron acordes con regiones promotoras no metiladas (Figura 4.3.3). Sin embargo, como se mencionó, por esta técnica solo se pudo monitorear

el estado de algunos pocos residuos CpG en dicha Isla. Por ello, aplicamos a continuación una metodología más sensible y que brindara información más detallada del estado de metilación del promotor de *DLG1*: amplificación de ADN tratado con bisulfito sódico y secuenciación; que indica en forma fidedigna el estado metilado o no metilado de cada dinucleótido CpG analizado. Para ello se diseñaron y optimizaron reacciones específicas para amplificar el ADN en forma independiente al estado de metilación en cada una de las tres Islas CpG presentes en el promotor en estudio. Dichos cebadores tipo MIP se esquematizan en la Figura 4.3.2.

Todos los resultados derivados del análisis en células en cultivo, presentados en la Figura 4.3.5, indicaron un estado de-metilado del promotor de *DLG1*, estando estos resultados en concordancia con los ensayos de digestión con enzimas sensibles a la metilación realizados (Figura 4.3.3). En este sentido, es importante destacar que se estudiaron distintas células incluyendo tanto líneas transformadas (HeLa, C33A, CaCo2, K562), líneas inmortales (HaCaT), como células normales epiteliales (PHK). Por lo tanto, al menos para el caso de los tipos celulares analizados, el estado de metilación del promotor de *DLG1* no sería el determinante del grado de expresión de la proteína DLG1.

No obstante, al realizar ensayos en líneas celulares de baja expresión de DLG1 con una droga inhibidora de enzimas ADN metil-transferasas, observamos aumentos en la correspondiente expresión transcripcional y/o proteica (Figura 4.3.1). Estos hallazgos resultaron aparentemente contradictorios, dado que la inhibición de las ADN metil-transferasas se vincula a la reactivación de genes previamente reprimidos por metilación (Christman, 2002). De esta manera se podría hipotetizar un efecto indirecto de dichas enzimas ADN metil-transferasas en la regulación de DLG1. Por ejemplo, ante el tratamiento con 5-aza se podrían generar cambios en distintos factores de transcripción involucrados en la regulación de *DLG1* (Cavatorta et al., 2008). Más aun, otro probable efecto indirecto de las enzimas ADN metil-transferasas se pone en evidencia cuando se analiza la línea celular HeLa. En este caso, los aumentos en los niveles proteicos observados son mucho más significativos que el aumento en los correspondientes niveles de transcritos. Así, podría hipotetizarse la presencia de modificaciones epigenéticas de genes involucrados en mecanismos de estabilización proteicos de DLG1. Estas son posibilidades ciertas, especialmente si se considera que los mecanismos

epigenéticos son relevantes en múltiples cambios de expresión durante los procesos carcinogénicos (Daniel et al., 2011). Por ello, el método de inhibición enzimática es un primer enfoque que debe ser siempre constatado con la identificación directa de las bases metiladas.

Para profundizar el análisis de la incumbencia de los mecanismos epigenéticos en la expresión de *DLG1* nos propusimos estudiar dichos mecanismos en el contexto de diversos tumores, más allá de los resultados obtenidos en líneas celulares en cultivo. En particular, la metilación de varios genes ha sido reportada como relevante en la tumorigénesis cervical (Szalmas and Konya, 2009; Tornesello et al., 2013), a partir de lo cual se ha propuesto utilizar la metilación como biomarcador en el monitoreo de lesiones cervicales (Milutin Gasperov et al., 2015). Además, considerando la mayor relevancia reportada para las Islas CpG *upstream* del inicio transcripcional (Deaton and Bird, 2011; Rincon-Orozco et al., 2009), analizamos el estado de metilación de la ISLA1 del promotor de *DLG1* en biopsias cervicales normales y en lesiones de distinta severidad. Los resultados representados en la Figura 4.3.6 indican un estado de-metilado para el promotor en estudio, independientemente del tipo de muestra. Por lo tanto, los cambios reportados en la expresión de *DLG1* durante la progresión maligna cervical (Cavatorta et al., 2004) no se asociarían a mecanismos de regulación epigenéticos sobre la correspondiente región promotora, como fuera reportado en este tipo de tumor para otros genes regulatorios (Szalmas and Konya, 2009).

Asimismo analizamos la probable incumbencia de la metilación del promotor de *DLG1* en la regulación de la expresión proteica durante el desarrollo de tumores de colon, también asociados a una expresión diferencial en los distintos estadios de *DLG1* (Gardiol et al., 2006). El análisis de la ISLA1 en biopsias de colon, presentado en la Figura 4.3.7, señaló tres bases CpG metiladas en la muestra de colon normal que se encuentran de-metiladas en la correspondiente muestra tumoral (adenocarcinoma con buena diferenciación). Análisis posteriores de la localización de estas bases indicaron que no se encontraban en residuos pasibles de ser analizados por enzimas de restricción sensibles a la metilación. Esto subraya la importancia del método de tratamiento por bisulfito y secuenciación para poder realizar análisis epigenéticos detallados y precisos. La posible relevancia de este resultado en biopsias de colon radica en la expresión relativa de *DLG1*

en cada una de las muestras mencionadas (Figura 4.3.8), siendo su expresión en tejido normal menor a la observada en tumores de colon con buena diferenciación (Gardiol et al., 2006).

De hecho, y como se detalló en la Introducción del presente trabajo de Tesis ha sido especialmente descripta la represión de expresión génica por hipermetilación de promotores (Rodenhiser, 2009), pero cada vez son más los reportes de genes sobreexpresados en forma específica mediante patrones de hipometilación de las correspondientes regiones promotoras (Brucato et al., 2014; Cui et al., 2008; Hoffmann and Schulz, 2005; Jung et al., 2013; Paredes et al., 2005; Park et al., 2014). En todo caso, la falta de expresión génica a partir de los correspondientes promotores metilados se asocia a una inhibición directa de la unión de factores de transcripción o al reclutamiento de proteínas específicas que modifican la cromatina y la vuelven menos accesible a la maquinaria de transcripción celular (Deaton and Bird, 2011). Así, la pérdida de esta metilación podría disparar mecanismos de transcripción previamente reprimidos.

Por lo tanto, y en vistas de los resultados obtenidos, un mecanismo de hipometilación de promotor podría estar implicado en la expresión aumentada de *DLG1* asociada a lesiones neoplásicas intermedias de colon, como la analizada. Es interesante señalar que en ensayos previos en células en monocapa analizamos el estado del promotor de *DLG1* en células transformadas de colon (encontrándose un estado demetilado de dicho promotor), pero no contamos con células normales de colon, lo que sería interesante para comparar con los resultados obtenidos en biopsias

Además, dado el carácter preliminar de estos resultados y la reportada variabilidad de la metilación entre muestras (Laird, 2010), deberíamos analizar un número mucho mayor de biopsias. De esta manera podríamos establecer si la metilación en las muestras analizadas representa verdaderamente el estado de metilación característico de cada uno de los estadios en la progresión tumoral en estudio. Así, podríamos concluir fehacientemente en cuanto a la implicancia de este mecanismo en la regulación de la expresión de la proteína celular.

Más aún, la aplicación de otras metodologías podría ser útil en este sentido. Así, el diseño de cebadores utilizado en este estudio (MIP), si bien permite estudiar regiones cuyo estado de metilación sea desconocido, cuenta con diversas desventajas. Entre ellas,

además de implicar laborosos diseños y puesta a punto de reacción, su principal perjuicio radica en su baja sensibilidad, requiriéndose altos porcentajes de metilación para su detección (Herman et al., 1996). En este sentido, aunque incurriendo en mayor complejidad técnica y costos superiores, una estrategia posible para mejorar la sensibilidad de esta técnica sería generar clones a partir de los amplificadores de cada muestra, para luego ser secuenciados.

Más aún, si bien el diseño de cebadores MIP amplifica tanto ADN metilado como no metilado, intrínsecamente dichos cebadores guardan cierta tendencia en la PCR subsecuente que favorece la amplificación de los templados no metilados (Wojdacz et al., 2008). En base a esto, una perspectiva interesante de esta parte del trabajo sería hacer uso del diseño de cebadores específicos de metilación (MSP, del inglés *methylation specific primers*). Dicha metodología, en la cual los cebadores son diseñados específicamente para amplificar ADN metilado o demetilado, presenta mayores sensibilidades analíticas (Barekati et al., 2010). Así, dicho diseño MSP nos permitiría evaluar con mayor sensibilidad el estado de metilación de las regiones previamente analizadas en el promotor de *DLG1* y, en particular, las bases que resultaron diferencialmente metiladas en el tejido normal de colon.

A partir de que han sido identificados múltiples eventos de hipometilación específica de genes que se asocian con el correspondiente aumento en su expresión en el contexto de progresiones tumorales y metástasis (Hoffmann and Schulz, 2005), se indica claramente a dicha pérdida aberrante del *imprinting* de metilación como un evento importante durante los procesos oncogénicos y de implicancia clínica (Daniel et al., 2011; Rodenhiser, 2009). Incluso ha sido evidenciada la sobre-expresión de una proteína de polaridad (P-cadherina) en tumores por hipometilación específica del promotor (Paredes et al., 2005), lo que remarca la implicancia de estos mecanismos regulatorios para proteínas importantes en la polaridad celular.

A su vez, ha cobrado gran relevancia el estudio de procesos de regulación epigenéticos en carcinogénesis de colon (Damaschke et al., 2013; Illingworth et al., 2010), al punto de aplicarse en la clasificación de la patología y posterior tratamiento, particularmente orientado a una medicina personalizada (Ng and Yu, 2015; Ogino et al.,

2011). También, procesos de hipometilación en colon se han reportado muy recientemente vinculados a la resistencia a tratamientos (Zhao et al., 2015).

Por todo lo dicho, gran parte de los resultados obtenidos, especialmente utilizando células en cultivos, indican que la metilación del promotor de *DLG1* no sería el evento determinante en regular los niveles de expresión de la proteína. Sin embargo, sí resultaría interesante profundizar estos estudios en contextos específicos, como por ejemplo la progresión tumoral de colon y otras neoplasias, mediante la aplicación de técnicas más sensibles como se describió. Esto especialmente considerando la complejidad y carácter multifactorial de los procesos carcinogénicos, donde numerosos mecanismos pueden estar involucrados en la regulación génica.

En resumen, este trabajo de Tesis Doctoral aporta al entendimiento de la regulación de la expresión de las proteínas de polaridad *DLG1* y *PAR3* durante los procesos malignos en general, y en particular durante aquellos asociados a infecciones por HPV. Cabe destacar además, que la transferencia a la clínica de los conocimientos surgidos de estudios de patobiología básica, como es el presente trabajo, resulta de gran relevancia para la búsqueda de biomarcadores, permitiendo contribuir al diagnóstico y seguimiento de enfermedades malignas.

## **6. CONCLUSIONES**



En la primera parte de este trabajo de Tesis analizamos la interferencia de proteínas virales de HPV de alto y bajo riesgo oncogénico en la regulación de la expresión proteínas de polaridad. Esto considerando los cambios observados previamente en dichas proteínas celulares durante el desarrollo oncogénico. Decidimos analizar en primera instancia posibles alteraciones en la expresión de la proteína de polaridad DLG1. Así, demostramos una regulación de la actividad del promotor del gen correspondiente por algunas proteínas de HPV. A partir de esto, continuamos evaluando la incumbencia de dichas proteínas en la expresión de DLG1.

A su vez, pudimos generar cultivos organotípicos *raft*, una herramienta muy importante para el estudio de virus epiteliotrópicos como el HPV y que no había sido utilizada anteriormente en nuestro ambiente de trabajo. Mediante cultivo tradicional en monocapa y, especialmente, utilizando dichos cultivos organotípicos, demostramos que E7 y E6/E7 tanto de HPV de bajo (HPV-11) como de alto riesgo (HPV-18) inducen cambios en la distribución y abundancia de DLG1, lo que podría constituir un mecanismo común importante para la replicación viral. En el contexto de dichos cultivos organotípicos, se destaca la diferente expresión de DLG1 en los bordes celulares entre ambos tipos virales. Así, indicamos la depleción de dicha proteína en los contactos intercelulares para los cultivos expresando oncoproteínas de HPV-18, localización que se mantiene en el caso de HPV-11. Esto podría estar reflejando diferencias significativas para las patologías asociadas a cada tipo viral. También evidenciamos cambios en la localización citoplasmática y nuclear de la proteína celular, proponiéndose distintos eventos que podrían estar implicados en estas observaciones. Cabe recalcar que también encontramos alteraciones importantes en la expresión de DLG1 en el contexto del genoma completo de HPV-18, muy probablemente vinculadas a la expresión correspondiente de las oncoproteínas virales, y de gran relevancia en vistas de la frecuente alteración de DLG1 en lesiones asociadas a dichas infecciones virales.

Simultáneamente, discutimos en detalle alguno de los posibles mecanismos que podrían estar implicados en las alteraciones mencionadas. En este sentido, comenzamos

el análisis de la probable implicancia de procesos asociados a la progresión del ciclo celular y a la diferenciación tisular.

Además, analizamos los efectos de E7 y E6/E7 de HPV en la expresión de otra proteína de polaridad, PAR3. Reportamos fehacientemente alteraciones en sus niveles en presencia de dichas proteínas virales. También estudiamos posibles alteraciones de PAR3, detallando las posibles incumbencias de su localización nuclear. En este sentido, establecimos las bases para estudiar la expresión de PAR3 en muestras histológicas, considerando su posible utilidad como biomarcador.

En vistas de los resultados, se propuso la activación de mecanismos comunes de regulación de diferentes proteínas de polaridad en presencia de las proteínas de HPV, que podrían tener importantes implicancias en las correspondientes infecciones virales y en las patologías asociadas.

Por otro lado, nos abocamos a estudiar específicamente la relevancia del evento de *splicing* del preARNm temprano de HPV-18, que da lugar a distintas isoformas de la oncoproteína E6. A partir de la optimización de la metodología requerida, estudiamos la ocurrencia de dicho evento en los distintos estratos epiteliales del cultivo generado expresando las oncoproteínas virales, haciendo uso de la tecnología de LCM. Así, establecimos la presencia diferencial de transcritos correspondientes a la isoforma menor E6\* en las distintas capas epiteliales. Observamos una mayor transcripción relativa en las capas Inferiores del epitelio, lo que podría tener importantes implicancias en el conocimiento de dicho evento de *splicing* y de la expresión génica en general en el contexto epitelial.

Además, estudiamos la transcripción de *DLG1* en las mismas capas epiteliales y observamos una correlación positiva entre dicha transcripción y la correspondiente a la isoforma E6\*. Por lo tanto, estos resultados indican cambios en los patrones transcripcionales de *DLG1* en relación con la expresión de las proteínas virales.

Finalmente, en la última parte de este trabajo de Tesis, estudiamos la implicancia de eventos de metilación del promotor de *DLG1* en la regulación de su expresión. Así, se llevó a cabo la puesta a punto de distintas metodologías orientadas a realizar dichos análisis. En consecuencia, a partir de los resultados se señaló que estos mecanismos epigenéticos no serían los determinantes en el establecimiento de los niveles de

expresión de DLG1, aunque sí serían de interés en contextos particulares como la progresión maligna en colon. Además, se establecieron perspectivas importantes para hacer uso de las herramientas desarrolladas y concluir más fehacientemente en cuanto a la implicancia de estos procesos en la regulación de DLG1.

En conjunto, los resultados presentados en esta Tesis representan un avance hacia el mejor entendimiento de los procesos oncogénicos, con especial foco en aquellos vinculados a infecciones por HPV.

**LENGUAJE ESPECIAL**

<i>curva de melting</i>	curva de fusión del producto de PCR
<i>fold</i>	nivel de cambio
<i>full lenght</i>	completa
<i>imprinting</i>	huella
<i>in vitro</i>	que tiene lugar en forma aislada del contexto biológico de un organismo
<i>in vivo</i>	que tiene lugar dentro de un organismo
<i>kit</i>	equipo
<i>microarrays</i>	circuito integrado (chip) en cuya superficie sólida se une una colección de fragmentos de AN
<i>midbody</i>	cuerpo de gránulos durante la anafase de la mitosis
<i>partners</i>	compañeros asociados
<i>pellet</i>	botón
<i>per se</i>	en sí mismos
<i>performance</i>	rendimiento
<i>pocket</i>	bolsillo
<i>pool</i>	reservorio
<i>cultivos raft</i>	cultivos tipo balsa
<i>random</i>	generados al azar
<i>splicing</i>	corte y empalme
<i>tight</i>	oclusivas
<i>upstream</i>	corriente arriba

**ABREVIATURAS**

µg	microgramos
µl	microlitros
µm	micrómetros
<	menor a
≥	mayor o igual a
5-aza	5-Aza-2'-deoxycytidine
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
Amp	Ampicilina
Ampr	Ampicilina resistente
AN	ácido nucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BSA	Albúmina sérica bovina
C	citosa
CDK	quinasas dependientes de ciclinas CDK
CpG	dinucléotidos CG
CT	ciclo umbral
DAB	solución de dianminobenzidina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxiribonucleótidos
DO	Unidad de densidad óptica
DTT	ditiotreitól
E6*	E6 estrella
E6FL	E6 <i>full length</i>
EBV	Virus de Epstein-Barr
EDTA	ácido etilendiamintetra-acético
EE.UU.	Estados Unidos
EMT	transición epitelio mesenquimal

g	Constante de gravedad
G	guanina
h/hs	Hora/s
HA	Epítoto de la hemaglutinina del virus de Influenza
HBV	Virus de la Hepatitis B
HCV	Virus de la Hepatitis C
HDAC	histonas desacetilasas
HE	hematoxilina-eosina
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HPV	virus del Papiloma Humano
HSIL	Lesiones Escamosas Intraepiteliales de alto grado
HSV8	Virus Herpes humano tipo 8
HTLV-1	Virus linfotrópico de células T
IHQ	inmunohistoquímica
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
kb	kilo bases
kDa	kilo Dalton
Kn	Kanamicina
KSFM	Medio libre de suero para queratinocitos
kV	kilovoltios
LB	Luria Bertani
LCM	microdissección por captura laser
LCR	Región Larga de Control
LSIL	Lesiones Escamosas Intraepiteliales de bajo grado
LUC	luciferasa de luciérnaga
mA	Miliamperios
MAGUK	familia de guanilato quinasas asociadas a membrana
min	minuto/s
mM	Milimolar
Neo r	resistente a neomicina
ng	nanogramos

nm	Nanómetros
nt	nucleótidos
ori	origen de replicación
p/v	peso en volumen
pb	Pares de bases
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pM	picomolar
pmoles	picomoles
Puro r	resistente a Puromicina
qPCR	PCR cuantitativa
Rb	proteína del retinoblastoma
RCM	Medio de Cultivo para Raft
rpm	Revoluciones por minuto
RT	reacción de retro-transcripción
SD	desvío estándar
SDH	enzima Succinato deshidrogenasa
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
Seg	Segundo/s
SFB	Suero Fetal Bovino
SIL	Lesiones Escamosas Intraepiteliales
TAE	tris-acetato-EDTA
TRIS	N-tris-(hidroximetil) aminometano
U	Unidad
UA	uniones adherentes
UT	uniones <i>tight</i>
UTR	región no traducida
UV	Ultravioleta
v/v	volumen en volumen
VLP	Partículas tipo virales
WB	Western blot

## BIBLIOGRAFÍA

- ACIP (2015). Committee Opinion No. 641: Human Papillomavirus Vaccination. *Obstetrics and gynecology* 126, e38-43.
- Ajiro, M., and Zheng, Z.M. (2014). Oncogenes and RNA splicing of human tumor viruses. *Emerging microbes & infections* 3, e63.
- Alvarez-Salas, L.M., and DiPaolo, J.A. (2007). Molecular approaches to cervical cancer therapy. *Curr Drug Discov Technol* 4, 208-219.
- Allen-Hoffmann, B.L., and Rheinwald, J.G. (1984). Polycyclic aromatic hydrocarbon mutagenesis of human epidermal keratinocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7802-7806.
- Andrei, G., Duraffour, S., Van den Oord, J., and Snoeck, R. (2010). Epithelial raft cultures for investigations of virus growth, pathogenesis and efficacy of antiviral agents. *Antiviral Res* 85, 431-449.
- Antinore, M.J., Birrer, M.J., Patel, D., Nader, L., and McCance, D.J. (1996). The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *The EMBO journal* 15, 1950-1960.
- Aranda, V., Nolan, M.E., and Muthuswamy, S.K. (2008). Par complex in cancer: a regulator of normal cell polarity joins the dark side. *Oncogene* 27, 6878-6887.
- Arbeit, J.M., Howley, P.M., and Hanahan, D. (1996). Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2930-2935.
- Archibald, A., Mihai, C., Macara, I.G., and McCaffrey, L. (2015). Oncogenic suppression of apoptosis uncovers a Rac1/JNK proliferation pathway activated by loss of Par3. *Oncogene* 34, 3199-3206.
- Assemat, E., Bazellieres, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A., and Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta* 1778, 614-630.
- Bancroft, J.D., and Gamble, M. (2008). *Theory and practice of histological techniques*, 6th edn ([Edinburgh]: Churchill Livingstone).
- Banerjee, N.S., Wang, H.K., Broker, T.R., and Chow, L.T. (2011). Human papillomavirus (HPV) E7 induces prolonged G2 following S phase reentry in differentiated human keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* 286, 15473-15482.
- Barekati, Z., Radpour, R., Kohler, C., and Zhong, X.Y. (2010). Specificity of methylation assays in cancer research: a guideline for designing primers and probes. *Obstetrics and gynecology international* 2010.
- Benton, R., and St Johnston, D. (2003). A conserved oligomerization domain in drosophila Bazooka/PAR-3 is important for apical localization and epithelial polarity. *Current biology : CB* 13, 1330-1334.
- Bernard, H.U. (2013). Regulatory elements in the viral genome. *Virology* 445, 197-204.

- Bernard, H.U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., and de Villiers, E.M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401, 70-79.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Boccardo, E., Manzini Baldi, C.V., Carvalho, A.F., Rabachini, T., Torres, C., Barreta, L.A., Brentani, H., and Villa, L.L. (2010). Expression of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein alters keratinocytes expression profile in response to tumor necrosis factor-alpha. *Carcinogenesis* 31, 521-531.
- Boccardo, E., Noya, F., Broker, T.R., Chow, L.T., and Villa, L.L. (2004). HPV-18 confers resistance to TNF-alpha in organotypic cultures of human keratinocytes. *Virology* 328, 233-243.
- Bohm, S., Wilczynski, S.P., Pfister, H., and Iftner, T. (1993). The predominant mRNA class in HPV16-infected genital neoplasias does not encode the E6 or the E7 protein. *Int J Cancer* 55, 791-798.
- Bonastre, E., Verdura, S., Zondervan, I., Facchinetti, F., Lantuejoul, S., Chiara, M.D., Rodrigo, J.P., Carretero, J., Condom, E., Vidal, A., *et al.* (2015). PARD3 Inactivation in Lung Squamous Cell Carcinomas Impairs STAT3 and Promotes Malignant Invasion. *Cancer research* 75, 1287-1297.
- Borden, K.L. (2002). Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Molecular and cellular biology* 22, 5259-5269.
- Bossinger, O., Klebes, A., Segbert, C., Theres, C., and Knust, E. (2001). Zonula adherens formation in *Caenorhabditis elegans* requires *dlg-1*, the homologue of the *Drosophila* gene discs large. *Developmental biology* 230, 29-42.
- Bottner, M., Bar, F., Von Koschitzky, H., Tafazzoli, K., Roblick, U.J., Bruch, H.P., and Wedel, T. (2010). Laser microdissection as a new tool to investigate site-specific gene expression in enteric ganglia of the human intestine. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 22, 168-172, e152.
- Boussioutas, A., Li, H., Liu, J., Waring, P., Lade, S., Holloway, A.J., Taupin, D., Gorringer, K., Haviv, I., Desmond, P.V., *et al.* (2003). Distinctive patterns of gene expression in premalignant gastric mucosa and gastric cancer. *Cancer research* 63, 2569-2577.
- Brucato, N., DeLisi, L.E., Fisher, S.E., and Francks, C. (2014). Hypomethylation of the paternally inherited LRRTM1 promoter linked to schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*.
- Burgers, W.A., Blanchon, L., Pradhan, S., de Launoit, Y., Kouzarides, T., and Fuks, F. (2007). Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene* 26, 1650-1655.
- Bzhalava, D., Guan, P., Franceschi, S., Dillner, J., and Clifford, G. (2013). A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* 445, 224-231.
- Caruana, G., and Bernstein, A. (2001). Craniofacial dysmorphogenesis including cleft palate in mice with an insertional mutation in the discs large gene. *Mol Cell Biol* 21, 1475-1483.

- Cavatorta, A.L., Facciuto, F., Valdano, M.B., Marziali, F., Giri, A.A., Banks, L., and Gardiol, D. (2011). Regulation of translational efficiency by different splice variants of the Disc large 1 oncosuppressor 5'-UTR. *The FEBS journal* 278, 2596-2608.
- Cavatorta, A.L., Fumero, G., Chouhy, D., Aguirre, R., Nocito, A.L., Giri, A.A., Banks, L., and Gardiol, D. (2004). Differential expression of the human homologue of drosophila discs large oncosuppressor in histologic samples from human papillomavirus-associated lesions as a marker for progression to malignancy. *Int J Cancer* 111, 373-380.
- Cavatorta, A.L., Giri, A.A., Banks, L., and Gardiol, D. (2008). Cloning and functional analysis of the promoter region of the human Disc large gene. *Gene* 424, 87-95.
- Coureuil, M., Mikaty, G., Miller, F., Lecuyer, H., Bernard, C., Bourdoulous, S., Dumenil, G., Mege, R.M., Weksler, B.B., Romero, I.A., *et al.* (2009). Meningococcal type IV pili recruit the polarity complex to cross the brain endothelium. *Science* 325, 83-87.
- Cricca, M., Venturoli, S., Leo, E., Costa, S., Musiani, M., and Zerbini, M. (2009). Molecular analysis of HPV 16 E6I/E6II spliced mRNAs and correlation with the viral physical state and the grade of the cervical lesion. *Journal of medical virology* 81, 1276-1282.
- Cui, L., Xu, L.Y., Shen, Z.Y., Tao, Q., Gao, S.Y., Lv, Z., Du, Z.P., Fang, W.K., and Li, E.M. (2008). NGALR is overexpressed and regulated by hypomethylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 14, 7674-7681.
- Chen, C.L., Liu, S.S., Ip, S.M., Wong, L.C., Ng, T.Y., and Ngan, H.Y. (2003). E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours. *Eur J Cancer* 39, 517-523.
- Chen, H.L., and Chen, X.P. (2013). [Par polarity complex in mammalian neurogenesis]. *Yi chuan = Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji* 35, 281-286.
- Chen, X., and Macara, I.G. (2005). Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nature cell biology* 7, 262-269.
- Cheng, S., Schmidt-Grimminger, D.C., Murant, T., Broker, T.R., and Chow, L.T. (1995). Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev* 9, 2335-2349.
- Chow, L.T., Broker, T.R., and Steinberg, B.M. (2010). The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 118, 422-449.
- Christman, J.K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21, 5483-5495.
- Chung, S.H., and Lambert, P.F. (2009). Prevention and treatment of cervical cancer in mice using estrogen receptor antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19467-19472.
- Damaschke, N.A., Yang, B., Bhusari, S., Svaren, J.P., and Jarrard, D.F. (2013). Epigenetic susceptibility factors for prostate cancer with aging. *Prostate* 73, 1721-1730.
- Daniel, F.I., Cherubini, K., Yurgel, L.S., de Figueiredo, M.A., and Salum, F.G. (2011). The role of epigenetic transcription repression and DNA methyltransferases in cancer. *Cancer* 117, 677-687.

Darzynkiewicz, Z., Zhao, H., Zhang, S., Lee, M.Y., Lee, E.Y., and Zhang, Z. (2015). Initiation and termination of DNA replication during S phase in relation to cyclins D1, E and A, p21WAF1, Cdt1 and the p12 subunit of DNA polymerase delta revealed in individual cells by cytometry. *Oncotarget* 6, 11735-11750.

De Vuyst, H., Clifford, G.M., Nascimento, M.C., Madeleine, M.M., and Franceschi, S. (2009). Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer* 124, 1626-1636.

Deaton, A.M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25, 1010-1022.

Debnath, J., and Brugge, J.S. (2005). Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nature reviews. Cancer* 5, 675-688.

del Moral-Hernandez, O., Lopez-Urrutia, E., Bonilla-Moreno, R., Martinez-Salazar, M., Arechaga-Ocampo, E., Berumen, J., and Villegas-Sepulveda, N. (2010). The HPV-16 E7 oncoprotein is expressed mainly from the unspliced E6/E7 transcript in cervical carcinoma C33-A cells. *Arch Virol* 155, 1959-1970.

Delury, C.P., Marsh, E.K., James, C.D., Boon, S.S., Banks, L., Knight, G.L., and Roberts, S. (2013). The role of protein kinase A regulation of the E6 PDZ-binding domain during the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 18. *Journal of virology* 87, 9463-9472.

Derchain, S.F., Roteli-Martins, C.M., Syrjanen, K.J., de Abreu, H.J., Martinez, E.Z., and Alves, V.A. (1999). Association of oncogenic human papillomavirus DNA with high grade cervical intraepithelial neoplasia: the role of cigarette smoking. *Sexually transmitted infections* 75, 406-408.

Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science* 110, 525-541.

Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., and Murakami, I. (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology* 25 *Suppl 1*, 2-23.

Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I.G., Stoler, M., Broker, T.R., and Stanley, M.A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 *Suppl 5*, F55-70.

Dow, L.E., and Humbert, P.O. (2007). Polarity regulators and the control of epithelial architecture, cell migration, and tumorigenesis. *Int Rev Cytol* 262, 253-302.

Dubash, A.D., Guilluy, C., Srougi, M.C., Boulter, E., Burrige, K., and Garcia-Mata, R. (2011). The small GTPase RhoA localizes to the nucleus and is activated by Net1 and DNA damage signals. *PLoS One* 6, e17380.

Duensing, S., and Munger, K. (2003). Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins. *Progress in cell cycle research* 5, 383-391.

Duffy, C.L., Phillips, S.L., and Klingelhutz, A.J. (2003). Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. *Virology* 314, 196-205.

Dugay, F., Le Goff, X., Rioux-Leclercq, N., Chesnel, F., Jouan, F., Henry, C., Cabillic, F., Verhoest, G., Vigneau, C., Arlot-Bonnemains, Y., *et al.* (2014). Overexpression of the polarity

- protein PAR-3 in clear cell renal cell carcinoma is associated with poor prognosis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 134, 2051-2060.
- Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., and Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 3471-3480.
- Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2001). A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61, 3225-3229.
- Evan, G.I., and Vousden, K.H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-348.
- Facciuto, F., Bugnon Valdano, M., Marziali, F., Massimi, P., Banks, L., Cavatorta, A.L., and Gardiol, D. (2014). Human papillomavirus (HPV)-18 E6 oncoprotein interferes with the epithelial cell polarity Par3 protein. *Molecular oncology* 8, 533-543.
- Facciuto, F., Cavatorta, A.L., Valdano, M.B., Marziali, F., and Gardiol, D. (2012). Differential expression of PDZ domain-containing proteins in human diseases - challenging topics and novel issues. *The FEBS journal* 279, 3538-3548.
- Fang, L., Meyers, C., Budgeon, L.R., and Howett, M.K. (2006). Induction of productive human papillomavirus type 11 life cycle in epithelial cells grown in organotypic raft cultures. *Virology* 347, 28-35.
- Fang, L., Wang, Y., Du, D., Yang, G., Tak Kwok, T., Kai Kong, S., Chen, B., Chen, D.J., and Chen, Z. (2007). Cell polarity protein Par3 complexes with DNA-PK via Ku70 and regulates DNA double-strand break repair. *Cell research* 17, 100-116.
- Fanning, A.S., and Anderson, J.M. (1999). PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest* 103, 767-772.
- Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., and Moore, P.S. (2008). Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319, 1096-1100.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-386.
- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews. Cancer* 3, 453-458.
- Filippova, M., Filippov, V., Williams, V.M., Zhang, K., Kokoza, A., Bashkurova, S., and Duerksen-Hughes, P. (2014). Cellular levels of oxidative stress affect the response of cervical cancer cells to chemotherapeutic agents. *BioMed research international* 2014, 574659.
- Filippova, M., Filippov, V.A., Kagoda, M., Garnett, T., Fodor, N., and Duerksen-Hughes, P.J. (2009). Complexes of human papillomavirus type 16 E6 proteins form pseudo-death-inducing signaling complex structures during tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *J Virol* 83, 210-227.
- Filippova, M., Johnson, M.M., Bautista, M., Filippov, V., Fodor, N., Tungteakkhun, S.S., Williams, K., and Duerksen-Hughes, P.J. (2007). The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity. *J Virol* 81, 4116-4129.

- Flores, E.R., Allen-Hoffmann, B.L., Lee, D., and Lambert, P.F. (2000). The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *Journal of virology* 74, 6622-6631.
- Freije, A., Ceballos, L., Coisy, M., Barnes, L., Rosa, M., De Diego, E., Blanchard, J.M., and Gandarillas, A. (2012). Cyclin E drives human keratinocyte growth into differentiation. *Oncogene* 31, 5180-5192.
- Frese, K.K., Latorre, I.J., Chung, S.H., Caruana, G., Bernstein, A., Jones, S.N., Donehower, L.A., Justice, M.J., Garner, C.C., and Javier, R.T. (2006). Oncogenic function for the Dlg1 mammalian homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor. *The EMBO journal* 25, 1406-1417.
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., and Paul, C.L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1827-1831.
- Fuchs, E. (2007). Scratching the surface of skin development. *Nature* 445, 834-842.
- Fuja, T.J., Lin, F., Osann, K.E., and Bryant, P.J. (2004). Somatic mutations and altered expression of the candidate tumor suppressors CSNK1 epsilon, DLG1, and EDD/hHYD in mammary ductal carcinoma. *Cancer Res* 64, 942-951.
- Funk, J.O., Waga, S., Harry, J.B., Espling, E., Stillman, B., and Galloway, D.A. (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* 11, 2090-2100.
- Galloway, D.A., and Laimins, L.A. (2015). Human papillomaviruses: shared and distinct pathways for pathogenesis. *Current opinion in virology* 14, 87-92.
- Gao, L., Macara, I.G., and Joberty, G. (2002). Multiple splice variants of Par3 and of a novel related gene, Par3L, produce proteins with different binding properties. *Gene* 294, 99-107.
- Garcia-Mata, R., Dubash, A.D., Sharek, L., Carr, H.S., Frost, J.A., and BurrIDGE, K. (2007). The nuclear RhoA exchange factor Net1 interacts with proteins of the Dlg family, affects their localization, and influences their tumor suppressor activity. *Molecular and cellular biology* 27, 8683-8697.
- Gardiol, D., Galizzi, S., and Banks, L. (2002). Mutational analysis of the discs large tumour suppressor identifies domains responsible for human papillomavirus type 18 E6-mediated degradation. *J Gen Virol* 83, 283-289.
- Gardiol, D., Kuhne, C., Glaunsinger, B., Lee, S.S., Javier, R., and Banks, L. (1999). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 18, 5487-5496.
- Gardiol, D., Zacchi, A., Petretera, F., Stanta, G., and Banks, L. (2006). Human discs large and scrib are localized at the same regions in colon mucosa and changes in their expression patterns are correlated with loss of tissue architecture during malignant progression. *Int J Cancer* 119, 1285-1290.
- Gheit, T., Abedi-Ardekani, B., Carreira, C., Missad, C.G., Tommasino, M., and Torrente, M.C. (2014). Comprehensive analysis of HPV expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Journal of medical virology* 86, 642-646.

- Ghittoni, R., Accardi, R., Hasan, U., Gheit, T., Sylla, B., and Tommasino, M. (2010). The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* 40, 1-13.
- Gillespie, K.A., Mehta, K.P., Laimins, L.A., and Moody, C.A. (2012). Human papillomaviruses recruit cellular DNA repair and homologous recombination factors to viral replication centers. *J Virol* 86, 9520-9526.
- Goldstein, B., and Macara, I.G. (2007). The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Developmental cell* 13, 609-622.
- Goode, S., and Perrimon, N. (1997). Inhibition of patterned cell shape change and cell invasion by Discs large during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev* 11, 2532-2544.
- Guess, J.C., and McCance, D.J. (2005). Decreased migration of Langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E6/E7 is related to reduced macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  production. *J Virol* 79, 14852-14862.
- Gyongyosi, E., Szalmas, A., Ferenczi, A., Konya, J., Gergely, L., and Veress, G. (2012). Effects of human papillomavirus (HPV) type 16 oncoproteins on the expression of involucrin in human keratinocytes. *Virology journal* 9, 36.
- Hafner, N., Driesch, C., Gajda, M., Jansen, L., Kirchmayr, R., Runnebaum, I.B., and Durst, M. (2008). Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. *Oncogene* 27, 1610-1617.
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K.H., Hubbert, N.L., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *The EMBO journal* 8, 3905-3910.
- Hebner, C.M., and Laimins, L.A. (2006). Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in medical virology* 16, 83-97.
- Heer, A., Alonso, L.G., and de Prat-Gay, G. (2011). E6\*, the 50 amino acid product of the most abundant spliced transcript of the e6 oncoprotein in high-risk human papillomavirus, is a promiscuous folder and binder. *Biochemistry* 50, 1376-1383.
- Hellner, K., Mar, J., Fang, F., Quackenbush, J., and Munger, K. (2009). HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition. *Virology* 391, 57-63.
- Herman, J.G., Graff, J.R., Myohanen, S., Nelkin, B.D., and Baylin, S.B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9821-9826.
- Hernandez-Monge, J., Garay, E., Raya-Sandino, A., Vargas-Sierra, O., Diaz-Chavez, J., Popoca-Cuaya, M., Lambert, P.F., Gonzalez-Mariscal, L., and Gariglio, P. (2013). Papillomavirus E6 oncoprotein up-regulates occludin and ZO-2 expression in ovariectomized mice epidermis. *Experimental cell research* 319, 2588-2603.
- Hibner, U., and Gregoire, D. (2015). Viruses in cancer cell plasticity: the role of hepatitis C virus in hepatocellular carcinoma. *Contemporary oncology* 19, A62-67.

- Hirose, T., Izumi, Y., Nagashima, Y., Tamai-Nagai, Y., Kurihara, H., Sakai, T., Suzuki, Y., Yamanaka, T., Suzuki, A., Mizuno, K., *et al.* (2002). Involvement of ASIP/PAR-3 in the promotion of epithelial tight junction formation. *Journal of cell science* 115, 2485-2495.
- Hoffmann, M.J., and Schulz, W.A. (2005). Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem Cell Biol* 83, 296-321.
- Hong, A., Zhang, X., Jones, D., Zhang, M., Lee, C.S., Lyons, J.G., Veillard, A.S., and Rose, B. (2015). E6 viral protein ratio correlates with outcomes in human papillomavirus related oropharyngeal cancer. *Cancer biology & therapy*, 0.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., and Howley, P.M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *The EMBO journal* 10, 4129-4135.
- Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. (2012). Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 100, 1-441.
- Humbert, P., Russell, S., and Richardson, H. (2003). Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 25, 542-553.
- Humbert, P.O., Grzeschik, N.A., Brumby, A.M., Galea, R., Elsum, I., and Richardson, H.E. (2008). Control of tumorigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module. *Oncogene* 27, 6888-6907.
- Iden, S., van Riel, W.E., Schafer, R., Song, J.Y., Hirose, T., Ohno, S., and Collard, J.G. (2012). Tumor type-dependent function of the par3 polarity protein in skin tumorigenesis. *Cancer cell* 22, 389-403.
- Iizuka-Kogo, A., Ishidao, T., Akiyama, T., and Senda, T. (2007). Abnormal development of urogenital organs in Dlg1-deficient mice. *Development* 134, 1799-1807.
- Illingworth, R.S., Gruenewald-Schneider, U., Webb, S., Kerr, A.R., James, K.D., Turner, D.J., Smith, C., Harrison, D.J., Andrews, R., and Bird, A.P. (2010). Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS genetics* 6, e1001134.
- Inesta-Vaquera, F.A., Campbell, D.G., Arthur, J.S., and Cuenda, A. (2010). ERK5 pathway regulates the phosphorylation of tumour suppressor hDlg during mitosis. *Biochemical and biophysical research communications* 399, 84-90.
- Ishidate, T., Matsumine, A., Toyoshima, K., and Akiyama, T. (2000). The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase. *Oncogene* 19, 365-372.
- Jan, Y.J., Ko, B.S., Liu, T.A., Wu, Y.M., Liang, S.M., Chen, S.C., Wang, J., and Liou, J.Y. (2013). Expression of partitioning defective 3 (Par-3) for predicting extrahepatic metastasis and survival with hepatocellular carcinoma. *International journal of molecular sciences* 14, 1684-1697.
- Jones, P.A. (2002). DNA methylation and cancer. *Oncogene* 21, 5358-5360.
- Jung, S.P., Kim, S., Nam, S.J., Kim, I., and Bae, J.W. (2013). The role of the CDH1 promoter hypermethylation in the axillary lymph node metastasis and prognosis. *Journal of breast cancer* 16, 16-22.

- Kim, J., Kim, B.K., Lee, C.H., Seo, S.S., Park, S.Y., and Roh, J.W. (2012). Human papillomavirus genotypes and cofactors causing cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in Korean women. *Int J Gynecol Cancer* 22, 1570-1576.
- Kinoshita, T., Shirasawa, H., Shino, Y., Moriya, H., Desbarats, L., Eilers, M., and Simizu, B. (1997). Transactivation of prothymosin alpha and c-myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein. *Virology* 232, 53-61.
- Kosel, S., Burggraf, S., Engelhardt, W., and Olgemoller, B. (2007). Increased levels of HPV16 E6\*I transcripts in high-grade cervical cytology and histology (CIN II+) detected by rapid real-time RT-PCR amplification. *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology* 18, 290-299.
- Kravchenko-Balasha, N., Mizrachy-Schwartz, S., Klein, S., and Levitzki, A. (2009). Shift from apoptotic to necrotic cell death during human papillomavirus-induced transformation of keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* 284, 11717-11727.
- Krishna Subbaiah, V., Massimi, P., Boon, S.S., Myers, M.P., Sharek, L., Garcia-Mata, R., and Banks, L. (2012). The invasive capacity of HPV transformed cells requires the hDlg-dependent enhancement of SGEF/RhoG activity. *PLoS Pathog* 8, e1002543.
- Kubben, F.J., Peeters-Haesevoets, A., Engels, L.G., Baeten, C.G., Schutte, B., Arends, J.W., Stockbrugger, R.W., and Blijham, G.H. (1994). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation. *Gut* 35, 530-535.
- La Celle, P.T., and Polakowska, R.R. (2001). Human homeobox HOXA7 regulates keratinocyte transglutaminase type 1 and inhibits differentiation. *The Journal of biological chemistry* 276, 32844-32853.
- Lace, M.J., Anson, J.R., Klingelhutz, A.J., Lee, J.H., Bossler, A.D., Haugen, T.H., and Turek, L.P. (2009). Human papillomavirus (HPV) type 18 induces extended growth in primary human cervical, tonsillar, or foreskin keratinocytes more effectively than other high-risk mucosal HPVs. *Journal of virology* 83, 11784-11794.
- Laimins, L.A. (1998). Regulation of Transcription and Replication by Human Papillomaviruses. *Human Tumor Viruses*, 201-223. (Washington, D.C.: ASM press).
- Laird, P.W. (2010). Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nature reviews. Genetics* 11, 191-203.
- Laprise, P., Chailier, P., Houde, M., Beaulieu, J.F., Boucher, M.J., and Rivard, N. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 277, 8226-8234.
- Lardizabal, M.N., Nocito, A.L., Daniele, S.M., Ornella, L.A., Palatnik, J.F., and Veggi, L.M. (2012). Reference genes for real-time PCR quantification of microRNAs and messenger RNAs in rat models of hepatotoxicity. *PLoS One* 7, e36323.
- Lechner, M.S., and Laimins, L.A. (1994). Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 68, 4262-4273.
- Lee, H.J., and Zheng, J.J. (2010). PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun Signal* 8, 8.

- Lee, M.Y., Chou, C.Y., Tang, M.J., and Shen, M.R. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation. *Clin Cancer Res* 14, 4743-4750.
- Lee, S.S., Glaunsinger, B., Mantovani, F., Banks, L., and Javier, R.T. (2000). Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J Virol* 74, 9680-9693.
- Lelievre, S.A. (2010). Tissue polarity-dependent control of mammary epithelial homeostasis and cancer development: an epigenetic perspective. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 15, 49-63.
- Li, J.Q., Li, Y., Shi, Y.J., and Wu, S.L. (2004). [Re-expression of p16 gene in myeloma cell line U266 by arsenic trioxide]. *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer* 23, 626-630.
- Liu, L.X., Liu, Z.H., Jiang, H.C., Qu, X., Zhang, W.H., Wu, L.F., Zhu, A.L., Wang, X.Q., and Wu, M. (2002). Profiling of differentially expressed genes in human gastric carcinoma by cDNA expression array. *World journal of gastroenterology* 8, 580-585.
- Liu, X., Dakic, A., Zhang, Y., Dai, Y., Chen, R., and Schlegel, R. (2009). HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18780-18785.
- Lopez-Serra, P., and Esteller, M. (2012). DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene* 31, 1609-1622.
- Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2006). Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* 116, 1167-1173.
- Lue, R.A., Marfatia, S.M., Branton, D., and Chishti, A.H. (1994). Cloning and characterization of hdlg: the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to protein 4.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9818-9822.
- Macara, I.G. (2004). Par proteins: partners in polarization. *Current biology : CB* 14, R160-162.
- Mantovani, F., and Banks, L. (1999). Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical tumour derived cell lines. *Oncogene* 18, 3309-3315.
- Mantovani, F., Massimi, P., and Banks, L. (2001). Proteasome-mediated regulation of the hDlg tumour suppressor protein. *Journal of cell science* 114, 4285-4292.
- Markowitz, D., Goff, S., and Bank, A. (1988). Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 167, 400-406.
- Martin, D., and Gutkind, J.S. (2008). Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene* 27 Suppl 2, S31-42.
- Marziali, F., Cavatorta, A.L., Valdano, M.B., Facciuto, F., and Gardiol, D. (2015). Transcriptional and translational mechanisms contribute to regulate the expression of Discs Large 1 protein during different biological processes. *Biological chemistry* 396, 893-902.
- Massimi, P., Gammoh, N., Thomas, M., and Banks, L. (2004). HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 23, 8033-8039.
- Massimi, P., Gardiol, D., Roberts, S., and Banks, L. (2003). Redistribution of the discs large tumor suppressor protein during mitosis. *Experimental cell research* 290, 265-274.

- Massimi, P., Narayan, N., Cuenda, A., and Banks, L. (2006). Phosphorylation of the discs large tumour suppressor protein controls its membrane localisation and enhances its susceptibility to HPV E6-induced degradation. *Oncogene* 25, 4276-4285.
- McCaffrey, L.M., and Macara, I.G. (2009). Widely conserved signaling pathways in the establishment of cell polarity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a001370.
- McCaffrey, L.M., Montalbano, J., Mihai, C., and Macara, I.G. (2012). Loss of the Par3 polarity protein promotes breast tumorigenesis and metastasis. *Cancer cell* 22, 601-614.
- McCord, C., Xu, J., Xu, W., Qiu, X., Muhanna, N., Irish, J., Leong, I., McComb, R.J., Perez-Ordenez, B., and Bradley, G. (2014). Association of human papilloma virus with atypical and malignant oral papillary lesions. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 117, 722-732.
- McKinney, C.C., Hussmann, K.L., and McBride, A.A. (2015). The Role of the DNA Damage Response throughout the Papillomavirus Life Cycle. *Viruses* 7, 2450-2469.
- McLaughlin-Drubin, M.E., Crum, C.P., and Munger, K. (2011). Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2130-2135.
- McLaughlin-Drubin, M.E., and Munger, K. (2008). Viruses associated with human cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1782, 127-150.
- McLaughlin, M., Hale, R., Ellston, D., Gaudet, S., Lue, R.A., and Viel, A. (2002). The distribution and function of alternatively spliced insertions in hDlg. *The Journal of biological chemistry* 277, 6406-6412.
- Mehanna, H., Beech, T., Nicholson, T., El-Hariry, I., McConkey, C., Paleri, V., and Roberts, S. (2013). Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head & neck* 35, 747-755.
- Meijide, H., Mena, A., Pernas, B., Castro, A., Lopez, S., Vazquez, P., Bello, L., Balinas, J., Rodriguez-Martinez, G., and Pedreira, J.D. (2013). [Malignancies in HIV-infected patients: descriptive study of 129 cases between 1993 and 2010]. *Revista chilena de infectologia : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia* 30, 156-161.
- Meyers, C., and Laimins, L.A. (1994). In vitro systems for the study and propagation of human papillomaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 186, 199-215.
- Meyers, C., Mayer, T.J., and Ozbun, M.A. (1997). Synthesis of infectious human papillomavirus type 18 in differentiating epithelium transfected with viral DNA. *J Virol* 71, 7381-7386.
- Milutin Gasperov, N., Sabol, I., Planinic, P., Grubisic, G., Fistoncic, I., Corusic, A., and Grce, M. (2015). Methylated Host Cell Gene Promoters and Human Papillomavirus Type 16 and 18 Predicting Cervical Lesions and Cancer. *PLoS One* 10, e0129452.
- Mishima, A., Suzuki, A., Enaka, M., Hirose, T., Mizuno, K., Ohnishi, T., Mohri, H., Ishigatsubo, Y., and Ohno, S. (2002). Over-expression of PAR-3 suppresses contact-mediated inhibition of cell migration in MDCK cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 7, 581-596.

- Mistry, N., Wibom, C., and Evander, M. (2008). Cutaneous and mucosal human papillomaviruses differ in net surface charge, potential impact on tropism. *Virology journal* 5, 118.
- Mlodzik, M. (2002). Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate *Drosophila* tissue polarity and vertebrate gastrulation? *Trends Genet* 18, 564-571.
- Mueller, N. (1995). Overview: viral agents and cancer. *Environmental health perspectives* 103 Suppl 8, 259-261.
- Munger, K., Basile, J.R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S.L., Grace, M., and Zacny, V.L. (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20, 7888-7898.
- Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., Meijer, C.J., and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study, G. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine* 348, 518-527.
- Nakagawa, S., and Huibregtse, J.M. (2000). Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Molecular and cellular biology* 20, 8244-8253.
- Narayan, N., Massimi, P., and Banks, L. (2009a). CDK phosphorylation of the discs large tumour suppressor controls its localisation and stability. *Journal of cell science* 122, 65-74.
- Narayan, N., Subbaiah, V.K., and Banks, L. (2009b). The high-risk HPV E6 oncoprotein preferentially targets phosphorylated nuclear forms of hDlg. *Virology* 387, 1-4.
- Nead, M., and McCance, D. (1998). Activities of the Transforming Proteins of Human Papillomaviruses. *Human Tumor Viruses* (ASM Press, Washington, DC.).
- Nead, M.A.M. (1998). Activities of the Transforming Proteins of Human Papillomaviruses. *Human Tumor Viruses*, 225-251. (Washington, D. C.: ASM press).
- Ng, J.M., and Yu, J. (2015). Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes as potential biomarkers in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences* 16, 2472-2496.
- Nguyen, D.X., Westbrook, T.F., and McCance, D.J. (2002). Human papillomavirus type 16 E7 maintains elevated levels of the cdc25A tyrosine phosphatase during deregulation of cell cycle arrest. *J Virol* 76, 619-632.
- Nourry, C., Grant, S.G., and Borg, J.P. (2003). PDZ domain proteins: plug and play! *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2003, RE7.
- Oakeley, E.J. (1999). DNA methylation analysis: a review of current methodologies. *Pharmacol Ther* 84, 389-400.
- Ogino, S., Galon, J., Fuchs, C.S., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunology--analysis of host and tumor factors for personalized medicine. *Nature reviews. Clinical oncology* 8, 711-719.
- Oh, S.T., Kyo, S., and Laimins, L.A. (2001). Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *Journal of virology* 75, 5559-5566.
- Oliva, C., Escobedo, P., Astorga, C., Molina, C., and Sierralta, J. (2012). Role of the MAGUK protein family in synapse formation and function. *Developmental neurobiology* 72, 57-72.

- Ozgun, M.A., and Patterson, N.A. (2014). Using organotypic (raft) epithelial tissue cultures for the biosynthesis and isolation of infectious human papillomaviruses. *Current protocols in microbiology* 34, 14B 13 11-14B 13 18.
- Paredes, J., Albergaria, A., Oliveira, J.T., Jeronimo, C., Milanezi, F., and Schmitt, F.C. (2005). P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 5869-5877.
- Park, G.H., Lee, S.J., Yim, H., Han, J.H., Kim, H.J., Sohn, Y.B., Ko, J.M., and Jeong, S.Y. (2014). TAGLN expression is upregulated in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors by hypomethylation in its promoter and subpromoter regions. *Oncol Rep.*
- Parkin, D.M., Almonte, M., Bruni, L., Clifford, G., Curado, M.P., and Pineros, M. (2008). Burden and trends of type-specific human papillomavirus infections and related diseases in the latin america and Caribbean region. *Vaccine* 26 Suppl 11, L1-15.
- Pei, X.F., Sherman, L., Sun, Y.H., and Schlegel, R. (1998). HPV-16 E7 protein bypasses keratinocyte growth inhibition by serum and calcium. *Carcinogenesis* 19, 1481-1486.
- Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature reviews. Cancer* 7, 415-428.
- Peinado, H., Portillo, F., and Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 48, 365-375.
- Perez-Moreno, M., and Fuchs, E. (2006). Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell* 11, 601-612.
- Pett, M.R., Alazawi, W.O., Roberts, I., Downen, S., Smith, D.I., Stanley, M.A., and Coleman, N. (2004). Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Res* 64, 1359-1368.
- Pieczynski, J., and Margolis, B. (2011). Protein complexes that control renal epithelial polarity. *Am J Physiol Renal Physiol* 300, F589-601.
- Pils, S., and Joura, E.A. (2015). From the monovalent to the nine-valent HPV vaccine. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21, 827-833.
- Pim, D., and Banks, L. (1999). HPV-18 E6\*I protein modulates the E6-directed degradation of p53 by binding to full-length HPV-18 E6. *Oncogene* 18, 7403-7408.
- Pim, D., and Banks, L. (2010). Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 118, 471-493.
- Pim, D., Bergant, M., Boon, S.S., Ganti, K., Kranjec, C., Massimi, P., Subbaiah, V.K., Thomas, M., Tomaic, V., and Banks, L. (2012). Human papillomaviruses and the specificity of PDZ domain targeting. *The FEBS journal* 279, 3530-3537.
- Pim, D., Tomaic, V., and Banks, L. (2009). The human papillomavirus (HPV) E6\* proteins from high-risk, mucosal HPVs can direct degradation of cellular proteins in the absence of full-length E6 protein. *J Virol* 83, 9863-9874.
- Pinheiro, C., Garcia, E.A., Morais-Santos, F., Scapulatempo-Neto, C., Mafra, A., Steenberg, R.D., Boccardo, E., Villa, L.L., Baltazar, F., and Longatto-Filho, A. (2014). Lactate transporters

and vascular factors in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *BMC Cancer* 14, 751.

Polette, M., Gilles, C., Nawrocki-Raby, B., Lohi, J., Hunziker, W., Foidart, J.M., and Birembaut, P. (2005). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression is regulated by zonula occludens-1 in human breast cancer cells. *Cancer Res* 65, 7691-7698.

Poznic, M. (2009). Retinoblastoma protein: a central processing unit. *Journal of biosciences* 34, 305-312.

Razin, A., and Cedar, H. (1991). DNA methylation and gene expression. *Microbiological reviews* 55, 451-458.

Reuver, S.M., and Garner, C.C. (1998). E-cadherin mediated cell adhesion recruits SAP97 into the cortical cytoskeleton. *Journal of cell science* 111 ( Pt 8), 1071-1080.

Rincon-Orozco, B., Halec, G., Rosenberger, S., Muschik, D., Nindl, I., Bachmann, A., Ritter, T.M., Dondog, B., Ly, R., Bosch, F.X., *et al.* (2009). Epigenetic silencing of interferon-kappa in human papillomavirus type 16-positive cells. *Cancer Res* 69, 8718-8725.

Roberts, S., Calautti, E., Vanderweil, S., Nguyen, H.O., Foley, A., Baden, H.P., and Viel, A. (2007). Changes in localization of human discs large (hDlg) during keratinocyte differentiation are [corrected] associated with expression of alternatively spliced hDlg variants. *Experimental cell research* 313, 2521-2530.

Roberts, S., Delury, C., and Marsh, E. (2012). The PDZ protein discs-large (DLG): the 'Jekyll and Hyde' of the epithelial polarity proteins. *The FEBS journal* 279, 3549-3558.

Rodenhiser, D.I. (2009). Epigenetic contributions to cancer metastasis. *Clinical & experimental metastasis* 26, 5-18.

Roman, A., and Munger, K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology* 445, 138-168.

Ronco, L.V., Karpova, A.Y., Vidal, M., and Howley, P.M. (1998). Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes & development* 12, 2061-2072.

Rosenberger, S., De-Castro Arce, J., Langbein, L., Steenbergen, R.D., and Rosl, F. (2010). Alternative splicing of human papillomavirus type-16 E6/E6\* early mRNA is coupled to EGF signaling via Erk1/2 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 7006-7011.

Rothenberg, S.M., Mohapatra, G., Rivera, M.N., Winokur, D., Greninger, P., Nitta, M., Sadow, P.M., Sooriyakumar, G., Brannigan, B.W., Ulman, M.J., *et al.* (2010). A genome-wide screen for microdeletions reveals disruption of polarity complex genes in diverse human cancers. *Cancer Res* 70, 2158-2164.

Sabio, G., Arthur, J.S., Kuma, Y., Peggie, M., Carr, J., Murray-Tait, V., Centeno, F., Goedert, M., Morrice, N.A., and Cuenda, A. (2005). p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. *The EMBO journal* 24, 1134-1145.

Saha, A., Kaul, R., Murakami, M., and Robertson, E.S. (2010). Tumor viruses and cancer biology: Modulating signaling pathways for therapeutic intervention. *Cancer Biol Ther* 10, 961-978.

Sambrook, J., Fritsch, E. E., Maniatis, R. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (NY: Cold Spring Harbor Laboratory).

- Santin, A.D., Zhan, F., Bignotti, E., Siegel, E.R., Cane, S., Bellone, S., Palmieri, M., Anfossi, S., Thomas, M., Burnett, A., *et al.* (2005). Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. *Virology* 331, 269-291.
- Schiffman, M., Clifford, G., and Buonaguro, F.M. (2009). Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infectious agents and cancer* 4, 8.
- Schiffman, M., and Kjaer, S.K. (2003). Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 14-19.
- Schneider-Gadicke, A., Kaul, S., Schwarz, E., Gausepohl, H., Frank, R., and Bastert, G. (1988). Identification of the human papillomavirus type 18 E6 and E6 proteins in nuclear protein fractions from human cervical carcinoma cells grown in the nude mouse or in vitro. *Cancer Res* 48, 2969-2974.
- Schneider-Gadicke, A., and Schwarz, E. (1986). Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J* 5, 2285-2292.
- Scholat, U. (1997). Permanent Gene Expression in Mammalian Cells: Gene transfer and selection. *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*, cap. 1.2, 33-52 (Berlín. NY.: H. Hauser and R. Wagner eds. Walter de Gruyter).
- Schutze, D.M., Snijders, P.J., Bosch, L., Kramer, D., Meijer, C.J., and Steenbergen, R.D. (2014). Differential in vitro immortalization capacity of eleven (probable) [corrected] high-risk human papillomavirus types. *J Virol* 88, 1714-1724.
- Schwartz, S. (2013). Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. *Virology* 445, 187-196.
- Seavey, S.E., Holubar, M., Saucedo, L.J., and Perry, M.E. (1999). The E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16 stabilizes p53 through a mechanism independent of p19(ARF). *J Virol* 73, 7590-7598.
- Sedman, S.A., Barbosa, M.S., Vass, W.C., Hubbert, N.L., Haas, J.A., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1991). The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* 65, 4860-4866.
- Senba, M., and Mori, N. (2012). Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. *Oncology reviews* 6, e17.
- Sfakianos, J., Togawa, A., Maday, S., Hull, M., Pypaert, M., Cantley, L., Toomre, D., and Mellman, I. (2007). Par3 functions in the biogenesis of the primary cilium in polarized epithelial cells. *The Journal of cell biology* 179, 1133-1140.
- Shah, K.V.H., P. M. (1996). Papillomavirinae: Papillomaviruses. *Fields Virology*, Third Edition, 2077-2109 (Philadelphia: Lippincott-Raven publishers.).

- Shamanin, V.A., Sekaric, P., and Androphy, E.J. (2008). hAda3 degradation by papillomavirus type 16 E6 correlates with abrogation of the p14ARF-p53 pathway and efficient immortalization of human mammary epithelial cells. *J Virol* 82, 3912-3920.
- Sharma, S., Kelly, T.K., and Jones, P.A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27-36.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.
- Smith, D.B., and Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- Snijders, P.J., van den Brule, A.J., and Meijer, C.J. (2003). The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol* 201, 1-6.
- Sotelo, N.S., Valiente, M., Gil, A., and Pulido, R. (2012). A functional network of the tumor suppressors APC, hDlg, and PTEN, that relies on recognition of specific PDZ-domains. *J Cell Biochem* 113, 2661-2670.
- Steenbergen, R.D., Parker, J.N., Isern, S., Snijders, P.J., Walboomers, J.M., Meijer, C.J., Broker, T.R., and Chow, L.T. (1998). Viral E6-E7 transcription in the basal layer of organotypic cultures without apparent p21cip1 protein precedes immortalization of human papillomavirus type 16- and 18-transfected human keratinocytes. *J Virol* 72, 749-757.
- Stoger, R., Kubicka, P., Liu, C.G., Kafri, T., Razin, A., Cedar, H., and Barlow, D.P. (1993). Maternal-specific methylation of the imprinted mouse *Igf2r* locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell* 73, 61-71.
- Storrs, C.H., and Silverstein, S.J. (2007). PATJ, a tight junction-associated PDZ protein, is a novel degradation target of high-risk human papillomavirus E6 and the alternatively spliced isoform 18 E6. *J Virol* 81, 4080-4090.
- Subbaiah, V.K., Narayan, N., Massimi, P., and Banks, L. (2012). Regulation of the DLG tumor suppressor by beta-catenin. *Int J Cancer* 131, 2223-2233.
- Syrjänen, S.M. (1999a). Molecular Biology of Papillomavirus. Papillomavirus Infections in Human Pathology. 11-51 (Department of Pathology, University of Siena, Italy. Department of Oral Pathology. University of Turku, Finland.).
- Syrjänen, S.M. (1999b). Pathogenesis of HPV infections. Papillomavirus Infections in Human Pathology. 52-88 (Department of Pathology, University of Siena, Italy. Department of Oral Pathology, University of Turku, Finland.).
- Syrjanen, S.M., and Syrjanen, K.J. (1999). New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med* 31, 175-187.
- Szalmas, A., and Konya, J. (2009). Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. *Seminars in cancer biology* 19, 144-152.
- Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kempfues, K.J., Miwa, J., and Ohno, S. (1998). Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 125, 3607-3614.

- Tang, S., Tao, M., McCoy, J.P., Jr., and Zheng, Z.M. (2006). The E7 oncoprotein is translated from spliced E6\*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. *Journal of virology* 80, 4249-4263.
- Thiery, J.P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 15, 740-746.
- Thomas, J.T., and Laimins, L.A. (1998). Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. *J Virol* 72, 1131-1137.
- Thomas, J.T., Oh, S.T., Terhune, S.S., and Laimins, L.A. (2001a). Cellular changes induced by low-risk human papillomavirus type 11 in keratinocytes that stably maintain viral episomes. *J Virol* 75, 7564-7571.
- Thomas, M., and Banks, L. (1999). Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *The Journal of general virology* 80 ( Pt 6), 1513-1517.
- Thomas, M., Glaunsinger, B., Pim, D., Javier, R., and Banks, L. (2001b). HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific protein recognition and degradation. *Oncogene* 20, 5431-5439.
- Thomas, M.C., and Chiang, C.M. (2005). E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independently of inducing p53 degradation. *Molecular cell* 17, 251-264.
- Tornesello, M.L., Buonaguro, L., Giorgi-Rossi, P., and Buonaguro, F.M. (2013). Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *BioMed research international* 2013, 519619.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Traweger, A., Wiggin, G., Taylor, L., Tate, S.A., Metalnikov, P., and Pawson, T. (2008). Protein phosphatase 1 regulates the phosphorylation state of the polarity scaffold Par-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10402-10407.
- Tungteakkhun, S.S., Filippova, M., Fodor, N., and Duerksen-Hughes, P.J. (2010). The full-length isoform of human papillomavirus 16 E6 and its splice variant E6\* bind to different sites on the procaspase 8 death effector domain. *J Virol* 84, 1453-1463.
- Vande Pol, S.B., and Klingelutz, A.J. (2013). Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* 445, 115-137.
- Villa, L.L. (2011). HPV prophylactic vaccination: The first years and what to expect from now. *Cancer Lett* 305, 106-112.
- Vinokurova, S., Wentzensen, N., Kraus, I., Klaes, R., Driesch, C., Melsheimer, P., Kisseljov, F., Durst, M., Schneider, A., and von Knebel Doeberitz, M. (2008). Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* 68, 307-313.
- von Knebel Doeberitz, M. (2002). New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 38, 2229-2242.

- Vousden, K.H. (1994). Interactions between papillomavirus proteins and tumor suppressor gene products. *Adv Cancer Res* 64, 1-24.
- Waalwijk, C., and Flavell, R.A. (1978). MspI, an isoschizomer of hpaII which cleaves both unmethylated and methylated hpaII sites. *Nucleic Acids Res* 5, 3231-3236.
- Walker, J., Bloss, J.D., Liao, S.Y., Berman, M., Bergen, S., and Wilczynski, S.P. (1989). Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 74, 781-785.
- Wan, F., Miao, X., Quraishi, I., Kennedy, V., Creek, K.E., and Pirisi, L. (2008). Gene expression changes during HPV-mediated carcinogenesis: a comparison between an in vitro cell model and cervical cancer. *Int J Cancer* 123, 32-40.
- Wang, J.L., Zheng, B.Y., Li, X.D., Angstrom, T., Lindstrom, M.S., and Wallin, K.L. (2004). Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 2407-2414.
- Wang, Q., and Margolis, B. (2007). Apical junctional complexes and cell polarity. *Kidney Int* 72, 1448-1458.
- Wang, S., He, F., and Wang, Y. (2015). Association between polymorphisms of the insulin-degrading enzyme gene and late-onset Alzheimer disease. *Journal of geriatric psychiatry and neurology* 28, 94-98.
- Wang, X., Meyers, C., Wang, H.K., Chow, L.T., and Zheng, Z.M. (2011). Construction of a full transcription map of human papillomavirus type 18 during productive viral infection. *J Virol* 85, 8080-8092.
- Wanichwatanadecha, P., Sirisrimangkorn, S., Kaewprag, J., and Ponglikitmongkol, M. (2012). Transactivation activity of human papillomavirus type 16 E6\*I on aldo-keto reductase genes enhances chemoresistance in cervical cancer cells. *The Journal of general virology* 93, 1081-1092.
- Watson, R.A., Rollason, T.P., Reynolds, G.M., Murray, P.G., Banks, L., and Roberts, S. (2002). Changes in expression of the human homologue of the Drosophila discs large tumour suppressor protein in high-grade premalignant cervical neoplasias. *Carcinogenesis* 23, 1791-1796.
- White, M.K., Pagano, J.S., and Khalili, K. (2014). Viruses and human cancers: a long road of discovery of molecular paradigms. *Clinical microbiology reviews* 27, 463-481.
- Wilson, J.L., Dollard, S.C., Chow, L.T., and Broker, T.R. (1992). Epithelial-specific gene expression during differentiation of stratified primary human keratinocyte cultures. *Cell Growth Differ* 3, 471-483.
- Williams, V.M., Filippova, M., Filippov, V., Payne, K.J., and Duerksen-Hughes, P. (2014). Human papillomavirus type 16 E6\* induces oxidative stress and DNA damage. *J Virol* 88, 6751-6761.
- Wojdacz, T.K., Hansen, L.L., and Dobrovic, A. (2008). A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies. *BMC research notes* 1, 54.

- Wong, Y.F., Cheung, T.H., Tsao, G.S., Lo, K.W., Yim, S.F., Wang, V.W., Heung, M.M., Chan, S.C., Chan, L.K., Ho, T.W., *et al.* (2006). Genome-wide gene expression profiling of cervical cancer in Hong Kong women by oligonucleotide microarray. *Int J Cancer* 118, 2461-2469.
- Wu, H., Feng, W., Chen, J., Chan, L.N., Huang, S., and Zhang, M. (2007). PDZ domains of Par-3 as potential phosphoinositide signaling integrators. *Mol Cell* 28, 886-898.
- Xue, B., Krishnamurthy, K., Allred, D.C., and Muthuswamy, S.K. (2013). Loss of Par3 promotes breast cancer metastasis by compromising cell-cell cohesion. *Nature cell biology* 15, 189-200.
- Yamada, K.M., and Cukierman, E. (2007). Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* 130, 601-610.
- Yang, Y.Q., Zhang, W., Zhang, B.F., Gao, H.J., and Zhang, Q.H. (2008). [Establishment of the pipeline for RNA quality assessment from the cells obtained by laser capture microdissection]. *Yi chuan = Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji* 30, 1521-1526.
- Yetimalar, H., Kasap, B., Cukurova, K., Yildiz, A., Keklik, A., and Soylu, F. (2012). Cofactors in human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Archives of gynecology and obstetrics* 285, 805-810.
- Zaidi, Z.a., Walton, S.a., Hussain, I.a., and Wahid, Z.a. (2015). *A manual of dermatology*, Second edition. edn.
- Zallen, J.A. (2007). Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell* 129, 1051-1063.
- Zehbe, I., Richard, C., DeCarlo, C.A., Shai, A., Lambert, P.F., Lichtig, H., Tommasino, M., and Sherman, L. (2009). Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology* 383, 69-77.
- Zen, K., Yasui, K., Gen, Y., Dohi, O., Wakabayashi, N., Mitsufuji, S., Itoh, Y., Zen, Y., Nakanuma, Y., Taniwaki, M., *et al.* (2009). Defective expression of polarity protein PAR-3 gene (PARD3) in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene* 28, 2910-2918.
- Zhang, B., Chen, W., and Roman, A. (2006). The E7 proteins of low- and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 437-442.
- Zhang, J., Rose, B.R., Thompson, C.H., Jarrett, C., Russell, P., Houghton, R.S., and Cossart, Y.E. (1995). Associations between oncogenic human papillomaviruses and local invasive patterns in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 57, 170-177.
- Zhang, K., Zhao, H., Ji, Z., Zhang, C., Zhou, P., Wang, L., Chen, Q., Wang, J., Zhang, P., Chen, Z., *et al.* (2015). Shp2 promotes metastasis of prostate cancer by attenuating the PAR3/PAR6/aPKC polarity protein complex and enhancing epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene*.
- Zhao, X.Q., Zhang, Y.F., Xia, Y.F., Zhou, Z.M., and Cao, Y.Q. (2015). Promoter demethylation of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 gene in drug-resistant colon cancer cells. *Oncology letters* 10, 1287-1292.
- Zheng, Z.M., and Baker, C.C. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 11, 2286-2302.
- zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288, F55-78.

zur Hausen, H. (1999). Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians* 111, 581-587.

zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2, 342-350.