



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

“Interacción de proteínas de adhesión celular con la proteína E6 derivada de Papilomavirus humanos de alto riesgo y su relación con la oncogénesis”

Presentada por Bioq. Florencia N. Facciuto

Rosario Argentina

2014

”Interacción de proteínas de adhesión celular con la proteína E6 derivada de Papilomavirus humanos de alto riesgo y su relación con la oncogénesis”

Florencia Natalia Facciuto

Bioquímica

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 Nacional 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 Abril 2009 y Abril de 2014, bajo la dirección de la Dra. Daniela Nora Gardiol.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todos los que se cruzaron en mi camino en estos 5 años de Tesis Doctoral, a los que me acompañaron en las distintas etapas y crecieron conmigo, Gracias!

En primera instancia agradezco a mi directora de Tesis Doctoral Daniela, por su generosidad, predisposición y por enseñarme tantas cosas. Por la pasión que le pones a los proyectos y por dejarme formar parte de ellos. Por abrirme las puertas, dejarme volar y confiar en mí, tengo más que palabras de agradecimiento. Porque cada vez que te necesité estabas ahí, más allá de las distancias. Por la oportunidad de hacer la Tesis Doctoral y permitirme hacer lo que me gusta con total libertad.

A la Universidad Pública y a CONICET por permitir que pueda seguir mis estudios y becarme, les voy a estar agradecida siempre.

A Miguel por acercarme al mundo Viroológico, enseñarme y ayudarme siempre; a Adriana por todos los momentos compartidos, por tu simpatía y los consejos. A los tres por compartir conmigo el color azul y amarillo (no podía no mencionarlo). A Ana Laura por enseñarme tantas cosas, por apoyarme y ayudarme siempre, te voy a estar siempre agradecida. A María Rosa por los momentos compartidos.

A Lawrence Banks por confiar en mí, guiarme en cada uno de los pasos y por su generosidad. Por los maravillosos momentos que viví en su Laboratorio.

A mis compañeros de Laboratorio, Marina por ser mi amiga, cómplice, compañera de aventuras, por absolutamente todos los momentos vividos. Porque siempre estás a pesar de la distancia. A Federico por tu amistad, por tratar de que sea ordenada, aunque sin mucho éxito; por ser incondicional y cómplice. Por los “para que te traje” y tantas frases que voy a recordar siempre. A los dos les agradezco por cruzarse en mi camino por hacerme las cosas más fáciles porque siendo bien diferentes nos complementamos y creo que lo hacemos bien. Por estar en las buenas y en las malas, y siempre sacarme una sonrisa, nunca voy a estar al horno con ustedes. Los voy a extrañar! Muchas gracias!

A Germán por enseñarme tantas cosas desde que ingrese a Virología, por los consejos, por los bailes “peligrosos” y por estar siempre. A Eli por perdonarme a pesar de la “Chanco protection”, por ser cómplice, por escucharme y contenerme; a Diego por los consejos, pocas palabras pero bien sabias. A Clau (Chanco) por todas las aventuras, por los momentos divertidos

y por la sonrisa cómplice de siempre. A Pablito por ayudarme siempre con todo, por los mates, los consejos, las risas y por cuidar a mi amiga. A todos muchas gracias!

A Lola por tu amistad y tu alegría, por escucharme y aconsejarme tantas veces y estar siempre predispuesta, por compartir con nosotros tu hermosa familia. Muchísimas gracias.

Al grupo plantas, por estar siempre en cada momento que las necesite. A Nadia por ser mi cómplice, por enseñarme tanto, por los consejos y por tu amistad. A Ale por ser tan buena, por los consejos y las aventuras. A Roxi por las palabras justas siempre, por los consejos. A Conejo por compartir con nosotros estos últimos años. A todos por los momentos compartidos, muchas gracias!!

A aquellos que pasaron por Virología y dejaron huella, Ramón, Amalia, Sergio, Belén y Andrés. A los vecinos de sala 9, Yiya, Ale y todos los que se cruzaron en mi camino, por la colaboración en todo momento, compañerismo y predisposición. Gracias.

Al grupo Virología Asistencial, Mica (gracias por la mano), Chivi, Guillermo, Matías y Ale.

A Rodrigo por la ayuda de siempre y la predisposición.

A Romina por ayudarme a cruzar fronteras y por tu apoyo. Thanks!

A mis compañeros Ideppianos, Sandra, Mariela, Gabriel, Meli y Maxi, por ayudarme siempre, aconsejarme y por los reemplazos cuando no estuve. Por apoyarme en todos mis proyectos. Muchas gracias!

A mis amigos Diego, Virginia, Agu y Cintia por los consejos y las palabras de apoyo.

A mis hermanos Pablo y Maira por ser incondicionales y confiar en mí. A mi mamá por ser un ejemplo todos los días, por los sacrificios que hiciste para que siempre tengamos todo y por dejarme ser libre y ayudarme en el camino. A mi papá por apoyarme en mis estudios. A mi familia por permitirme estudiar y desarrollarme profesionalmente, le voy a estar agradecida siempre. Muchas gracias.

A mi amor Damián, por ser incondicional, apoyarme siempre, por ser mi cable a tierra, aconsejarme, crecer juntos y contenerme siempre. Gracias!!!

A todos Ustedes muchísimas gracias porque me ayudaron y me permitieron aprender todos los días. Los voy a extrañar.

Parte de los resultados que se describen en el presente Tesis han sido publicados en las siguientes revistas y reuniones científicas:

Trabajos publicados

- **Facciuto, Florencia; Bugnon Valdano, Marina; Marziali, Federico; Massimi, Paola; Banks, Lawrence; Cavatorta, Ana Laura y Gardiol, Daniela (2014). "Human papillomavirus (VPH)-18 E6 oncoprotein interferes with the epithelial cell polarity PAR 3 protein". Molecular Oncology. pii: S1574-7891(14)00003-9.**
- **Facciuto, Florencia; Cavatorta, Ana Laura; Bugnon Valdano, Marina; Marziali, Federico y Gardiol, Daniela (2012) "Differential expression of PDZ-containing proteins in human diseases: challenging topics and novel issues". FEBS J; 279(19):3538-48.**

Participación en trabajos publicados en el grupo de investigación

- Cavatorta, Ana Laura; **Facciuto, Florencia**; Bugnon Valdano, Marina; Giri, Adriana; Banks, Lawrence y Gardiol Daniela (2011). "**Regulation of Translational Efficiency by Different Splice Variants of the DLG1 5'UTR**". FEBS J; 278(14):2596-608.

Presentaciones a reuniones científicas

- **Facciuto Florencia N** "Perturbation of the cell polarity regulator Par 3 by VPH E6". Eighteenth ICGEB Symposium, Trieste, Italia, 18-19 de Junio de 2013. Presentación Oral.
- **Facciuto Florencia N**; Bugnon Valdano Marina P.; Marziali Federico E.; Cavatorta Ana Laura; Banks Lawrence y 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.
- **Facciuto Florencia N**, Cavatorta Ana Laura, Bugnon Valdano Marina, Marziali Federico y Gardiol Daniela. "Las oncoproteínas E6 de Papilomavirus humanos interfieren con la función de componentes celulares que regulan la polaridad celular" XX Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM. Curitiba, Brasil, 3 al 5 de octubre 2012. Presentación Tipo Poster.
- Marziali Federico, Bugnon Valdano Marina, **Facciuto Florencia**, Cavatorta Ana Laura y Gardiol Daniela. "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 al 5 de Abril de 2012. Presentación Tipo Poster.

- **Facciuto Florencia**, Cavatorta Ana Laura, Bugnon Valdano Marina, Marziali Federico y Gardiol Daniela “The human papillomavirus E6 oncoproteins interfere with the function of cellular components involved in the regulation of cell polarity”.ESF EMBO Symposium “Cell polarity and membrane traffic” Pultusk, Polonia del 31 de marzo al 5 de abril 2012. Presentación Tipo Poster.
- Bugnon Valdano Marina, Cavatorta Ana Laura, Marziali Federico, **Facciuto Florencia**, Banks Lawrence, Gardiol Daniela. “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 a 29 de septiembre de 2011. Presentación Tipo Poster (109).
- **Facciuto Florencia**, Bugnon Valdano Marina, Cavatorta Ana Laura y Gardiol Daniela. “Las oncoproteínas E6 de Papilomavirus humanos interfieren con la función de componentes celulares involucrados en la regulación de la polaridad celular.” X Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires- Argentina, 26 al 29 de septiembre de 2011. Presentación Tipo Poster (110).
- **Facciuto Florencia**, Bugnon Valdano Marina, Cavatorta Ana Laura y Gardiol, Daniela. “The expression of Human Papillomavirus E6 oncoproteins induce changes in the cell distribution of Phosphoinositide lipids, important for cell polarity regulation” "DNA TUMOUR VIRUS MEETING Trieste 2011" Italia, 19 al 24 de Julio 2011. Presentación Tipo Poster.
- Cavatorta Ana Laura, Bugnon Valdano Marina, Marziali Federico, **Facciuto Florencia**, Banks Lawrence y Gardiol Daniela. “Different mechanisms contribute to regulate the expression of Disc Large 1 oncosuppressor, a target of high-risk VPH E6 proteins” "DNA TUMOUR VIRUS MEETING Trieste 2011" Italia, 19 al 24 de Julio 2011. Presentación Tipo Poster.
- Cavatorta Ana Laura, **Facciuto Florencia**, Bugnon Valdano Marina, Marziali Federico y Gardiol Daniela. “Estudio de los mecanismos que contribuyen a la regulación de la expresión del oncosupresor hDlg, blanco de la proteína E6 de VPH oncogénicos”. XXX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología (SAV), Asociación Argentina de Microbiología. Villa Giardino – Córdoba, Diciembre 8-10, 2010.
- **Facciuto Florencia**, Bugnon Valdano Marina, Cavatorta Ana Laura y Gardiol Daniela. “E6 proteins VPH oncogenic types delocalizes PIP2 lipids that regulates polarity” XLVI XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), 30 de Noviembre – 3 de Diciembre 2010, Puerto Madryn, Chubut. Publicado en Biocell 34 Presentación Tipo Poster (CB-P01).
- Bugnon Valdano Marina, **Facciuto Florencia**, Giri Adriana, Cavatorta Ana Laura y Gardiol Daniela. “Análisis de la regulación de proteínas de adhesión celular durante el proceso de carcinogénesis”. XII Congreso y XXX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de

Rosario (SBR). Rosario, Santa Fe, Diciembre 2-3 2010. Argentina. Presentación Tipo Poster.

- **Facciuto Florencia**, Bugnon Valdano Marina, Cavatorta Ana Laura y Gardiol Daniela. “Contribución de factores celulares y virales en la progresión de neoplasias asociadas a infecciones con Papilomavirus humanos” XXIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología (SAV), Asociación Argentina de Microbiología. Huerta Grande Córdoba, 10-12 Diciembre 2009. Presentación Oral.
- Bugnon Valdano Marina; **Facciuto Florencia**; Pancera Belén; Nocito Ana Lía; Giri Adriana; Cavatorta Ana Laura y Gardiol Daniela. “Análisis de la expresión y regulación de proteínas de adhesión celular durante los procesos de carcinogénesis asociados a infecciones por Papiloma virus humanos”. XI Congreso y XXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario-Santa Fe, 3-4 Diciembre 2009. Presentación Tipo Poster (P66).
- Cavatorta Ana Laura, **Facciuto Florencia**, Bugnon Valdano Marina, Giri Adriana, Banks Lawrence y Gardiol Daniela. “Different molecular mechanisms contribute to the regulation of Human Disc Large protein expression”.XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Tucumán, 10-13 Noviembre 2009. Publicado en Biocell 33-Supplement (ISSN 0327). Presentación tipo Poster (CB-P34).
- Bugnon Valdano Marina, **Facciuto Florencia**, Pancera Belén, Nocito Ana Lía, Cavatorta Ana Laura y Gardiol Daniela. “Análisis de la expresión y regulación de proteínas de adhesión celular durante los procesos de carcinogénesis asociados a infecciones por Papiloma virus humanos”. XVII Jornadas de Jóvenes Investigadores de AUGM. Universidad Nacional de Entre Ríos. Concordia-Entre Ríos, 27-29 Octubre 2009. Presentación oral y Tipo Poster (12VM-17). Publicado en el Libro de Resúmenes 2009 (p 319). Mención especial por el Proyecto de Investigación.

Abreviaturas y símbolos

<i>Abs</i>	<i>Absorbancia</i>
<i>ADN</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>ADNc</i>	<i>ADN copia</i>
<i>AmpR</i>	<i>Resistencia a Ampicilina</i>
<i>aPKC</i>	<i>Proteína quinasa C atípica</i>
<i>ARN</i>	<i>Ácido ribonucleico</i>
<i>ARNm</i>	<i>ARN mensajero</i>
<i>BSA</i>	<i>Albúmina sérica bovina</i>
<i>DAPI</i>	<i>4',6-diamidino-2-fenilindol</i>
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<i>dNTPs</i>	<i>Desoxiribonucleótidos</i>
<i>DO</i>	<i>Unidad de densidad óptica</i>
<i>E6AP</i>	<i>Proteína asociada a E6</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ácido etilendiamintetra-acético</i>
<i>EE.UU.</i>	<i>Estados Unidos</i>
<i>EGTA</i>	<i>ácido etilenglicoltetrácetico</i>
<i>g</i>	<i>Constante de gravedad</i>
<i>GFP</i>	<i>Proteína verde fluorescente</i>
<i>h/hs</i>	<i>Hora/s</i>
<i>HA</i>	<i>Epítotope de la hemaglutinina del virus de Influenza</i>
<i>HIV</i>	<i>Virus de la Inmunodeficiencia Humana</i>
<i>VPH</i>	<i>Papilomavirus humanos</i>
<i>HSIL</i>	<i>Lesiones Escamosas Intraepiteliales de alto grado</i>
<i>HSV8</i>	<i>Herpes humano tipo 8</i>
<i>HTLV 1</i>	<i>Virus linfotrópico de células T</i>
<i>IgG</i>	<i>Inmunoglobulina de tipo G</i>
<i>Kb</i>	<i>kilo bases</i>
<i>kDa</i>	<i>Kilo Dalton</i>
<i>LB</i>	<i>Luria Bertani</i>
<i>LCR</i>	<i>Región Larga de Control</i>
<i>LSIL</i>	<i>Lesiones Escamosas Intraepiteliales de bajo grado</i>
<i>Luci</i>	<i>Luciferasa</i>
<i>mA</i>	<i>Miliamperios</i>
<i>MAGUK</i>	<i>Proteínas asociadas a membranas, homólogas a Guanilato Kinasa</i>
<i>min</i>	<i>Minutos</i>
<i>mM</i>	<i>Milimolar</i>
<i>ng</i>	<i>Nanogramos</i>
<i>nm</i>	<i>Nanómetros</i>
<i>Nt</i>	<i>Nucleótidos</i>
<i>Ori</i>	<i>Origen de replicación</i>

<i>P/V</i>	<i>Peso en volumen</i>
<i>PAP</i>	<i>Papanicolaou</i>
<i>pb</i>	<i>Pares de bases</i>
<i>PBM</i>	<i>Motivo de unión a PDZ</i>
<i>PBS</i>	<i>Buffer salino de fosfatos</i>
<i>PCR</i>	<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>
<i>PH</i>	<i>Dominio pelkestrina</i>
<i>PIs</i>	<i>Fosfoinosítidos</i>
<i>PI(3,4)P2</i>	<i>Fosfatidilinositol (3,4) bifosfato</i>
<i>PI(3,4,5)P3</i>	<i>Fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato</i>
<i>PI(3,5)P2</i>	<i>Fosfatidilinositol(3,5) bifosfato</i>
<i>PI(4,5)P2</i>	<i>Fosfatidilinositol(4,5) bifosfato</i>
<i>PI3K</i>	<i>Fosfatidilinositol-3-quinasa</i>
<i>PLC</i>	<i>Fosfolipasa C</i>
<i>pM</i>	<i>Picomoles</i>
<i>pRb</i>	<i>Proteína de retinoblastoma</i>
<i>RVPH1</i>	<i>Papilomavirus de Rhesus macaco</i>
<i>rpm</i>	<i>Revoluciones por minuto</i>
<i>Seg</i>	<i>Segundo/s</i>
<i>SDS</i>	<i>Dodecil Sulfato de Sodio</i>
<i>SFB</i>	<i>Suero Fetal Bovino</i>
<i>SIL</i>	<i>Lesiones Escamosas Intraepiteliales</i>
<i>siRNA</i>	<i>ARN de interferencia</i>
<i>U</i>	<i>Unidad</i>
<i>UV</i>	<i>Ultravioleta</i>
<i>VEB</i>	<i>Virus de Epstein Baar</i>
<i>VHB</i>	<i>Virus de la Hepatitis B</i>
<i>VHC</i>	<i>Virus de la Hepatitis C</i>
<i>VLP</i>	<i>Partículas tipo virales</i>
<i>V/V</i>	<i>Volumen en volumen</i>
<i>WB</i>	<i>Western blot</i>

Lenguaje especial

<i>Apicobasal</i>	<i>Eje asimétrico de la membrana de las células epiteliales, definida por la membrana apical en contacto con el exterior o luz de un tubo, y la membrana basolateral (basal y lateral) que conecta las células epiteliales entre sí y a estas con la lámina basal subyacente.</i>
<i>INPUT</i>	<i>Cantidad inicial</i>
<i>MERGE</i>	<i>Fusión</i>
<i>MOCK</i>	<i>Prueba</i>
<i>Network</i>	<i>Red</i>
<i>Partner</i>	<i>Componentes asociados.</i>
<i>Pellet</i>	<i>Botón.</i>
<i>Pocket</i>	<i>Bolsillo.</i>
<i>Proteasomas</i>	<i>Complejos proteicos cuya principal función es degradar proteínas por proteólisis.</i>
<i>Pseudocolor</i>	<i>Color falso.</i>
<i>Splicing</i>	<i>Corte y empalme.</i>
<i>Tight</i>	<i>Ocluyente o firme.</i>
<i>Z stack</i>	<i>Cortes en distintos planos en el eje Z.</i>

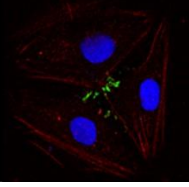
Índice

1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 Virus oncogénicos.	2
1.2 Cáncer cervical.	4
1.3 Virus Papiloma humano.	7
1.3.1 Organización y caracterización del genoma viral.	7
1.3.2 Ciclo de replicación viral y oncogénesis asociada a VPH de alto riesgo.	9
1.3.3 Proteínas oncogénicas E6 y E7 de VPH.	12
1.3.4 Funciones de la proteína E7 de VPH.	13
1.3.5 Funciones de la proteína E6 de VPH.	15
1.3.5.1 Blancos relacionados con la apoptosis y la estimulación de la actividad telomerasa.	15
1.3.5.2 Blancos relacionados con los procesos de control de la adherencia y polaridad celular.	17
1.4 Polaridad celular.	21
1.4.1 Polaridad <i>apicobasal</i> . Complejos proteicos implicados.	21
1.4.1.1 Complejo de polaridad celular PAR.	24
1.4.1.2 PAR 3.	26
1.4.1.3 Importancia del complejo PAR en procesos oncogénicos.	28
1.4.2 Importancia de los fosfoinosítidos en la polaridad celular.	30
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo general.	35
2.2. Objetivos específicos.	36
2.2.1. Análisis de la interferencia de E6 sobre las UT. Estudio del complejo de polaridad celular PAR.	36
2.2.2. Análisis de la interferencia de la proteína E6 sobre la polaridad celular.	36
3 MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1. Cepas bacterianas y vectores de expresión.	38
3.2 Líneas celulares.	39
3.3 Condiciones y medios de cultivo.	39
3.3.1 Medios de cultivo para células bacterianas.	39
3.3.2 Medio de crecimiento, mantenimiento y soluciones utilizadas para el cultivo de las líneas celulares animales.	40
3.3.3 Crecimiento celular.	40
3.4 Técnicas concernientes a la manipulación de ácidos nucleicos.	41
3.4.1 Aislamiento y purificación de ADN de vectores de expresión.	41
3.4.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.	41
3.4.3 Estimación de la concentración y calidad del ADN.	42
3.4.4 Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa.	42
3.4.5 Digestión de ADN con enzimas de restricción.	42
3.4.6 Ligado de moléculas de ADN.	42
3.4.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	43
3.4.8 Extracción de ARN a partir de células en cultivo y transcripción reversa seguida de PCR (RT-PCR).	44

3.5 Transformación de células de <i>E. coli</i>	45
3.5.1 Preparación de células a transformar.....	45
3.5.2 Transformación de células competentes con ADN derivado de vectores de expresión.	45
3.6 Transfección de células animales.	46
3.7 Generación y selección de clones celulares transfectados de manera estable.	47
3.8 Optimización de Cultivos celulares histotípicos.	47
3.9 Técnicas concernientes a proteínas.	48
3.9.1 Preparación de los extractos proteicos a partir de células en cultivo.	48
3.9.2 Ensayos de co-IP: Preparación de extractos proteicos y condiciones de IP.	48
3.9.3 Preparación de extractos proteicos para ensayos de fraccionamiento celular.	49
3.9.4 Cuantificación de proteínas.....	50
3.9.5 Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).	50
3.9.6 Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (WB) e inmunodetecciones.	50
3.9.7 Síntesis de proteínas y ensayos de degradación <i>in vitro</i>	52
3.10 Inmunofluorescencia (IF).....	52
3.11 Técnica de Cambio en la concentración de Calcio.....	53
3.12 Silenciamiento de la expresión de PAR 3, E6, E6AP, DLG1 y Scribble a través de técnicas que utilizan ARN de interferencia.	54
3.13 Ensayos de interacción lípidos-proteínas.	54
3.14 Secuenciación de ADN.....	55
3.15 Análisis estadístico.	55
3.16 Análisis digital de imágenes.....	56
4 RESULTADOS	57
CAPÍTULO 1 Análisis de la interferencia de la proteína E6 de VPH sobre el complejo de polaridad celular PAR	
4.1 Estudio de la localización subcelular de PAR 3 en células que expresan la proteína E6 derivada de VPH 18.	59
4.1.1 Clonado y expresión de las proteínas E6 derivadas de VPH.	59
4.1.2 Análisis de la expresión de PAR 3 en células epiteliales.	62
4.1.3 La expresión de E6 18 induce una alteración de la localización subcelular de PAR 3.	63
4.1.4 Importancia de la interacción E6-PDZ en los cambios de localización de PAR 3.....	68
4.1.5 Análisis de la interferencia de E6 de VPH sobre la expresión de la proteína PAR 3 utilizando la metodología de cultivos histotípicos.	70
4.1.5 A Optimización de Cultivos usando el Sistema Matrigel.....	70
4.1.5 B Efecto de la proteína E6 sobre la expresión de PAR 3 en cultivos histotípicos.....	75
4.1.6 Análisis de la interacción entre las proteínas PAR 3 y E6.....	77
4.1.7 Estudio de los niveles de expresión de la proteína PAR 3 en células que expresan E6 18.	79
4.1.8. Análisis de los niveles de PAR 3 en distintas fracciones celulares en presencia de E6 18.	83
4.2 Análisis de la interferencia de E616 sobre PAR 3.....	84
4.3 Análisis de la interferencia de E6 sobre otros componentes del complejo de polaridad PAR: aPKC y PAR 6.	88
CAPÍTULO 2 Análisis de la interferencia de la proteína E6 sobre la polaridad celular	
4.4 Análisis de la interferencia de E6 18 en la reconstitución de las UT.	93
4.5 Análisis de la distribución de PIs de membrana en células que expresan proteínas E6.	97

4.6 Análisis de la intercomunicación entre los distintos complejos de polaridad celular.....	103
5 DISCUSIÓN.....	108
6 CONCLUSIONES.....	125
7 RESUMEN	129
8 BIBLIOGRAFÍA.....	134

Introducción



1.1 Virus oncogénicos.

Aproximadamente el 15-20% de los procesos carcinogénicos están asociados a infecciones virales (Mueller, 1995). Los virus oncogénicos son capaces de inducir o contribuir a la aparición de tumores específicos, tanto en animales como en humanos. Los virus asociados al desarrollo de cáncer en humanos pertenecen a distintas familias, incluyendo virus con genoma a ARN (miembros de las familias *Retroviridae* y *Flaviviridae*), y virus con genoma a ADN (familias *Hepadnaviridae*, *Herpesviridae* y *Papillomaviridae*) (Martin and Gutkind, 2008) (Tabla I).

El primer virus oncogénico identificado en humanos fue el Virus de Epstein-Barr (VEB), descubierto a partir de células del linfoma de Burkitt en 1964 (Epstein et al., 1964). Con el paso de los años, se fueron estableciendo nuevas asociaciones de virus con el desarrollo de determinados carcinomas: el virus del Papiloma Humano (VPH), asociado con el desarrollo del cáncer cervical, anogenital y de cabeza y cuello, entre otros tumores; los virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC) relacionados con el carcinoma hepatocelular; el virus linfotrópico de células T (HTLV 1, del inglés *human T-lymphotropic virus type I*), asociado con la leucemia de células T en adultos; y el virus Herpes humano tipo 8 (HSV8, del inglés *Herpes simplex virus 8*), relacionado con el sarcoma de Kaposi (McLaughlin-Drubin and Munger, 2008). Más recientemente, ha sido descrito un poliomavirus humano, el virus Merkel, como agente asociado con el desarrollo de un tipo de cáncer de piel muy agresivo (Feng et al., 2008a). Cabe destacar que si bien el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV, del inglés *human immunodeficiency virus*) no es clasificado como un virus oncogénico *per se*, ha sido asociado con el desarrollo de neoplasias como el sarcoma de Kaposi y el linfoma no Hodgkin, cuyas ocurrencias se incrementan paralelamente con la progresión de la inmunodeficiencia celular (Meijide et al., 2013). Además de los virus mencionados, otros patógenos fueron identificados como agentes oncogénicos, entre los que se encuentran la bacteria *Helicobacter pylori*, asociada con el desarrollo de cáncer gástrico, y el parásito *Schistosoma haematobium*, agente relacionado con el desarrollo de cáncer de vejiga e hígado (zur Hausen, 2009).

Virus	Familia	Neoplasias asociadas	Referencias
Virus de la Hepatitis B (VHB)	<i>Hepadnaviridae</i>	Carcinoma hepatocelular.	(Kao and Chen, 2002; Ganem and Prince, 2004; Guidotti and Chisari, 2006)
Virus de la Hepatitis C (VHC)	<i>Flaviviridae</i>	Carcinoma hepatocelular.	(Colombo et al., 1989; Thomas et al., 2000)
Virus de Epstein–Barr (VEB)	<i>Herpesviridae</i>	Linfoma de Burkitt's, Linfoma de Hodgkin's, Linfoma post trasplante, Carcinoma nasofaríngeo.	(Arvanitakis et al., 1995; Mosialos et al., 1995; Brown et al., 2001)
Virus del Papiloma Humano (VPH)	<i>Papillomaviridae</i>	Carcinoma cervical, Carcinoma de ano y pene, carcinoma de cabeza y cuello.	(Beaudenon et al., 1986; Dyson et al., 1989; Scheffner et al., 1993)
Virus linfotrópico de células T (HTLV1)	<i>Retroviridae</i>	Leucemia a células T del adulto.	(Poesz et al., 1980; Matsuoka and Jeang, 2007)
Virus Herpes asociado al sarcoma de Kaposi (HSV8)	<i>Herpesviridae</i>	Sarcoma de Kaposi, Linfoma con efusión pleural, Enfermedad multicéntrica de Castleman.	(Chang et al., 1994; Cesarman et al., 1995; Arvanitakis et al., 1997; Bais et al., 1998; Montaner et al., 2003; Ganem, 2006)

Tabla I: Virus oncogénicos asociados con cáncer en humanos.

Aunque los virus oncogénicos humanos pertenecen a distintas familias, y utilizan diferentes mecanismos para favorecer el desarrollo del cáncer, comparten muchas características en común. Entre las que se encuentra la capacidad de provocar infecciones persistentes por largos periodos de tiempo (Mueller, 1995). Para lograr esto, han desarrollado estrategias para evadir la respuesta inmunitaria del hospedador, que de otra forma eliminaría la infección viral. Los virus con genoma a ADN como VPH, VEB, VHB o HSV8 tienen la capacidad de integrar su genoma en el del hospedero o de mantenerse como episomas y, de esta manera, persisten en la célula infectada (Martin and Gutkind, 2008).

El estudio de los mecanismos precisos del desarrollo oncogénico es sumamente dificultoso debido a que los procesos que ocurren en un organismo son muy lentos e inciertos, es por ello que los virus oncogénicos constituyen un excelente modelo para comprender la biología del cáncer. Así, los estudios realizados acerca de los virus oncogénicos han permitido el descubrimiento de oncogenes y genes supresores de tumores, importantes para el desarrollo y la supresión de procesos tumorales (McLaughlin-Drubin and Munger, 2008).

1.2 Cáncer cervical.

El cáncer de cuello uterino constituye un problema de salud para todas las mujeres del mundo y es el segundo cáncer más diagnosticado en mujeres en Argentina (<http://www.msal.gov.ar>). 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, cada año se diagnostican aproximadamente 4.000 casos de carcinoma cervical, y mueren aproximadamente 1.800 mujeres a causa de la enfermedad (<http://www.msal.gov.ar>).

El cáncer cervical es una de las neoplasias más comunes que afecta a la mujer, sobre todo en países en desarrollo, se trata por ello de una enfermedad prevalente en sectores socialmente vulnerables. Así, la incidencia y mortalidad por este tumor varía en las distintas regiones, en asociación con el acceso a los servicios de salud para su detección temprana y posterior tratamiento.

En los años 70, numerosos estudios epidemiológicos y moleculares proveyeron evidencias irrefutables que establecieron al VPH como el agente etiológico del cáncer de cuello uterino (zur Hausen, 1976). Sin embargo, más tarde se lo asoció además al desarrollo de otros tumores, entre ellos, de vulva, vagina, pene, ano y de cabeza y cuello (Lowy and Schiller, 2012). Esto permitió definir al VPH como un verdadero agente carcinogénico, capaz de contribuir al desarrollo de tumores en diversos sitios anatómicos tanto de la mujer como del hombre.

Los VPH se clasifican según el tipo de epitelio que infectan, en cutaneotrópicos y mucotrópicos. En el contexto del tejido epitelial cervical, los VPH mucosotrópicos se pueden dividir a su vez, según las manifestaciones clínicas que provocan sus infecciones, en dos grandes grupos: los de bajo riesgo y los de alto riesgo. Los primeros, asociados a lesiones intraepiteliales benignas y los últimos relacionados al desarrollo del cáncer cervical y a las lesiones precursoras (zur Hausen, 1999).

Las infecciones persistentes en el tiempo con uno o más tipos de VPH, aumentan el riesgo del desarrollo y progresión del cáncer cervical si no son controladas. El proceso comienza con la infección de las células de la capa basal del epitelio estratificado, siendo el desarrollo del cáncer cervical invasivo un proceso gradual, cuya primera manifestación consiste en la aparición de lesiones intraepiteliales en la mucosa de cuello uterino, denominadas displasias (Derchain et al., 1999; Syrjanen and Syrjanen, 1999; Doorbar et al., 2012).

La mayoría de las neoplasias de cuello de útero se desarrollan con preferencia a nivel de la unión entre las células columnares del endocérnix y el epitelio escamoso estratificado del ectocérnix, denominada zona de transición (Derchain et al., 1999).

Así, las principales etapas clínicas en la carcinogénesis cervical incluyen: infección por VPH, 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 anomalías del epitelio cervical estratificado. Sin embargo, este proceso es reversible y muchas infecciones por VPH cursan en sentido contrario, lo que conduce a la eliminación de manera espontánea de la infección por VPH 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*) (Derchain et al., 1999; Doorbar et al., 2012). En el carcinoma cervical de tipo invasor, las células anormales traspasan la membrana basal e invaden el tejido circundante, pudiendo eventualmente provocar metástasis (zur Hausen, 1996). Las diferentes lesiones se detallan en la Figura 1.1.

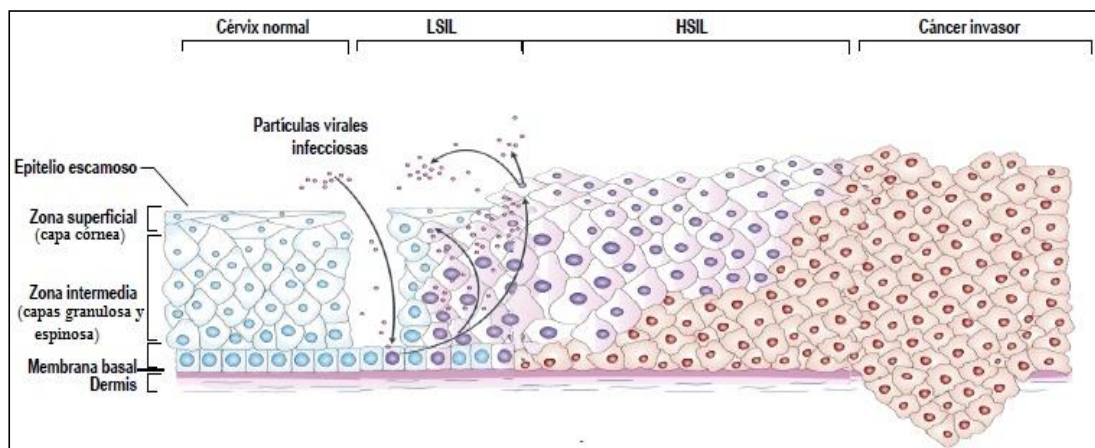


Figura 1.1: Ciclo de replicación del VPH en relación al programa de diferenciación de los queratinocitos y alteraciones cervicales asociadas a la infección por VPH. Representación esquemática de los precursores del cáncer cervical: LSIL y HSIL, y del carcinoma invasor. Las diferentes capas celulares del epitelio se indican a la izquierda del esquema. Las células normales se muestran con color celeste (correspondiente al tejido normal), en LSIL y HSIL las células normales son reemplazadas por células no diferenciadas de tipo basal (color violeta). En el carcinoma invasor las células anormales traspasan la membrana basal invadiendo el tejido circundante (color rosa). Figura adaptada de Woodman y col. (Woodman et al., 2007).

La neoplasia de alto grado representa una infección abortiva, en la cual se desregula la expresión génica viral y el virus no puede completar el ciclo normal. Por lo tanto, a nivel de displasias severas ya no hay producción de viriones. La mayoría de los cánceres cervicales tienen lugar, como se dijo, en la zona de transformación cervical; sugiriendo que en esta zona la infección viral no puede llevarse a cabo eficientemente. El cáncer se desarrolla en aquellas mujeres en las cuales falla la resolución de la infección y la expresión oncogénica se mantiene por años o décadas. En la mayoría de los casos, sin embargo, prevalece una respuesta inmune que lleva a la eliminación del virus, o a su mantenimiento en una forma latente o asintomática en las células basales (Doorbar et al., 2012). El intervalo de tiempo entre el inicio de la infección por VPH y el desarrollo del cáncer invasivo puede ser muy largo, incluso puede llevar décadas. Se ha demostrado que, además, son necesarios co-factores para la progresión de las lesiones intraepiteliales. 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; Yetimlar et al., 2012).

La prevención del cáncer cervical se basó en la realización periódica del test citológico *Papanicolaou* (Pap) en mujeres sexualmente activas, lo que ha sido muy útil en la disminución de su incidencia y mortalidad, sobre todo en países desarrollados; sin embargo, en los países latinoamericanos se han observado varias limitaciones (<http://www.msal.gov.ar>). Es importante destacar que actualmente el diagnóstico de infecciones por VPH se realiza mediante ensayos de biología molecular. Estos ensayos permiten la detección y tipificación de los genomas virales de VPH en muestras clínicas, y se basan en la detección del ADN del virus a través de distintas técnicas moleculares.

Recientemente, y con el objetivo de reducir la carga de enfermedad relacionada con el VPH se han desarrollado dos vacunas a partir de partículas similares al virus (VLPs, del inglés *Virus-Like Particles*). Una de ellas protege para 2 tipos virales de alto riesgo (VPH 16 y 18) y 2 de bajo riesgo (VPH 6 y 11) (vacuna GARDASIL de MERCK); mientras que la otra protege contra la infección por VPH 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 VPH (<http://www.msal.gov.ar>). Así, desde el año 2011 se ha incluido en el calendario nacional la vacuna bivalente para niñas de 11 años. Sin embargo, a partir del mes de enero de

2014, comenzó a utilizarse la cuadrivalente GARDASIL, de esta manera, se otorgan beneficios adicionales en la prevención de cáncer asociado VPH (<http://www.msal.gov.ar>).

Por otro lado, en un estudio realizado en mujeres vacunadas se observó protección cruzada contra infecciones por VPH 45 (94%) y VPH 31 (54%), tipos virales no incluidos en la vacuna, pero filogenéticamente relacionados con VPH 18 y 16, respectivamente (Bosch and Harper, 2006). Sin embargo, en ese mismo estudio la protección contra tipos menos relacionados filogenéticamente con VPH 16 y VPH 18, tales como VPH 33, VPH 52 y VPH 58, no fue significativa.

Estas vacunas no tienen acción terapéutica y por ello, las personas ya infectadas no 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 tamizaje citológicos que permiten la detección temprana de lesiones asociadas a VPH, y los métodos moleculares continúan siendo importantes para reducir la incidencia y mortalidad del cáncer de cuello de útero.

1.3 Virus Papiloma humano.

Los VPH son virus no envueltos con 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 descubierto más de 80 tipos virales, 100 de los cuales se encuentran bien caracterizados (<http://www.HPVcenter.se>). Los VPH que infectan epitelios de mucosas genitales son los más estudiados y caracterizados, constituyendo cerca de 40 tipos distintos (Munoz et al., 2003). Se han identificado numerosos tipos virales mucosotrópicos de alto riesgo asociados con el cáncer cervicouterino y con SIL; los más comunes son los VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58 y 59 (zur Hausen, 1996; Bzhalava et al., 2013). Los virus de bajo riesgo, como los VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, y 81, se asocian con el desarrollo de lesiones benignas, como el condiloma acuminado y con LSIL (Munoz et al., 2003; Bzhalava et al., 2013). Es importante destacar que en la mayoría de los casos, la infección por VPH es asintomática o subclínica (Cubie, 2013).

1.3.1 Organización y caracterización del genoma viral.

El genoma de VPH se organiza en dos grandes regiones: *i) Región Temprana o E* (E, por su sigla en inglés *Early*) que incluye los genes que codifican para las 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 *ii*) **Región Tardía o L** (L, por su sigla en 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 se utiliza como antígeno en la formulación actual de las vacunas, aunque es importante destacar que están en desarrollo vacunas constituidas por el antígeno L2 (Karanam et al., 2009; Jagu et al., 2013), o vacunas quimeras L1/L2 (McGrath et al., 2013). El genoma de VPH presenta además una región llamada región larga de control (LCR, por su sigla en inglés *Long Control Region*), sin función codificante y de 0,3-1 kb, que posee las señales de control de la transcripción y el origen de replicación viral (Syrjanen and Syrjanen, 1999; Bernard, 2013). Esta estructura genómica es compartida entre los distintos tipos de VPH, excepto en el caso del marco abierto de lectura de E5 que no está presente en algunos VPH de tipo cutaneotrópicos (Ghittoni et al., 2010).

En la Figura 1.2 se esquematiza el mapa genómico de los VPH, en este caso para VPH 16, y en la Tabla 2 se detallan las funciones de las proteínas codificadas y del LCR.

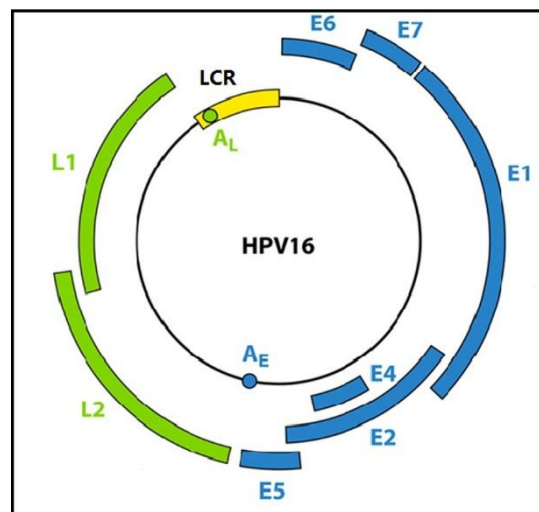


Figura 1.2: Mapa genómico de VPH. El análisis comparado de las secuencias genómicas de diferentes tipos virales ha permitido describir una organización genética común a todos ellos. Se detallan en azul los genes de la región E, en amarillo la región LCR y en verde los de la región L. A_E y A_L indican los sitios de poliadenilación [Poly(A)] tempranos y tardíos, respectivamente. Figura adaptada de Stanley 2012 (Stanley, 2012).

Marcos abiertos de lectura	Función proteica
E1	Replicación viral.
E2	Replicación, segregación de 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.
L1	Proteína estructural, componente mayoritario de la cápside.
L2	Proteína estructural, componente minoritario de la cápside.
Región no traducible	Funciones
LCR	Origen de replicación, sitio de unión de proteínas reguladoras y sitio de inicio de la transcripción.

Tabla 2: Funciones de las proteínas y de la región no traducible (LCR) de VPH.

1.3.2 Ciclo de replicación viral y oncogénesis asociada a VPH de alto riesgo.

Los epitelios escamosos son estructuras estratificadas en las cuales cada estrato está definido según la posición, morfología y grado de diferenciación de los queratinocitos que la conforman (señalados en la Figura 1.3 como capa basal, zona escamosa y zona superficial). Los VPH tienen como blanco de infección las células basales del epitelio estratificado, las cuales son las menos diferenciadas. El ciclo de replicación está estrechamente coordinado con el programa de diferenciación de las células epiteliales, por ello, la síntesis vegetativa del ADN viral y la maduración de los viriones se limita a los queratinocitos más diferenciados (Meyers and Laimins, 1994; Doorbar, 2005).

Las distintas etapas del ciclo viral de VPH se esquematizan en la Figura 1.3. La infección por VPH se inicia a través de microlesiones del epitelio que exponen las células basales y permiten el ingreso del virus a las mismas. Por medio de una combinación de factores celulares, que interactúan con sitios ubicados en LCR, se promueve la transcripción de los genes tempranos que permiten el establecimiento y el mantenimiento del genoma viral en el núcleo de las células como un episoma de bajo número de copias. Estos episomas replican de manera coordinada con los cromosomas de la célula hospedadora (Woodman et al., 2007; Moody and Laimins, 2010; Doorbar et al., 2012). La replicación viral vegetativa, que permite la amplificación génica del virus, la expresión de los genes tardíos y el ensamblado de los viriones, se produce en el núcleo de las células más diferenciadas que se encuentran en las capas más superficiales del epitelio. De esta forma, se mantiene de manera estable un reservorio de genomas de VPH en la

capa basal del epitelio que permite la generación continua de células hijas infectadas que facilitarán luego, la generación de la progenie viral.

La expresión de las proteínas E1, E2, E5, E6 y E7 (de la región E del genoma) tiene lugar en queratinocitos indiferenciados o pobremente diferenciados de las capas basal, suprabasal y espinosa del epitelio estratificado. En contraste, la replicación vegetativa del ADN viral, la expresión de las proteínas de la cápside, y el ensamblaje de los viriones ocurre exclusivamente en las capas espinosa superior y granular que son las más diferenciadas del epitelio (Doorbar, 2005). Por lo tanto, es imposible comprender totalmente los mecanismos moleculares asociados a la infección por VPH en un cultivo celular tradicional.

En este sentido, resulta importante destacar que los cultivos epiteliales organotípicos *raft* representan un abordaje novedoso para el estudio de virus como el VPH, dado que reproducen fielmente el proceso de diferenciación epitelial *in vitro*. Dichos cultivos pueden ser desarrollados a partir de queratinocitos 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. 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 presentan morfologías displásicas similares a las lesiones que se observan *in vivo* (Andrei, 2010).

Para replicarse, VPH depende de las polimerasas y otras proteínas celulares involucradas en la replicación del ADN celular que están presentes en la fase S (o de síntesis) del ciclo celular (Laimins, 1998). 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 las infecciones asociadas a VPH, induciéndose el pasaje a fase S fuera de programa. 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 proteína del retinoblastoma (pRb), respectivamente (Doorbar, 2005). Estos oncosupresores, p53 y pRb, participan activamente del control de la progresión del ciclo celular en el estadio G1/S.

Por último, la activación de la expresión de los genes tardíos de VPH, que permite la síntesis de las proteínas estructurales, se produce por la interacción de factores celulares presentes en la célula diferenciada con sitios de reconocimiento específicos localizados en LCR.

Es necesario enfatizar que los procesos de transformación e inmortalización celular asociados a VPH son acompañados por anomalías en el programa de diferenciación (Doorbar et al., 2012). Por lo tanto, teniendo en cuenta la dependencia entre el 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. La oncogénesis es, por ende, un efecto secundario que resulta en detrimento tanto para el virus como para el hospedador (Laimins LA 1998).

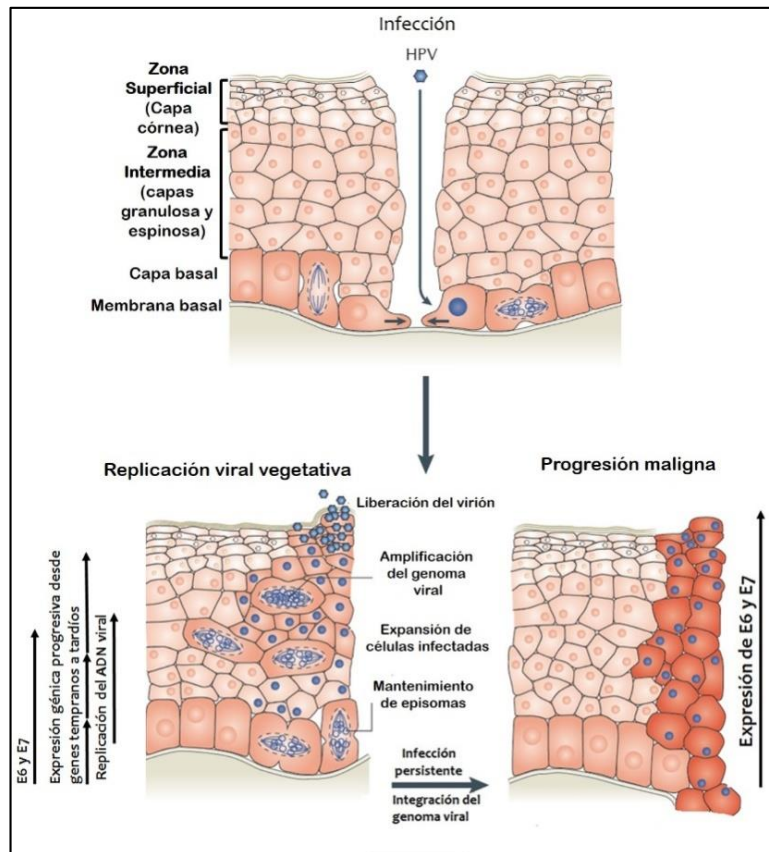


Figura 1.3: Ciclo de replicación del VPH en relación al programa de diferenciación de los queratinocitos.

Se esquematiza un corte transversal de epitelio escamoso magnificado en donde se evidencian los distintos estratos celulares y el ciclo de replicación de VPH. Después de la infección viral de los queratinocitos basales se inicia la expresión de los genes E1, E2, E5, E6 y E7 y el ADN viral se replica. En las capas más diferenciadas se producen la replicación vegetativa, la expresión de los genes tardíos (L1 y L2), el ensamblaje y liberación de los viriones. La infección persistente y la desregulación de la expresión los oncogenes E6 y E7 pueden conducir a la progresión maligna. Figura adaptada de Lawrence Banks y colaboradores (Banks et al., 2012).

Un aspecto importante que contribuye a la oncogénesis cervical es la integración del ADN viral al genoma celular, proceso observado frecuentemente para los VPH de alto riesgo (Figura 1.4). En este proceso se interrumpe el marco de lectura abierto E2 del genoma viral que conlleva a la sobre-expresión de los oncogenes E6 y E7 (Wentzensen et al., 2004; Pett and Coleman, 2007; Woodman et al., 2007). Esto último se produce como consecuencia de la

pérdida de la expresión de la proteína E2, la cual funciona como represor de la transcripción de dichos oncogenes. La expresión continua de las oncoproteínas virales E6 y E7 es requerida para mantener el estado transformado, que resulta de la interacción de estas proteínas con los supresores de tumores p53 y pRb, respectivamente, así como con otras proteínas claves para el control de la proliferación celular. Esto se evidencia en líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales donde la inhibición de la expresión de E6 y E7, induce la supresión de la proliferación celular descontrolada (Francis et al., 2000; Vinokurova et al., 2008).

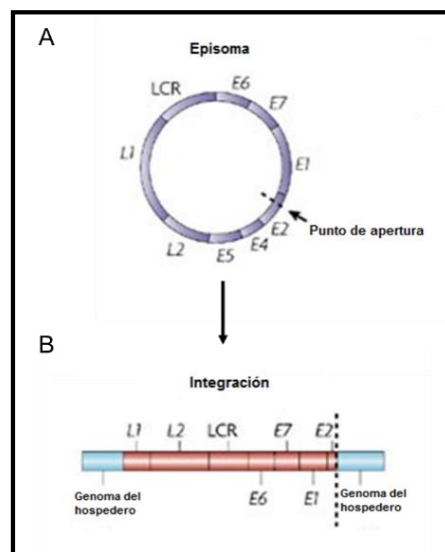


Figura 1.4: Estado físico de VPH-16. A) Forma episomal del genoma viral; B) Forma integrada del genoma viral en el genoma celular. Figura adaptada de Woodman y col. (Woodman et al., 2007).

1.3.3 Proteínas oncogénicas E6 y E7 de VPH.

El mecanismo de acción de los VPH de alto riesgo en el desarrollo de la neoplasia cervical, se explica principalmente por la acción de dos de sus oncoproteínas virales, E6 y E7, las cuales son continuamente expresadas en células derivadas de cáncer cervical. Dichas proteínas actúan cooperativamente durante el desarrollo carcinogénico, y la acción de un factor se complementa con el otro, de manera que la combinación de E6 y E7 es altamente eficiente en la inmortalización de líneas celulares primarias (Hawley-Nelson et al., 1989; Doorbar et al., 2012). Además, ha sido demostrado el desarrollo de carcinomas escamosos en ensayos llevados a cabo en ratones transgénicos expresando E6 y E7, y tratados con bajas dosis de estrógeno (Arbeit et al., 1996; Riley et al., 2003). En dicho modelo se ha comprobado que la expresión de E7 no es suficiente para inducir displasia de alto grado ni cáncer invasor. Sin embargo, cuando E7 se expresa en conjunto con E6, resulta en el desarrollo de tumores invasores, demostrándose

de esta manera, la acción cooperativa de E6 y E7 en la promoción de los procesos tumorales (Riley et al., 2003).

Por lo anteriormente expuesto, E6 y E7 tienen la capacidad de inmortalizar y transformar queratinocitos, confiriéndoles un alto grado de inestabilidad cromosómica a la célula infectada. La expresión continua de estos genes, es requisito indispensable para mantener el crecimiento neoplásico de las células del cérvix. Estudios del mecanismo molecular del proceso de transformación han revelado un complejo patrón de interacciones de estas proteínas virales con reguladores celulares, involucrados en distintos procesos biológicos como la apoptosis, la proliferación y diferenciación celular (von Knebel Doeberitz, 2002).

1.3.4 Funciones de la proteína E7 de VPH.

El gen E7, de aproximadamente 300 a 320 pb, codifica para una proteína de alrededor 100 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 10 kDa (Roman and Munger, 2013). E7 no posee actividad enzimática ni es capaz de unirse al ADN; sin embargo lleva a cabo sus funciones interaccionando con varios factores celulares fundamentales para el control del ciclo celular. Las interacciones mejor caracterizadas son con los supresores de tumores pRb, p107 y p130, los cuales pertenecen a la familia de proteínas *pocket* (del inglés bolsillo), cuyos miembros presentan un bolsillo para la unión funcional a otras proteínas (Cobrinik, 2005). E7, por lo tanto, inhibe la función de dichos reguladores celulares, y en consecuencia estimula la progresión del ciclo celular en células diferenciadas, permitiendo la replicación vegetativa del ADN de VPH necesaria para completar el ciclo viral.

El ciclo celular es regulado por complejos de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs 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 pRb, p107 y p130. pRb normalmente interacciona e inactiva a los factores de transcripción E2F, que inducen la expresión de genes de la fase S. En respuesta a mitógenos, los complejos ciclina D1-CDK4 y ciclina D1-CDK6 se activan y facilitan a su vez la fosforilación de pRb permitiendo la liberación de E2F y su activación, facilitándose así la entrada en fase S. El secuestro de pRb por parte de E7 conduce a la liberación de los factores de transcripción E2F, independientemente de la presencia de factores de crecimiento externos, promoviendo la entrada a fase S y la replicación celular (Munger et al., 2001)(Figura 1.5).

Las interacciones E7-proteínas *pocket* mencionadas anteriormente, inducen múltiples respuestas celulares, incluyendo la estabilización de p53. Dicha estabilización contrarrestaría la

replicación celular fuera de programa mediante la inducción de la apoptosis. Sin embargo, como se verá en más detalle posteriormente, la proteína E6 degrada a p53 y, por lo tanto, bloquea esta respuesta celular. La estrategia de replicación de VPH, en donde se inhiben conjuntamente pRb y p53, es compartida con otros virus oncogénicos con genoma a ADN, como SV40 y Adenovirus, aunque los mecanismos son diferentes (Nead M. A., 1998). La oncoproteína E7 no sólo forma complejos con los miembros de la familia de pRb, sino que también estimula su degradación por el mecanismo proteolítico dependiente de ubiquitina (Boyer et al., 1996; Jones et al., 1997). Es importante destacar que dicha degradación es suficiente para prevenir la asociación de pRb, p107 y p130 con miembros de la familia de E2F. E7, además, suprime otras funciones de pRb, como la reparación del ADN o el mantenimiento de la integridad genómica. La degradación de pRb y de otros miembros de la familia es exclusiva de las proteínas E7 derivadas de los VPH de alto riesgo ya que las correspondientes a VPH de bajo riesgo no conducen a su degradación (Pim and Banks, 2010).

E7 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 celular, y la inhibición de su función, mediada por E7, resulta en la progresión del ciclo celular. Las proteínas E7 derivadas de VPH de bajo riesgo son capaces de interactuar con p21, pero con baja eficiencia, por lo tanto, no estimulan eficientemente la progresión del ciclo celular.

E7 tiene la habilidad de unirse e inhibir la función de otros reguladores de la proliferación celular tales como histonas desacetilasas (Brehm et al., 1999) y factores transcripcionales de la familia AP1 (Antinore et al., 1996). También se ha comprobado que contribuye a 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 VPH. En la Figura 1.5 se detallan las acciones de E6 y E7 sobre algunos de los componentes que regulan el ciclo celular.

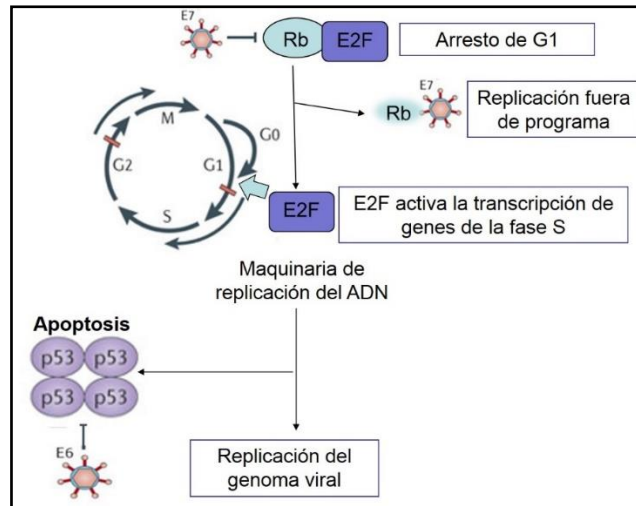


Figura 1.5: Efecto de E6 y E7 en la desregulación del ciclo celular. Las oncoproteínas E6 y E7 inhiben la función de los distintos reguladores celulares, y en consecuencia estimulan el ciclo celular en la célula diferenciada, inhibiendo a su vez la apoptosis mediada por p53. De esta forma, se produce la replicación vegetativa del ADN de VPH, pudiéndose completar el ciclo viral.

1.3.5 Funciones de la proteína E6 de VPH.

1.3.5.1 Blancos relacionados con la apoptosis y la estimulación de la actividad telomerasa.

Las proteínas E6 derivadas de VPH de bajo y alto riesgo poseen aproximadamente 150 aminoácidos y comparten varias funciones con las proteínas E1B de Adenovirus, antígeno T de SV40 y Tax de HTLV-1 (Javier and Rice, 2011). E6 contiene dos motivos dedos de Zinc en su estructura, esenciales para su actividad (Barbosa et al., 1989). Como se mencionó en la sección 1.3.4, una de las consecuencias de la degradación de pRb mediada por E7, es un incremento de los niveles del supresor de tumores p53 (Demers et al., 1994), el cual aumenta la susceptibilidad a apoptosis de aquellas células que expresan E7 (Jones et al., 1997). Para contrarrestar este efecto, E6 interfiere con la función de p53 a través de diversos mecanismos. E6 recluta a la proteína E3 ubiquitín ligasa asociada a E6 (E6AP, del inglés *E6-associated protein*) y a p53, formándose de esta manera un complejo tripartito que estimula la degradación de p53, a través del mecanismo proteolítico dependiente de ubiquitina (Huibregtse et al., 1991). Además de esta función, E6 puede unirse directamente al sitio de unión al ADN de p53, bloqueando así su actividad como factor de transcripción (Lechner and Laimins, 1994). Es importante mencionar que por el lado de los VPH de bajo riesgo, si bien la unión de E6 con E6AP ocurre, no resulta en la degradación de p53 (Li and Coffino, 1996).

Cabe destacar que E6 puede interactuar e interferir con la función de las acetiltransferasas p300 y CBP (del inglés *CREB binding protein*) cuyas funciones celulares consisten en estabilizar a p53. Dicha interacción resulta en la inhibición de la actividad de dichas enzimas, con la consecuente desestabilización del supresor de tumores (Patel et al., 1999; Zimmermann et al., 1999). Por otro lado, E6 interactúa con la histona acetiltransferasa ADA3 la cual puede, a su vez, afectar la actividad de p53 (Kumar et al., 2002).

A través de los mecanismos mencionados de interferencia de E6 con las funciones de p53, se consigue crear un ambiente celular propenso a la acumulación de mutaciones e inestabilidad genética que conlleva a la transformación celular y facilita la replicación del virus. Se ha visto que mutantes de E6 incapaces de degradar a p53, aún pueden inmortalizar células, por lo que la interacción con otros factores celulares contribuirían al desarrollo del cáncer (Kiyono et al., 1998; Liu et al., 1999). Por otro lado, E6 también puede interactuar con el receptor del factor de necrosis tumoral TNFR1 (Filippova et al., 2002), con la proteína con dominio de muerte asociado a Fas (FADD del inglés *Fas-Associated protein with Death Domain*)(Filippova et al., 2004), y con procaspasa 8 (Garnett et al., 2006), inhibiendo en todos los casos la función apoptótica. Asimismo, E6 puede interferir en la inducción de las vías de apoptosis mitocondriales intrínseca y extrínseca, a través de la interacción con miembros proapoptóticos de la familia Bcl2, BAX y BAK. Además, es capaz de activar la expresión del inhibidor de las proteínas de apoptosis, IAP2 (del inglés *inhibitor of apoptosis protein 2*) y de survivina (Garnett and Duerksen-Hughes, 2006). Estas actividades de E6 son necesarias para la proliferación celular en presencia de señales proapoptóticas, sin embargo, no está esclarecido hasta el momento si las proteínas E6 de bajo riesgo poseen alguna de estas funciones.

Se ha reportado que E6 es capaz de facilitar la persistencia y propagación viral interfiriendo con el sistema inmune, a través de su interacción con el factor regulador de interferón-3 (IRF-3, del inglés *interferon regulatory factor-3*). De esta manera impediría también la apoptosis inducida por interferón (Ronco et al., 1998).

Entre las interacciones de E6 ha sido descrita la unión a: la proteína de unión a E6, proteína de unión a calcio que se encuentra en el retículo endoplasmático; la proteína blanco de E6 1, E6TP1 (del inglés *E6-targeted protein 1*) una proteína activadora de GTPasas; y la proteína MCM7 (del inglés *minichromosome maintenance 7*) que regula la replicación celular (Howie et al., 2009). Sin embargo, no está claro aún si estas actividades son importantes en modelos *in vivo*.

Si bien en la Figura 1.6 se detallan las secuencias PBM pertenecientes a virus oncogénicos en humanos, es importante destacar que dicho motivo también se encuentra presente en la proteína E4 ORF de Adenovirus humano, el cual es capaz de producir transformación celular en modelos in vitro.

II) Dominios PDZ, blancos celulares de E6 de VPH de alto riesgo.

Los dominios PDZ son dominios proteicos que están muy conservados en la naturaleza, se encuentran presentes en proteínas involucradas en la transducción de señales y la polaridad celular, en bacterias, levaduras, plantas, insectos y vertebrados (Nourry et al., 2003). Son dominios modulares presentes en proteínas celulares, los cuales están compuestos por 80-90 aminoácidos que pueden interactuar con sitios específicos (PBM) localizados en secuencias carboxilo terminal de distintas proteínas (como es el caso del PBM localizado en E6 derivadas de VPH de alto riesgo). Sin embargo, se observó que los PDZ también puede interactuar con secuencias localizadas en regiones internas de las proteínas e incluso, con lípidos del tipo fosfoinosítidos (PIs del inglés *phosphoinositides*) (Ver sección 1.4.2).

La mayoría de las proteínas PDZ con las cuales interactúa E6 de VPH, pertenecen a miembros de la familia guanilato quinasas asociadas a membrana MAGUK (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) (Tabla 3). El primer blanco identificado de este tipo fue DLG1 (del inglés *Disc large1*), proteína que participa del control de la proliferación y polaridad celular. E6 interactúa directamente con los dominios PDZ1 y PDZ2 de DLG1 resultando en la estimulación de su degradación por el mecanismo dependiente de ubiquitina (Gardioli et al., 1999; Gardioli et al., 2002).

A posteriori, han sido reportados otros blancos de E6 con motivos PDZ. Entre ellos se encuentra la proteína Scribble, otra proteína que regula la polaridad celular (Nakagawa and Huibregtse, 2000). La interacción de Scribble con E6 promueve la degradación del blanco lo que disminuye la integridad de las uniones intercelulares (Nakagawa and Huibregtse, 2000). Es importante destacar que en biopsias derivadas de cáncer cervical, la expresión de ambos blancos, se encuentra disminuida y por lo tanto, la degradación mediada por E6 podría contribuir a la carcinogénesis asociada a VPH (Watson et al., 2002; Cavatorta et al., 2004; Nakagawa et al., 2004). Además, E6 interactúa y estimula la degradación proteolítica de las proteínas MUPP1 (del inglés *multi-PDZ domain protein*) y PATJ (del inglés *PALS1-associated TJ protein*), las que poseen múltiples dominios PDZ en sus secuencias (Lee et al., 2000; Latorre et al., 2005; Storrs and Silverstein, 2007). PATJ es otro componente de los complejos de polaridad celular,

sugiriendo de esta manera, que la inactivación de los componentes que regulan la polaridad celular es relevante para el ciclo de replicación viral y para la oncogénesis asociada a VPH. Además, es importante mencionar que la proteína MUPP1 es un regulador negativo de la proliferación celular, lo que favorecería la replicación viral dependiente de la diferenciación celular.

Otro de los blancos PDZ de E6 es la proteína MAGI 1 (del inglés *membrane-associated guanylate kinase WW and PDZ domain containing protein*), la cual también está localizada en las uniones intercelulares y participa en la regulación del supresor de tumores PTEN (del inglés *phosphatase and tensin homologue* (Thomas et al., 2001; Thomas et al., 2002). Recientemente ha sido reportado que MAGI es la proteína con motivos PDZ que es más eficientemente degradada en presencia de las proteínas E6 derivadas de VPH 16 y VPH 18 (Kranjec and Banks, 2011). Además, en el mismo estudio se indicó que su degradación promueve la disrupción de las UT en células epiteliales (Kranjec and Banks, 2011). En este caso, tanto E6 derivada de VPH 16 como de VPH 18, degradan con la misma eficiencia a MAGI 1. Sin embargo, no ocurre lo mismo con otros blancos; ya que, por ejemplo, DLG1 es degradado preferentemente por E6 de VPH 18 y Scribble por E6 de VPH 16. Esto podría explicarse por las diferencias en las secuencias específicas presentes en sus respectivos PBM (Figura 1.6), lo que conferiría distinta especificidad y/o afinidad de interacción (Thomas et al., 2005; Thomas et al., 2008a).

Por último, ha sido descrito que la proteína E7 de RhPV1 interacciona con la proteína PAR 3 (del inglés *Partitioning defective 3 homolog*), la cual es el regulador principal del complejo de polaridad PAR. Dicha unión proteica conlleva a alteraciones en los niveles y distribución subcelular de PAR 3 (Tomaic et al., 2008). Estos hallazgos demuestran una conservación evolutiva entre las oncoproteínas de RhPV1 y VPH, donde ambos virus son capaces de interferir con componentes de la maquinaria de control de la polaridad, a través de un sitio conservado de reconocimiento a dominios PDZ (Thomas et al., 2008b).

Cabe mencionar que mutaciones en el PBM de E6 de VPH conducen, en el contexto del ciclo viral, a una disminución de su replicación, pérdida de los episomas virales y pérdida de la frecuencia de integración al genoma celular, indicando la importancia de este sitio tanto en el ciclo replicativo como en la patogénesis viral (Lee et al., 2007). Además, en ratones transgénicos expresando proteínas E6 mutadas, que perdieron su capacidad de interactuar con dominios PDZ, se pudo observar una disminución en el desarrollo de hiperplasia y de tumores, comparando con aquellos ratones expresando la proteína salvaje, y resaltando, una vez más, la importancia del sitio PBM durante la oncogénesis viral (Nguyen et al., 2003).

De manera interesante, actualmente se conoce que las interacciones con PDZ no son privativas de virus oncogénicos, ya que proteínas virales derivadas de distintos virus, con ciclos de replicación muy diferentes, comparten esta capacidad de interacción proteica. Flavivirus, virus de influenza aviar, virus de la rabia, coronavirus, entre otros, codifican para proteínas conteniendo PBM y, en muchos de los casos, tal motivo ha sido considerado como un marcador diferencial de patogénesis. Ha sido demostrado que esta interacción involucra las mismas proteínas celulares PDZ, en especial aquellas relacionadas con la polaridad y la estructura de las uniones intercelulares (Tabla 3) (Javier and Rice, 2011). Dicha interacción resulta generalmente en alteraciones funcionales importantes en diversos procesos infecciosos. Al inactivar las proteínas PDZ durante su replicación viral, los virus ocasionan una pérdida de la integridad de las uniones celulares y de la polaridad celular, lo que permitiría la diseminación local o sistémica y la transmisión viral (Jackson et al., 2008; Javier and Rice, 2011).

La interacción de PBM con dominios PDZ es un tema emergente en Virología, por lo tanto, las investigaciones que se lleven a cabo en los próximos años aclararán el escenario y su implicancia en el desarrollo de las distintas patologías.

Familia	Virus	Proteína	Blancos PDZ
Adenoviridae	Adenovirus	E4 ORF	DLG1, MAGI1, MUPP1, PATJ, ZO2
Hepadnaviridae	HBV	Core	TIP-2/GIPC
Orthomyxoviridae	Influenza Aviar	NS1.	DLG1, MAGI1, MAGI2, MAGI3, Scribble, PDLIM2
Flaviviridae	Tick borne Virus	NS5	RIMS2, Scribble, ZO1
	Virus del Dengue	NS5	ZO1
Papillomaviridae	VPH	E6	CAL/GOPC, DLG1, DLG4, MAGI1, MAGI2, MAGI3, MUPP1, PATJ, PTPN3, PTPN13, Scribble, TIP1, TIP2/GIPC
	RhPV	E7	PAR 3
Retroviridae	HTLV-1	Tax	DLG1, DLG4, Erbina, MAGI3, proIL16, Scribble, TIP1, TIP2/GIPC.
Rhabdoviridae	Rabia	Env	DLG1, MAST2, MUPP1, PTPN4
Coronaviridae	Virus del Síndrome respiratorio agudo severo.	G	PALS1

Tabla 3: Proteínas derivadas de distintos virus que interaccionan con dominios PDZ. En la tabla se indican las familias a las cuales pertenecen los virus, así como también las proteínas que poseen el PBM. Los blancos PDZ para las distintas proteínas conteniendo motivos PBM en muchos casos son los mismos, sin embargo las consecuencias de dicha interacción pueden ser diferentes. Algunas de dichas proteínas se describen en las secciones subsiguientes. Nótese también la lista de blancos con dominios PDZ de E6 los cuales se detallan en la sección 1.3.5.2 II. Tabla adaptada de Javier y colaboradores (Javier and Rice, 2011).

Referencias: **GIPC/TIP2**(del inglés *GIPC/Tax-interacting protein-2*), **PTPN** (del inglés *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type*), **PALS1** (del inglés *proteins associated with Lin-7*), **PDLIM2** (del inglés *PDZ and LIM domain protein 2*), **RIMS2** (del inglés *regulating synaptic membrane exocytosis 2*), **CAL** (del inglés *CFTR associated ligand*), **GOPC** (del inglés *Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein*), **proIL16** (precursor de la interleuquina 16), **ZO** (del inglés *zonula occludens*) y **MAST2** (del inglés *microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2*).

1.4 Polaridad celular.

La mayoría de las proteínas PDZ, blancos de E6 de VPH de alto riesgo, forman parte de los complejos de polaridad celular *apicobasal*, siendo además en algunos casos los reguladores fundamentales del proceso de polarización. Es por ello que para comprender las consecuencias de la acción de las oncoproteínas E6 es necesario conocer en profundidad las funciones de las proteínas de polaridad celular, lo que será detallado a continuación.

1.4.1 Polaridad *apicobasal*. Complejos proteicos implicados.

La polaridad celular está determinada por diferencias en estructura, composición y función, entre dos polos. El concepto general de polaridad celular puede ser dividido en: polaridad antero-posterior, definido inicialmente en modelos de embriones unicelulares del gusano *Caenorhabditis elegans* y en el oocito de *Drosophila melanogaster*, polaridad *apicobasal* en células epiteliales, polaridad transiente en células que migran, y por último, polaridad planar, presente durante el desarrollo de los tejidos (Chen and Zhang, 2013). El 60% de las células en mamíferos, son células epiteliales (Bryant and Mostov, 2008). Éstas presentan una asimetría a nivel de la membrana plasmática, pudiéndose distinguir dos superficies: apical y basolateral, separadas por las uniones celulares del tipo UT. La membrana apical, en contacto con el exterior o con la luz del tubo o cavidad, y la membrana basolateral (basal y lateral), que conecta las células epiteliales con la lámina basal subyacente, presentan una composición distinta de lípidos y proteínas de membrana. Además, las organelas también se distribuyen de modo asimétrico. Para crear esta asimetría, las proteínas de membrana son dirigidas a regiones específicas mediante vías de tráfico polarizado (Mostov et al., 2003).

En humanos, el 80 % de los tumores son carcinomas, originados a partir de células epiteliales (Jemal 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).

La polaridad *apicobasal* está regulada por mecanismos conservados evolutivamente, estando presentes en *C. elegans*, *D. melanogaster*, ratones y humanos (Martin-Belmonte and Perez-Moreno, 2012). En mamíferos dicha polaridad está mediada por tres complejos proteicos, que se encuentran representados en la Figura 1.7. El complejo "CRUMBS" formado por la proteína CRUMBS, PALS1 y PATJ, requerido para la conformación de la membrana apical. El complejo "PAR" (del inglés *Partioning defective*) que promueve el establecimiento del dominio apical y lateral, formado por PAR 3, PAR 6 y aPKC (del inglés *atypical protein kinase C*). Por último, el complejo de polaridad celular Scribble (SCRIB) compuesto por LGL (del inglés *lethal giant larvae homologue*), DLG1 y Scribble, el cual define el dominio de membrana basolateral (Goldstein and Macara, 2007; Assemat et al., 2008; Humbert et al., 2008; McCaffrey and Macara, 2009).

El correcto ensamblaje y localización de los tres complejos de polaridad celular depende de interacciones entre sus miembros. La formación de los dominios apical y basolateral es un proceso mutuamente antagónico, mediado por interacciones proteína-proteína y por fosforilaciones proteicas, las cuales definen la frontera *apicobasal* formada por las UT (Pieczynski and Margolis, 2011) (Figura 1.7). Se ha descrito que la formación del dominio apical es un proceso jerárquico mediado por interacciones, donde los complejos PAR y CRUMBS cooperan entre sí para establecer la identidad del dominio y ensamblar las UT (Coradini et al., 2011). De hecho, la localización del complejo PAR en el dominio apical es estabilizada por el complejo CRUMBS, cuya localización es recíprocamente dependiente del complejo PAR. Como consecuencia, el complejo CRUMBS permite que las UT se mantengan en la zona apical al mantener al complejo PAR en esta región de la membrana, siendo la fosforilación de PAR 3 y Crumbs, mediadas por aPKC, un evento clave para la localización de los complejos CRUMBS y PAR (Coradini et al., 2011). Por otro lado, el complejo SCRIB define el dominio basolateral, en este caso SCRIB adquiere su localización mediante la fosforilación de LGL mediada por aPKC, y por procesos de exclusión proteica de los complejos PAR y CRUMB (Coradini et al., 2011). Así, los tres complejos de polaridad celular pueden interconectarse de distintas maneras, lo que podría afectar las funciones de un componente u otro (Pieczynski and Margolis, 2011). Las consecuencias de estas interacciones dependen del tipo celular y del contexto resultando fundamentales durante el desarrollo.

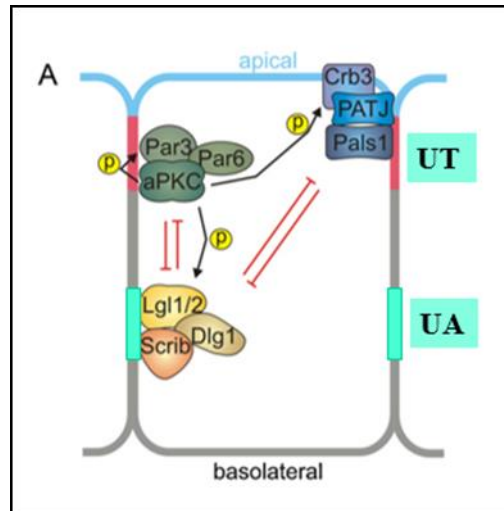


Figura 1.7: Representación esquemática de los complejos proteicos que regulan la polaridad apicobasal en las células epiteliales de mamíferos. Las células epiteliales están polarizadas a lo largo del eje apicobasal, debido a la acción de tres complejos de polaridad celular. Los complejos “PAR” (PAR 3/PAR 6/aPKC) y “CRUMBS” (CRB/PALS1/PATJ) están localizados en la membrana apical regulando las UT. El complejo “SCRIB” (SCRIB/DLG1/LGL) se ubica en el dominio basolateral de las células regulando las UA. El complejo CRUMBS regula la formación de la superficie apical, el complejo SCRIB regula la formación de la superficie lateral, mientras que el complejo PAR modula el balance entre las superficies apical y basolateral mediante múltiples interacciones. La proteína aPKC es capaz de fosforilar a las proteínas LGL, PAR 3 y Crumbs. Figura adaptada de Ellenbroek y colaboradores (Ellenbroek et al., 2012).

Es importante destacar también que las proteínas que conforman los complejos de polaridad descriptas anteriormente interactúan con otras proteínas que conforman las UT y UA. Dichas uniones resultan fundamentales para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad en células epiteliales. A nivel molecular, las UA están formadas por los complejos de adhesión caderina-catenina y nectina–afadina (Niessen and Gottardi, 2008). Las UA permiten una fuerte asociación entre las células epiteliales, lo que resulta esencial para su función en la formación de barreras protectoras. Pero además, participan en diversos procesos fisiológicos, como las vías de señalización que regulan la proliferación celular y el crecimiento epitelial (Le Bras et al., 2012). Por otro lado, las UT se localizan en la frontera entre la membrana apical y basolateral, por encima de las UA. Allí actúan como una frontera que impide el movimiento de proteínas y lípidos entre estos dos dominios de membrana, lo que favorece la polaridad y, además, sellan el espacio entre células vecinas actuando como un barrera dinámica (Cerejido et al., 2008). Las proteínas transmembrana que forman parte de las UT son: ocludina, claudina, tricelulina y JAM (del inglés *junctional adhesion molecule*), las cuales interactúan mediante su dominio citoplasmático con varias proteínas de anclaje, incluyendo ZO1, ZO2, ZO3, MUPP1 y cingulina (Tsukita et al., 2008). El establecimiento de las uniones celulares y de la polaridad celular están íntimamente relacionados y son importantes, tanto en la organización de los epitelios como durante el desarrollo carcinogénico.

1.4.1.1 Complejo de polaridad celular PAR.

Los genes que codifican para PAR 3, PAR 6 y aPKC fueron originalmente identificados en los cigotos de *C. elegans*, al estudiar los genes requeridos para el establecimiento de la polaridad antero-posterior. Subsecuentemente, se acumularon evidencias indicando que PAR 3 y PAR 6 actúan en conjunto con aPKC en la regulación los pasos iniciales de la polarización en *C. elegans* y embriones de *D. melanogaster* (Tabuse et al., 1998), en la división celular asimétrica en el neuroblasto de *D. melanogaster* (Wodarz et al., 1999), y en el establecimiento de la polaridad *apicobasal* en células epiteliales, así como también, en la polaridad axón-dendrita de las neuronas (Hurd et al., 2003; Plant et al., 2003; Shi et al., 2003). En la última década se han caracterizado los mecanismos y las funciones de este complejo, lo que ha permitido entender los eventos de señalización celular implicados en la polaridad celular.

Una característica que comparten PAR 3 y PAR 6, consiste en que son proteínas de anclaje modulares, capaces de interactuar entre ellas y con un amplio rango de proteínas regulatorias (Macara, 2004a). Estas interacciones aseguran que el complejo PAR esté localizado en dominios de membranas específicos, de una manera temporal y espacial determinada (Tepass, 2012).

La proteína PAR 3 es una proteína de andamiaje, asociada a membrana plasmática, que presenta múltiples dominios, principalmente posee tres dominios PDZ, con uno de los cuales interactúa con PAR 6 (Figura 1.8), un dominio de interacción con aPKC (aPKCBD), y un sitio denominado 4N1/2/3, a través del cual interactúa con distintas proteínas (Izumi et al., 1998; Hung and Kemphues, 1999; Joberty et al., 2000). Ha sido demostrado que PAR 3 es capaz de formar homodímeros a través de un dominio CR1 presente en su extremo amino terminal (Figura 1.8) (Benton and St Johnston, 2003a; Mizuno et al., 2003). Esto último provee las bases moleculares para el enriquecimiento del complejo PAR en la membrana de células polarizadas (Mizuno et al., 2003; Feng et al., 2007).

PAR 6 contiene un dominio PB1 (del inglés *Phagocyte oxidase/Bem1*) en su región amino terminal con el que puede interactuar con aPKC. Además, cuenta con un dominio PDZ capaz de establecer una interacción homotípica con el dominio PDZ de PAR 3 (Joberty et al., 2000). Por último, PAR 6 posee un dominio semi CRIB (del inglés *CDC42/Rac-interactive binding*) en la región carboxilo terminal, que media la unión con el intercambiador de nucleótidos, CDC42-GTP (del inglés *cell division control protein 42 homolog*), el cual regula su función (McCaffrey and Macara, 2009).

La quinasa aPKC, presenta en humanos dos isoformas, PKC ζ y PKC λ , que pertenecen a la familia PKC, pero que se clasifican como PKC atípicas ya que no poseen los dominios C1 y C2 característicos de la familia (Akimoto et al., 1994). aPKC interacciona con PAR 3 a través de su dominio de actividad quinasa (Joberty et al., 2000)(Figura 1.8). Además, se destaca por su función como regulador de la polarización, ya que controla la identidad de los dominios apical y lateral, a través de la fosforilación de distintos blancos entre los que se incluyen PAR 3, LGL y Crumbs (Izumi et al., 1998; Yamanaka et al., 2001; Hirose et al., 2002).

En la Figura 1.8 se señalan los dominios que presentan las proteínas constituyentes del complejo, así como también las interacciones entre las mismas.

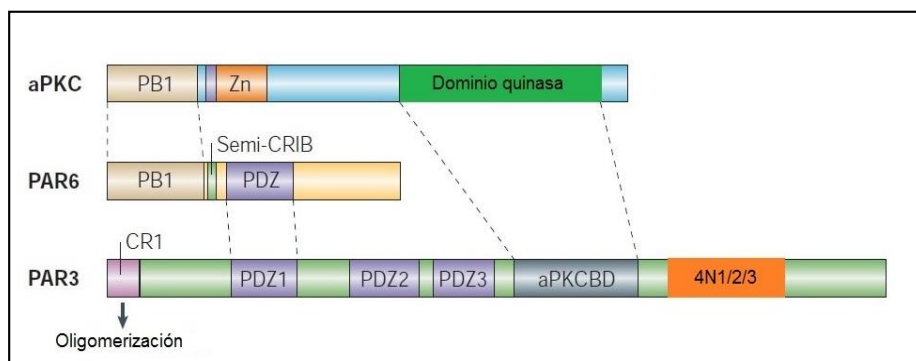


Figura 1.8: Proteínas del complejo PAR y sus dominios de interacción. Las proteínas PAR 3, PAR 6 y aPKC pueden interactuar entre sí, mediante distintos dominios de interacción proteicos que se encuentran señalados con líneas punteadas. PAR 6 posee tres dominios en su estructura: PB1, PDZ y semi CRIB (referido de esta manera debido a que el dominio CRIB normalmente tiene el doble de la longitud). aPKC posee un dominio PB1, un motivo dedos de Zinc que tiene funciones regulatorias y un dominio de actividad quinasa, a través del cual es capaz de fosforilar a PAR 3. PAR 3 presenta en la región amino terminal un dominio CR1 requerido para su oligomerización, 3 dominios PDZ, un dominio de interacción con aPKC, el cual puede ser fosforilado, y el sitio 4N1/2/3. Figura adaptada de Ian Macara (Macara, 2004b).

Ha sido demostrado que la proteína PAR 6 regula la función de aPKC al interactuar con dicha quinasa y modular su actividad (McCaffrey and Macara, 2009). La interacción de CDC42 con PAR 6 en determinadas circunstancias, genera un cambio conformacional en PAR 6 que estimula la actividad quinasa de aPKC. Esto facilita la interacción del módulo PAR 6/aPKC con la proteína PAR 3 asociada a membrana, y el anclaje del complejo PAR completo en el dominio apical. La proteína aPKC, una vez unida a PAR 3, activa su fosforilación en residuos serina, y de esta manera, PAR 3 fosforilada provoca la liberación del módulo PAR6/aPKC, el cual es capaz de interactuar con las proteínas del complejo CRUMBS, específicamente PALS1 y PATJ (Horikoshi et al., 2009). Las interacciones previamente descritas permiten la formación del complejo PAR, que se caracteriza por ser un complejo dinámico, en donde el módulo PAR 6/aPKC es constitutivo, pero la interacción con PAR 3 es transiente (McCaffrey and Macara, 2009). Se ha demostrado que la unión del módulo aPKC/PAR 6 a CRUMBS es esencial para el ensamblaje del

dominio apical y para la conformación de las UT, y está mediado por interacciones con PAR 6 (Roh et al., 2003; Shin et al., 2005; McCaffrey and Macara, 2009). Es por este motivo, que en células epiteliales de mamíferos PAR 3 se encuentra en las UT y el módulo PAR 6/aPKC está localizado más apicalmente, aunque estas diferencias en localización no son tan evidentes en cultivos convencionales (Yamanaka et al., 2001; Bryant and Mostov, 2008).

1.4.1.2 PAR 3.

La proteína PAR 3 en mamíferos presenta 3 isoformas, las cuales son consecuencia de eventos de *splicing* alternativo que sufre el transcripto (Gao et al., 2002). Dichas isoformas difieren en su peso molecular (180, 150, y 100 kDa) pero comparten el dominio de oligomerización (CR1) y los dominios PDZ (Figura 1.9)(Macara, 2004a). El sitio de interacción con aPKC está presente en las isoformas de 180 y 150 kDa, y sólo la isoforma de 180 kDa posee la región 4N1/2/3. La expresión de las distintas isoformas es diferente en los diversos tejidos, lo que genera distintos patrones de interacción (según las isoformas que estén presentes) y, en consecuencia, distintas actividades celulares de PAR 3 (Gao et al., 2002).

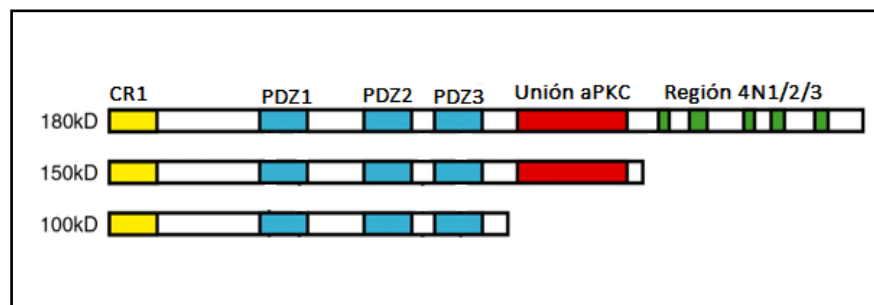


Figura 1.9: Esquema de las distintas isoformas de la proteína PAR 3. PAR 3 presenta 3 variantes como resultado de distintos eventos de *splicing* alternativo. Nótese que el dominio de oligomerización (CR1) y los dominios PDZ están conservados en las 3 variantes. Figura adaptada de Sfakianos y colaboradores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

La interacción de PAR 3 con distintas proteínas y/o lípidos permiten su localización asociada a membrana plasmática. Como se describió previamente, PAR 3, presenta múltiples dominios, entre los cuales, los PDZ son los más importantes para su localización, ya que el PDZ1 permite la interacción con JAM1 y nectinas, proteínas de UT, importantes para el anclaje inicial de PAR 3 a membrana plasmática (Itoh et al., 2001; Ebnet et al., 2003; Takekuni et al., 2003; Chan et al., 2006). Por otro lado, los dominios PDZ 2 y 3 dispuestos en *tándem*, interaccionan con Pls y PTEN (a través del sitio PBM de PTEN), respectivamente (Wu et al., 2007). Los Pls asociados a membrana con los cuales PAR 3 interacciona, también facilitan su anclaje a membrana contribuyendo a su ubicación. Sin embargo, ninguna de las asociaciones previamente

descriptas permiten explicar totalmente su localización, pero todas ellas contribuyen a su enriquecimiento en el dominio apical de la membrana plasmática, en asociación con las UT (McCaffrey and Macara, 2009).

Vale destacar que se ha descrito recientemente que la región amino terminal de PAR 3 puede interactuar fuertemente con microtúbulos, ejerciendo una función empaquetadora de los mismos. La asociación con microtúbulos permite el transporte de PAR 3 a membrana plasmática, y ha sido reportado que la disrupción de dicha función es perjudicial, tanto para la diferenciación del axón en neuronas, como para la polaridad *apicobasal* en epitelios (Chen et al., 2013). Por último, la región carboxilo terminal de PAR 3, que contiene el sitio de interacción con aPKC, posee además tres regiones muy conservadas denominadas 4N 1/2/3 (Figuras 1.8 y 1.9). Estas regiones permiten la unión con Numb/Numbl (proteína importante durante la diferenciación celular) (Nishimura and Kaibuchi, 2007). En esta región, también se encuentran aminoácidos cargados positivamente, mediante los cuales PAR 3 puede interactuar con lípidos de membrana lo que contribuye a su localización apical.

Como se describió anteriormente, la identidad del complejo PAR está regulada, al menos en parte, por la habilidad de la proteína aPKC de unir y de fosforilar a PAR 3 (Izumi et al., 1998; Hirose et al., 2002; Morais-de-Sa et al., 2010). La fosforilación en el residuo S827 es requerida para la formación de las UT y del dominio apical (Hirose et al., 2002; Nagai-Tamai et al., 2002; Suzuki et al., 2002). Así, la sobreexpresión en células de mutantes de PAR 3 en el sitio de fosforilación o las dobles mutantes negativas de aPKC, resulta en un fenotipo similar, presentando dichas células una superficie lateral expandida y una superficie apical reducida (Nagai-Tamai et al., 2002). Por otro lado, PAR 3 puede ser fosforilada por otras quinasas, por ejemplo la fosforilación en S144 y S885 mediada por PAR1 permite la unión de PAR 3 a la proteína 14.3.3 (Benton and St Johnston, 2003b). Dicha interacción desestabiliza la asociación de PAR 3 a la membrana plasmática, lo que indica que no sólo hay mecanismos que facilitan su localización, sino que otros excluyen su ubicación en determinados sitios. Adicionalmente a la regulación de PAR 3 mediada por quinasas, dicha proteína puede ser regulada por fosfatasas. La desfosforilación en residuos serinas está mediada principalmente por la proteína fosfatasa 1 α (PP1 α , del inglés *Protein phosphatase 1*), y se ha observado que la represión de su expresión en células MDCK altera la formación de las UT (Traweger et al., 2008).

Para concluir, es importante destacar que ha sido reportado que PAR 3 presenta una localización nuclear en la línea celular HeLa (Fang et al., 2007). Fang y colaboradores han asociado la localización nuclear de PAR 3 con una función de la misma en la activación de la

proteína quinasa ADN-dependiente, DNAPK, durante la reparación del ADN. Además, el análisis de la secuencia de PAR 3 reveló la presencia de una potencial señal de localización nuclear; sin embargo, 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).

1.4.1.3 Importancia del complejo PAR en procesos oncogénicos.

A pesar de la escasa información acerca de los mecanismos mediante los cuales se produce la pérdida de la polaridad y arquitectura celular en los procesos carcinogénicos, recientes hallazgos han puesto en relevancia la importancia del complejo PAR en este mecanismo (Aranda et al., 2008). Ha sido demostrado que ErbB2 (del inglés *erythroblastic leukaemia viral oncogene homologue 2*) interacciona con el módulo PAR6/aPKC y que dicha interacción es requerida durante la disrupción de la polaridad *apicobasal* y posterior transformación de células polarizadas (Aranda et al., 2006; Facciuto et al., 2012). Además, PAR 6 es un mediador crítico del factor de crecimiento transformante β (TGF β , del inglés *Transforming growth factor beta*), el cual induce la EMT y metástasis (Aranda et al., 2008). Asimismo, ha sido demostrado que PAR 6 y aPKC se encuentran sobre expresadas en cáncer de mama, ovario, pulmón y páncreas, lo que conlleva a un aumento en la invasión celular (Eder et al., 2005; Regala et al., 2005; Nolan et al., 2008; Vioria-Petit et al., 2009; Murray et al., 2011). No obstante, se encontró que la región genómica que contiene al gen que codifica para PAR 3 se encuentra truncado en algunas líneas celulares derivadas de carcinomas de pulmón, cabeza y cuello, y esófago (Zen et al., 2009; Rothenberg et al., 2010). Los datos obtenidos hasta el momento sugieren que aPKC y PAR 6 tendrían actividades pro oncogénicas, mientras que PAR 3 podría actuar como un supresor de tumores (Facciuto et al., 2012).

Sin embargo, en estudios llevados a cabo por Iden y colaboradores en modelos de cáncer de piel tipo papilomas, se pudo observar una disminución del crecimiento del tumor al silenciar a PAR 3, indicando que PAR 3 actuaría como un promotor de tumores estimulando las vías de supervivencia (Iden et al., 2012). No obstante, en ratones transgénicos en donde se silenció la expresión de PAR 3, se documentó un aumento de la frecuencia de queratoacantomas, tumor frecuente en humanos, sugiriendo una función oncosupresora (Iden et al., 2012). De esta manera, se postula una función dual de PAR 3 en el desarrollo de cáncer de piel, dependiendo del tipo de tumor (Iden et al., 2012).

Como contrapartida, ha sido demostrado recientemente que el silenciamiento de la expresión de PAR 3 en células epiteliales derivadas de cáncer de mama, tiene como

consecuencia un aumento de la proliferación y de la invasión celular (Xue et al., 2013). Los mismos autores también determinaron que ratones transgénicos establemente silenciados para la expresión de PAR 3, poseen una mayor capacidad de producir metástasis pulmonar que los ratones control (Xue et al., 2013). En dicho estudio se demostró, además, que las células silenciadas para la expresión de PAR 3 presentan una menor cohesión celular, alterando también las UA. Además, reportaron una disrupción de la estructura de la actina cortical. Pero, aún más interesante, el análisis de la expresión de PAR 3 en biopsias derivadas de cáncer de mama, permitió observar una disminución en la localización de PAR 3 en los bordes celulares en la mayoría de las muestras, o una deslocalización del marcador en otros casos, asociándose este hallazgo con tumores de peor pronóstico. En conjunto, el estudio de Xue y colaboradores demostró que la disminución de la expresión de PAR 3 está asociada con metástasis y con tumores de mal pronóstico en un modelo de cáncer de mama en humanos (Xue et al., 2013). Simultáneamente, un estudio llevado a cabo por McCaffrey y colaboradores, también reveló que PAR 3 se comporta como un supresor de tumores, en modelos de ratones, donde la disminución de su expresión por silenciamiento ocasionaba una reducción de la latencia de los tumores y, además, en estas condiciones, los tumores resultaban ser más invasivos, observándose una deslocalización de E caderina y E catenina (McCaffrey et al., 2012). Se reportó también, que la ausencia de PAR 3 producía un aumento en la metástasis, diseminación y colonización de las células tumorales. Estos hallazgos, en ratones, también se corroboraron en biopsias de cáncer de mama en donde se reportó una disminución de la expresión de PAR 3 en tumores invasivos, en conjunto con una activación de aPKC y de STAT (del inglés *signal Transducer and Activator of Transcription*) los que conllevarían a la activación de las metaloproteasas y posterior metástasis. En conjunto, ambos estudios resaltan la función de PAR 3 como supresor de tumores y de metástasis, lo cual concuerda con lo observado en queratoacantomas (Iden et al., 2012).

Teniendo en cuenta la importante función de PAR 3 en lo que respecta a su actividad como supresor de tumores y metástasis, descritas precedentemente, se desprende la necesidad de evaluar la situación de dicha proteína en el contexto de la infección con VPH. Esto último, considerando que PAR 3 presenta dominios PDZ con los cuales proteínas E6 derivadas de VPH de alto riesgo podrían interactuar y estimular su degradación, como ocurre con otros blancos reportados de E6 (sección 1.3.5.2). Por lo tanto, para comprender en conjunto la oncogénesis asociada a las infecciones por VPH, es fundamental evaluar la implicancia del complejo PAR en el proceso.

1.4.2 Importancia de los fosfoinosítidos en la polaridad celular.

Los lípidos de tipo PIs son componentes esenciales en las membranas de células eucariotas, y su participación en diversos mecanismos de traducción de señales es crucial para la regulación de numerosos procesos biológicos, entre ellos el establecimiento de la polaridad celular (Di Paolo and De Camilli, 2006; Saarikangas et al., 2010). De hecho, la polaridad celular depende, en parte, de la distribución asimétrica de las distintas isoformas de PIs a lo largo del eje *apicobasal* de la célula epitelial. La fosforilación y desfosforilación permiten la rápida interconversión de las distintas especies de PIs las cuales se distinguen por el distinto patrón de fosforilación. De esta manera se regula su distribución espacial específica, lo que les permite llevar a cabo distintas funciones (Figura 1.10) (Shewan et al., 2011).

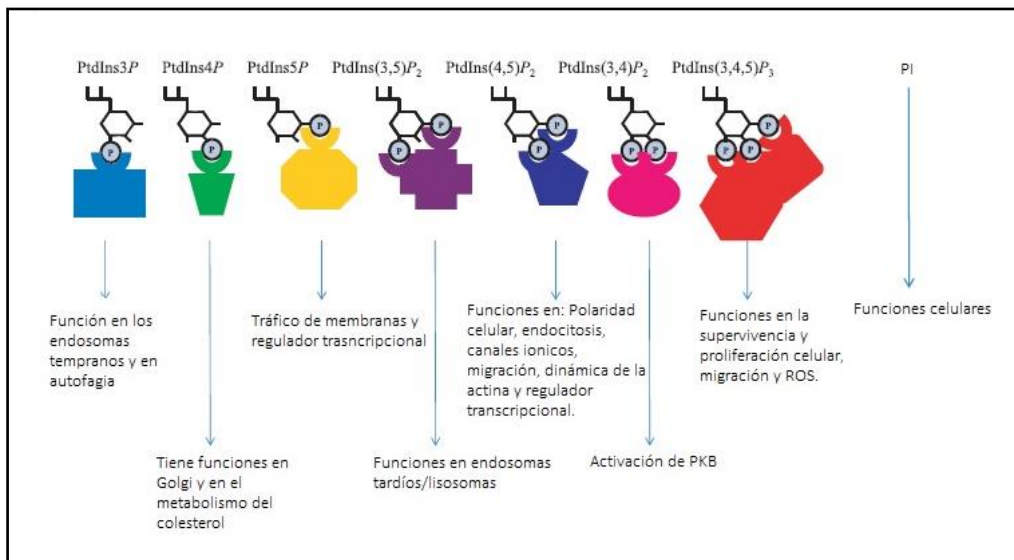


Figura 1.10: Distintas funciones de los PIs en la célula. Los distintos PIs interactúan con diferentes proteínas efectoras para llevar a cabo diversas funciones celulares. Figura adaptada de Shah y colaboradores (Shah et al., 2013)

Entre las fosfatasa y quinasas que regulan los niveles de las distintas isoformas de PIs, se encuentra la fosfatasa PTEN que junto con la quinasa PI3K (del inglés *Phosphatidylinositol 3-kinase*) regulan los niveles de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato [PI(4,5)P₂] y fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato [PI(3,4,5)P₃] respectivamente. Así, se regulan de manera opuesta los niveles de PI(3,4,5)P₃, un elemento clave en la vías de señalización que favorecen el crecimiento, la supervivencia y la proliferación celular (Bunney and Katan, 2010). Por otro lado, PI(4,5)P₂, el más abundante de los PIs, es un importante integrador de señales de proliferación y polarización celular, procesos que dependen de una localización subcelular específica de dicho PI (Bunney and Katan, 2010). De hecho PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃ adquieren una localización asimétrica en células polarizadas, donde PI(4,5)P₂ presenta una localización netamente apical, y PI(3,4,5)P₃

una localización basolateral, como se muestra en la Figura 1.11 (Martin-Belmonte and Mostov, 2007). Además, ha sido demostrado que PI(4,5)P2 y PI(3,4,5)P3 están involucrados en la regulación de la migración celular, donde PI(3,4,5)P3 está enriquecido en el polo frontal, mientras que PI(4,5)P2 está localizado en la polo posterior del movimiento (Janetopoulos and Devreotes, 2006). Esto indicaría que, tanto en células polarizadas como en células que migran, la localización de estos lípidos definen diferentes funciones (Figura 1.11). Cabe destacar también, que estudios recientes han demostrado que la vía señalización de los PIs es fundamental para los procesos de citoquinesis en *Dictyostelium*, en donde PTEN y PI(4,5)P2 se localizan en el surco y PI(3,4,5)P3 está enriquecido en los polos celulares (Janetopoulos and Devreotes, 2006) (Figura 1.11).

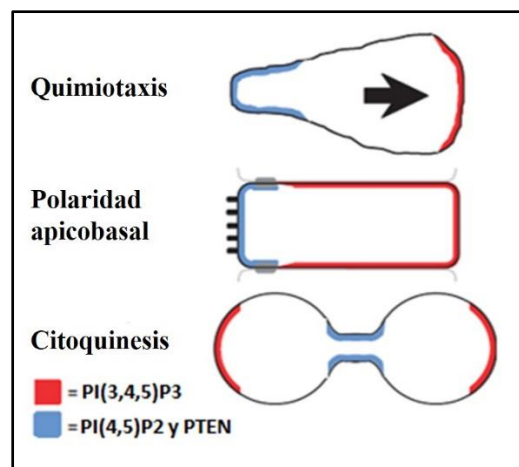


Figura 1.11: Enriquecimiento de PIs y PTEN en regiones específicas de la membrana plasmática en distintos procesos celulares polarizados. El enriquecimiento de PTEN y PI(4,5)P2 se señala en azul, mientras que en el caso de PI(3, 4,5)P3 está señalado en rojo. PI(3,4,5)P3 está presente en el frente de movimiento de neutrófilos, fibroblastos y células de *Dictyostelium* durante la quimiotaxis; en la membrana basolateral de células epiteliales y en los dos polos de las células *Dictyostelium* durante la citoquinesis. Por el contrario, PTEN y PI(4,5)P2 se encuentran enriquecidas en la membrana apical de células epiteliales polarizadas, en el eje posterior durante la quimiotaxis y en el surco de *Dictyostelium* durante la citoquinesis. Adaptada de Leslie y colaboradores (Leslie et al., 2008).

Para analizar la localización de los PIs en células polarizadas de mamíferos se han utilizado cultivos en tres dimensiones de la línea celular MDCK. Dicha línea celular es capaz de formar acinos con un lumen central, cuando las células se crecen bajo determinadas condiciones sobre una matriz extracelular (O'Brien et al., 2002). Este modelo proporcionó información muy valiosa sobre la formación del lumen, y fue fundamental para analizar la habilidad de las células epiteliales de formar la superficie apical en contacto con el lumen. Se ha visto entonces que, en estadios tempranos de la formación del acino, PI(4,5)P2 se concentra en la superficie apical evento que es determinante para la polaridad *apicobasal* en células epiteliales. Por otro lado

PI(3,4,5)P3 permanece en la membrana basolateral, excluido de esta manera de la región apical (Martin-Belmonte and Mostov, 2007). De hecho en dicha línea celular, en condiciones de no polarización, tanto PI(4,5)P2 como PI(3,4,5)P3, colocalizan en las uniones celulares y en los contactos con la matriz extracelular. En estudios en donde los niveles de PI(4,5)P2 fueron disminuidos con fosfatasas bacterianas, se notó un cambio en la estructura epitelial, observándose una alteración del citoesqueleto y de la asociación de la célula con la matriz extracelular, indicándose de esta manera la importancia de la localización de PI(4,5)P2 en el dominio apical (Mason et al., 2007).

Globalmente, los hallazgos presentados hasta el momento indican que los PIs tienen una función crítica en la determinación de la especificidad de las membranas celulares apical y basolateral; sin embargo, los mecanismos a través de los cuales dicha asimetría se inicia no han sido completamente dilucidados. Estudios recientes han comenzado a esclarecer los eventos que son requeridos para el desarrollo de la membrana apical, los cuales implican la interacción de PI(4,5)P2 con proteínas claves que regulan la polaridad *apicobasal* (Shewan et al., 2011). Entre estas, se encuentran proteínas con dominios PDZ, como PAR 3 entre otras (secciones 1.3.5.2 I y 1.4.1.2). La interacción PAR 3-Pis es necesaria para la localización cortical de esta proteína y para su función en células epiteliales (Wu et al., 2007). Más aún, PAR 3 interacciona también directamente con PTEN, lo que permite que PTEN se localice en la membrana plasmática y, de esta manera, participe en la regulación de los niveles de PI(4,5)P2 en la región apical (von Stein et al., 2005). Dicha interacción está conservada en la naturaleza, poniendo en relevancia su función en el establecimiento de la polaridad *apicobasal* (Feng et al., 2008b). Es importante mencionar que PTEN también interacciona con MAGI2 (proteína con múltiples dominios PDZ) y, de esta manera, las proteínas MAGI y PAR 3 cooperan entre sí en la localización de PTEN (Subauste et al., 2005). Considerando que PAR 3 es capaz de interaccionar tanto con PIs como con PTEN de una manera concatenada, se ha propuesto a PAR 3 como una proteína de andamiaje central en la integración de las señales de los PIs durante los procesos de polarización y proliferación celular (Figura 1.12)(Wu et al., 2007; Feng et al., 2008b).

La interacción de PAR 3 con PTEN detallada anteriormente asegura que PI(3,4,5)P3 (generado por PI3K) no pueda ubicarse en el dominio apical, ya que si lo hace es hidrolizado por PTEN. Además, el dominio CR1 de oligomerización de PAR 3 (Feng et al., 2008b) incrementa la capacidad de PAR 3 de capturar PI(3,4,5)P3 y degradarlo vía PTEN. De esta manera el complejo PAR 3-PTEN, ubicado en las UT, funciona como un “aislante” compartimentalizando la distribución de los PIs en células polarizadas y de esta manera regulando la función de los mismos (Wu et al., 2007).

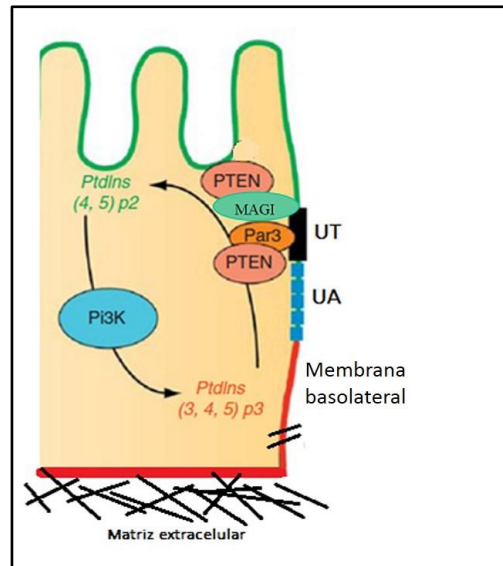
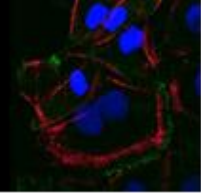


Figura 1.12: Los lípidos tipo PIs participan de la regulación de la identidad de la membrana en células epiteliales. PI(3,4,5)P3 (en rojo) es generado por PI3K por distintos mecanismos y contribuye a la especificidad del dominio basolateral. Este proceso está, a su vez, coordinado con PTEN el cual enriquece la membrana apical con PI(4,5)P2 (en verde). PAR 3 interacciona con PTEN y con PIs de manera concatenada, por lo tanto, integra las señales de PIs. MAGI interacciona con PTEN, facilitando su asociación a membrana junto con PAR 3. Figura adaptada de Rodríguez-Fraticelli y colaboradores (Rodríguez-Fraticelli, 2009).

Teniendo en cuenta lo descrito en la sección Introducción y considerando que:

I) PAR 3 es crítico para el establecimiento de las UT, la polaridad apicobasal, y actúa como un oncosupresor en distintos procesos tumorales; II) la proteína E6 de VPH es capaz de estimular la degradación y/o interferir con la función de numerosas proteínas con dominios PDZ, pertenecientes a los complejos de polaridad celular (Scribble, DLG1 y PATJ entre otros); III) PAR 3 es un integrador de señales de PIs, al interaccionar con PIs y con PTEN de manera concatenada; IV) y que los complejos de polaridad celular están intercomunicados entre sí, y alteraciones de las proteínas pertenecientes a un complejo puede tener como consecuencia cambios en las funciones de los otros complejos, decidimos investigar el efecto E6 de VPH sobre el complejo de polaridad PAR, lo que constituye este trabajo de Tesis.

Objetivos



2.1 Objetivo general.

Dado el elevado impacto socioeconómico, el entendimiento y control de los mecanismos que conducen al cáncer cervical debe ser un tema prioritario en Salud Pública.

Para entender los mecanismos por los cuales el VPH infecta las células e induce progresión maligna es necesario comprender la biología molecular del virus y su interacción con los componentes de la célula hospedadora. El desarrollo oncogénico está frecuentemente asociado a la pérdida de la polaridad celular. Sin embargo, los procesos moleculares precisos que conectan el control de la proliferación celular con la regulación de la polaridad aún no han sido totalmente dilucidados. A partir de esto, nos propusimos profundizar el estudio de la interacción de las oncoproteínas E6 de VPH con blancos celulares implicados en la formación de las uniones intercelulares y en las vías que participan de la polarización de la célula epitelial. Específicamente, nos planteamos abordar la potencial interferencia de la proteína E6 con el complejo de polaridad celular PAR, elemento clave en la formación de las UT, en la regulación de la polaridad y en la integración de las vías de transmisión de señales que controlan el crecimiento celular. Dado que la pérdida de la polaridad celular es una característica de los mecanismos carcinogénicos, los datos obtenidos a partir de la ejecución de esta Tesis aportan no sólo al conocimiento integral de los procesos de progresión maligna asociados a VPH, sino a los procesos tumorales en general.

2.2. Objetivos específicos.

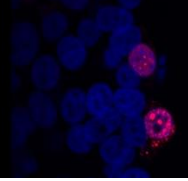
2.2.1. Análisis de la interferencia de E6 sobre las UT. Estudio del complejo de polaridad celular PAR.

- I) Estudio de la localización subcelular de PAR 3 en células que expresan E6 18.
- II) Estudio de los niveles proteicos de PAR 3 en células que expresan E6 18.
- III) Análisis de la interferencia de E6 16 sobre PAR 3.
- IV) Análisis de la interferencia de E6 sobre otros componentes del complejo PAR: aPKC y PAR 6.

2.2.2. Análisis de la interferencia de la proteína E6 sobre la polaridad celular.

- I) Análisis de la interferencia de E6 18 en la reconstitución de las UT.
- II) Análisis de la interferencia de E6 18 sobre la distribución de Pls e interacción Pls-PAR 3.
- III) Análisis de la intercomunicación entre los distintos complejos de polaridad celular.

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	Referencia u origen
<i>Escherichia coli</i> DH5α	supE44, Δ lacU169, (ϕ 80lacZ Δ AM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1	Colección laboratorio
Vectores de expresión proteica.	Características relevantes	Referencia u origen
pcDNA3	Vector de clonado que permite la expresión de proteínas recombinantes en células animales y la traducción de proteínas <i>in vitro</i> .	Invitrogen (EE.UU.)
pcDNA3HA-E6 11 pcDNA3HA-E6 16 pcDNA3HA-E6 18 pcDNA3HA-E6 18mut	pcDNA3 conteniendo secuencias que codifican para la proteínas E6 de VPH 11 de bajo riesgo (E6 11) o VPH 16 y VPH18 de alto riesgo (E6 16 y E6 18), así como una mutante de E6 18 (E6 18mut), fusionadas al epítipo hemaglutinina del virus Influenza (HA).	Este trabajo de Tesis.
PH PLC GFP	Vector que permite la expresión de la proteína PH PLC (dominio pleckstrina de la fosfolipasa C), fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés <i>green fluorescent protein</i>).	Cedido por el Dr Fernando Martin Belmonte (Martin-Belmonte and Mostov, 2007).
pKMyc PAR 3	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 <i>in vitro</i> como en células animales.	Cedido por el Dr Mathieu Coureuil (Coureuil et al., 2009)
LacZ	Vector que permite la expresión de la proteína β galactosidasa (β Gal), se utiliza para control de transfección.	Colección del Laboratorio.
pK PAR6 YFP	Vector que permite la expresión de la proteína PAR 6 de ratón fusionada a la proteína amarilla fluorescente (YFP, del inglés <i>yellow fluorescent protein</i>), tanto en sistemas <i>in vitro</i> como en células animales.	Cedido por el Dr Mathieu Coureuil (Coureuil et al., 2009)

pHACE PKC	Vector que permite la expresión de la proteína quinasa C (PKC) fusionada a HA, en sistemas <i>in vitro</i> y en células animales.	Cedido por el Dr. Sourav Ghosh (Ghosh et al., 2008).
pCDNA3HA-DLG1	pCDNA3 conteniendo secuencias que codifican para la proteína DLG1 fusionada al epítipo HA.	Colección del laboratorio (Gardioli et al., 1999).
pCDNA3-p53	pCDNA3 conteniendo secuencias que codifican para la proteína p53.	Cedido gentilmente por el Dr. Lawrence Banks (Thomas et al., 1999).
pCDNA3 FLAG-MAG1	pCDNA3 conteniendo secuencias que codifican para la proteína MAG1 1 fusionadas al epítipo FLAG (octapéptido DYKDDDDK).	Cedido gentilmente por el Dr. Lawrence Banks (Glaunsinger et al., 2000).

Tabla 3.1: Cepas bacterianas y vectores.

3.2 Líneas celulares.

- HeLa: Línea celular humana transformada derivada de carcinoma cervical asociado a VPH 18, expresa la oncoproteína E6 de VPH 18. "American Type Culture Collection" (ATCC CCL-2).
- HaCaT: Línea celular humana inmortalizada derivada de queratinocitos de piel (Boukamp et al., 1988).
- Caco-2: Línea celular humana epitelial derivada de adenocarcinoma de colon. "American Type Culture Collection" (ATCC HTB-37).
- HEK293T: Línea celular embrionaria derivada de riñón humano. "American Type Culture Collection" (ATCC CRL-1573).
- CaSKi: Línea celular humana transformada derivada de carcinoma cervical asociado a VPH 16, expresa la oncoproteína E6 de VPH 16. "American Type Culture Collection" (CRL-1550).

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 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 líneas celulares animales.

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.

Soluciones:

Tampón salino de fosfatos (PBS): NaCl 8 g/l; KCl 0,2 g/l; Na₂HPO₄ 1,15 g/l; KH₂PO₄ 0,2 g/l; pH=7,2.

Solución de tripsina/EDTA: tripsina (Gibco, EE.UU.) 0,05% y EDTA 0,02%, en solución PBS. Se esterilizó a través de filtros de 0,22 µm.

3.3.3 Crecimiento celular.

Crecimiento bacteriano.

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

Mantenimiento de las líneas celulares animales.

Todos los cultivos se realizaron en estufa a 37°C en atmósfera de dióxido de carbono 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.

3.4 Técnicas concernientes a la manipulación de ácidos nucleicos.

3.4.1 Aislamiento y purificación de ADN de vectores de expresión.

Para la preparación de ADN de los vectores de expresión se utilizaron los equipos comerciales: *NucleoSpin® Plasmid Miniprep Kit* (MACHEREY-NAGEL, 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 obtenido se resuspendió en H₂O estéril y se conservó a -20°C hasta su utilización.

3.4.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

La separación de las moléculas de ADN se realizó por electroforesis en geles de agarosa utilizando el sistema tipo submarino (Sambrook, 1989). Los geles se prepararon en solución tampón TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 10 mM; pH= 8). Para la visualización del ADN se procedió al agregado de bromuro de etidio en una concentración final de 1 µg/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 1%, según el tamaño de las moléculas de ADN a resolver. Las muestras de ADN 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 λBstE II de 702 a 14.140 pb, Marcadores de ADN Ladder 1Kpb 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.

3.4.3 Estimación de la concentración y calidad del ADN.

La cuantificación del ADN obtenido a partir de las preparaciones de ADN de los vectores 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 µg/ml de ADN doble hebra. Para esto se utilizó una dilución adecuada de los vectores de expresión proteicos, y se midió en un espectrofotómetro Genova de Jenway (Jenway -Bibby Scientific Limited, Reino Unido).

Además, en el caso de ADN para transfecciones, la calidad del mismo se comprobó por corrida y visualización en geles de agarosa. También se determinaron los índices de Absorbancia a 260 nm/Absorbancia a 280 nm, para evaluar contaminación con proteínas que absorben a 280.

3.4.4 Aislamiento y 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® Extract II* (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.

3.4.5 Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Las condiciones de corte usadas fueron las recomendadas por los proveedores de las distintas endonucleasas de restricción. En términos generales, se utilizó aproximadamente 1 U de enzima por μg de ADN. 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. Los vectores digeridos, además, se trataron con fosfatasa alcalina para disminuir la probabilidad de religado en la reacción de ligación.

3.4.6 Ligado de moléculas de ADN.

Las reacciones de ligación 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.

3.4.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para todas las reacciones de amplificación se utilizó un termociclador Mastercycler 5333 (Eppendorf, Alemania). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 50 μl conteniendo solución tampón comercial suplementada con la cantidad óptima de MgCl_2 para cada reacción (en general se utilizó una concentración final de 2 mM de MgCl_2), 0,2 mM de cada dNTP, 20 pmoles de cebador sentido y antisentido, y 1U de ADN polimerasa Taq (Invitrogen, EE.UU. o Fermentas, EE.UU.). En todos los casos se utilizaron entre 2-5 ng de ADN molde por

tubo de reacción. Para la amplificación de E6 18mut se utilizó como molde el ADN de E6 18 y llevándose a cabo la mutagénesis sitio dirigida a partir de cambios en las bases del cebador. Los perfiles térmicos utilizados para las distintas reacciones variaron según el molde utilizado en las mismas, según se detalla en cada caso particular.

Para el clonado de las distintas proteínas E6 fusionadas al epítotope HA en el vector pcDNA3 (constructos pcDNA3HA-E6 11, pcDNA3HA-E6 16, pcDNA3HA-E6 18 y pcDNA3HA-E6 18mut), se diseñaron los siguientes cebadores específicos, según la secuencia reportada de ADN copia (ADNc) correspondiente y según reportada en bases de datos genómicos:

Cebador	Dirección	Secuencia
E6 11	Sentido	5'-TTAT AGATCT ATGGAAAGTAAAGATGCCTCC-3'
	Antisentido	5'-TTAT <u>GAATTCT</u> TAGGGTAACAAGTCTTCAT-3'
E6 16	Sentido	5'-TTAT AGATCT ATGCACCAAAAGAGAACTGCA-3'
	Antisentido	5'-TTAT <u>GAATTCT</u> TACAGCTGGGTTTCTCTACGT-3'
E6 18	Sentido	5'-TTAT AGATCT ATGGCGCGCTTTGAGGATCCAAC-3'
	Antisentido	5'-TTAT <u>GAATTCT</u> TATACTTGTGTTTCTCTGCGT-3'
E6 18mut	Antisentido	5'-TTAT <u>GAATTCT</u> TATGCTTGATCTTCTCTGCGT-3'

Tabla 3.2: Cebadores utilizados para amplificar las regiones codificantes de la proteína E6 de los distintos tipos de VPH.

Los sitios de restricción para *Bam*HI y *Eco*RI, utilizados para el clonado direccional, se señalan en negrita y subrayado, respectivamente. El perfil térmico usado fue el siguiente: 5 min a 95°C, 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C, 30 seg a 72°C, seguido por un paso final de extensión durante 5 min a 72°C. Como templado se utilizaron vectores conteniendo las secuencias virales (Colección del Laboratorio).

Los clonados realizados en este trabajo de Tesis se corroboraron 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 µl de H₂O destilada estéril e incubada a 98°C durante 5 min, luego se centrifugó 4 min a 13.000 g. Finalmente, 5 µl 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.

3.4.8 Extracción de ARN a partir de células en cultivo y transcripción reversa seguida de PCR (RT-PCR).

La extracción de ARN fue llevada a cabo para evaluar si el transgen de E6 estaba presente en las líneas celulares estables y, de esta manera, poder corroborar la identidad de las líneas celulares. Para llevar a cabo la extracción del ARN total se utilizó el reactivo *Trizol* (Invitrogen, EE.UU), y se procedió según el protocolo recomendado por el proveedor. La integridad y calidad del ARN purificado se evaluó con un espectrofotómetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Suecia), midiendo el cociente de absorbancia 260/280 nm.

El ADNc se sintetizó a partir de 2 µg de ARN total. Se preparó una mezcla de reacción que contenía la cantidad adecuada de ARN, 5 µM del cebador oligodT y agua libre de nucleasas, y se incubó durante 5 min a 65°C de manera de inducir la desnaturalización del ARN. Posteriormente, se enfrió 1 min en hielo, y se agregaron los restantes componentes de la retro-transcripción: 0,5 mM de cada dNTP; solución tampón (50mM Tris pH=8,3; 75mM KCl; 3mM MgCl₂; 5mM DTT); 100 U de MMLV-RT (Invitrogen, EE.UU) y 10 U de inhibidor de ribonucleasa, en un volumen final de 20 µl. Para la reacción de RT, la mezcla final se incubó a 42°C durante 60 min. Como paso final, se incubó a 72°C durante 10 min para inactivar la enzima transcriptasa reversa y se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización.

A partir del cDNA obtenido se llevó a cabo la reacción de PCR siguiendo las condiciones de amplificación de la sección 3.4.7, los pares de cebadores utilizados son los que se detallan en la tabla 3.2. Como control de la integridad del ARN se amplificó la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) utilizándose los siguientes cebadores: PAL-SDH-F: 5'-GCACACCCTGTCCTTTGT-3' (sentido) y PAL-SDH-R: 5'-CACAGTCAGCCTCGTTCA-3' (antisentido). Las condiciones utilizadas fueron: 5 min a 95°C, 22 ciclos de 40 seg a 94°C, 40 seg a 57°C, 40 seg a 72°C y un paso final de extensión durante 5 min a 72°C.

3.5 Transformación de células de *E. coli*.

3.5.1 Preparación de células a transformar.

- **Inducción del estado de competencia por el método de CaCl₂.**

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 CaCl₂ 50mM frío. Tras volver a enfriar y cosechar las células, las mismas se resuspendieron en una solución fría de CaCl₂ 50mM 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 se resuspendieron en H₂O 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 una centrífuga HERMLE labnet Z323K (rotor 220.78 VO2).

3.5.2 Transformación de células competentes con ADN derivado de vectores de expresión.

- **Transformación de células cuya competencia se logró por tratamiento con CaCl₂.**

Alícuotas de 100 µl de células competentes obtenidas por tratamiento con CaCl₂ como se detalló anteriormente, fueron transformadas agregando cantidades adecuadas de los diferentes vectores de expresión 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 min y se les agregó 1 ml de LB fresco, tras lo cual se dejaron recuperar a 37°C, con agitación por 1 hora. 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 horas a 37°C para seleccionar las bacterias transformantes.

- **Electroporación.**

Alícuotas de 40 µl de células competentes se agregaron junto con las cantidades adecuadas de los diferentes vectores de expresión o ligaciones, en cubetas para electroporación. La transformación se logró aplicando 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, en agitación durante 1 hora. 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 los antibióticos correspondientes. Las bacterias transformantes se seleccionaron incubando las placas a 37 °C durante 14-16 horas.

3.6 Transfección de células animales.

Esta técnica permite la transferencia de material génico a células animales en cultivo. 4 x 10⁵ células HEK293T o 6 x 10⁵ células HaCaT, según correspondiese, fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB en placas de Petri tipo cultivo celular (60 mm de diámetro), de manera de alcanzar una confluencia del 75 a 90% a las 24hs. Las células se cultivaron en una estufa gaseada a 37°C y se transfectaron según la técnica elegida.

Transfección usando el método de precipitación con fosfato de calcio (Scholat, 1997).

Se preparó una solución compuesta por el ADN a transfectar, 22 µl de CaCl₂ 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; NaHPO₄.12H₂O 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 18 a 48 hs. Esta técnica se utilizó para transfectar la línea celular HEK293T a partir de la cual se obtuvieron los extractos proteicos que fueron utilizados para ensayos de Western Blot (WB) o inmunoprecipitación (IP).

Transfección utilizando *EcoTransfect* (OZ Biosciences, Francia) o *Lipofectamina 2000* (Invitrogen, EE.UU.).

Se preparó una solución conteniendo el ADN a transfectar en cantidades adecuadas en 100 µl de medio de cultivo sin suero, sobre la cual se agregó gota a gota una segunda mezcla conteniendo 5 µl de *EcoTransfect* (OZ Biosciences, Francia) o *Lipofectamina 2000*, según corresponda, en 100 µl de medio de cultivo sin suero. La mezcla resultante se mezcló vigorosamente y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la misma se agregó a las células sembradas el día anterior a las que se le habían agregado 3 ml de medio fresco sin suero, y se incubó por 5 hs en estufa gaseada. Al cabo de este tiempo, se extrajo el medio conteniendo la mezcla de ADN de las placas de cultivo y se reemplazó por 3 ml de medio fresco suplementado con suero al 10%, pero sin antibióticos. Finalmente las células fueron incubadas en estufa gaseada por 24 horas. La transfección con *EcoTransfect* se utilizó para la línea celular HaCaT. Para los experimentos de silenciamiento en línea celular HeLa se utilizó *Lipofectamina 2000*.

3.7 Generación y selección de clones celulares transfectados de manera estable.

Clones estables derivados de la línea celular HaCaT expresando E6 como proteína de fusión al epítipo HA (HA-E6) fueron generados y seleccionados *a posteriori* de la transfección con 2 µg del vector pcDNA3HA-E6 o pcDNA3 vacío, utilizando el método de transfección con *Electroporation* (OZ Biosciences, Francia). Luego de un periodo de selección durante dos semanas en medio de cultivo conteniendo 500 µg/ml del antibiótico Geneticina G418 (Invitrogen, EE.UU), cuya resistencia se encuentra codificada en el vector de expresión pcDNA3, los clones resistentes (células HaCaT-HA E6 y células HaCaT-pcDNA3 control) fueron seleccionados tomando colonias aisladas, mediante la técnica del anillo. Dichos clones fueron cultivados y mantenidos en medios suplementados con el antibiótico G418. La expresión del transgen fue corroborada por ensayos de RT-PCR e inmunofluorescencia como se detalla en la sección 4.1.3 de Resultados.

3.8 Optimización de Cultivos celulares histotípicos.

Para la optimización de cultivos histotípicos, que representan más fehacientemente el microambiente celular respecto a un cultivo clásico, la línea celular HaCaT fue crecida sobre *Matrigel Basement Membrane Matrix* (BD Biosciences, EE.UU.). Células HaCaT en cultivo fueron tripsinizadas y, *a posteriori*, fueron resuspendidas en una concentración de $1,2 \times 10^5$ células por placa, en medio completo conteniendo 2% de Matrigel. Dicha suspensión fue sembrada sobre cubreobjetos previamente cubiertos con Matrigel, presentes dentro de placas de cultivo celular. Posteriormente, las células se incubaron en medio completo en estufa a 37°C, 5% CO₂, por 72 horas.

3.9 Técnicas concernientes a proteínas.

3.9.1 Preparación de los extractos proteicos a partir de células en cultivo.

Para los extracto solubles, las células HEK293T adheridas a la superficie de las placas se lavaron con PBS frío y se incubaron durante 10 min en hielo con la solución E1A (NaCl 250 mM, NP40 0,1%, Hepes 50mM pH= 7, MgCl₂ 1mM), conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (Halt Protease Inhibitor Single Use Cocktail, Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, EE.UU.). Las células fueron despegadas y los extractos celulares se recolectaron en tubos y se centrifugaron por 2 min a 13000 g, tomándose el sobrenadante. Las muestras conteniendo los extractos proteicos de la fracción soluble fueron guardadas a -80°C hasta su uso. Para el caso del extracto total, las células adheridas a la superficie de las placas se lavaron con PBS frío y se

incubaron durante 10 min con volúmenes adecuados de solución de siembra 2X (125mM Tris/HCl pH=6,8; 20% glicerol; 4% SDS; 0.004% Azul de bromofenol; 10% β mercaptoetanol), despegando luego por raspado y arrastre. Este lisado se calentó a 95°C durante 5 min y se conservó a -20°C hasta su uso. En el caso de los experimentos de degradación por la vía de *proteasomas*, las células fueron incubadas con el inhibidor de *proteasomas* N-CBZ-LEU-LEU-LEU-AL (CBZ) a una concentración de 40 μ M (Sigma Aldrich, EE.UU.), durante 2 horas previamente a la preparación de los extractos. Las muestras obtenidas con estos protocolos se utilizaron en los ensayos de Western blot (secciones 4.1.7, 4.2, 4.3).

3.9.2 Ensayos de co-IP: Preparación de extractos proteicos y condiciones de IP.

Para los experimentos de co-IP, células HEK293T adheridas a la superficie de las placas se lavaron con PBS frío y se incubaron durante 10 min en hielo con la solución RIPA (50mM Tris HCl [pH 7,4], 150mM NaCl, 1% deoxicolato, 1mM EDTA, 0,1% NP40) conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (Thermo Scientific Pierce Biotechnology, EE.UU.). Una fracción del extracto fue guardado a -80°C (fracción INPUT, extracto total antes del agregado del anticuerpo). Para los experimentos en que se inmunoprecipitó a HA-E6 de VPH, el extracto fue incubado con el anticuerpo anti HA, en rotación a 4°C durante 16 hs. Posteriormente, se incubó con Proteína A Sefarosa CL-4B 50% PBS (Sigma Aldrich, EE.UU.) durante 3 hs, en hielo con agitación. Luego, se lavó 5 veces con buffer RIPA durante 5 min en hielo y agitación y, posteriormente, se centrifugaron los extractos a 8000 rpm en microcentrífuga a 4°C, descartándose el sobrenadante. Finalmente, el sedimento, conteniendo la resina de Sefarosa con los inmunocomplejos precipitados, se resuspendió en solución de siembra 2X y se incubaron a 80°C durante 2 min. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su siembra.

Para el experimento en donde se inmunoprecipitó a cMyc-PAR 3, los extractos proteicos obtenidos en buffer RIPA, se incubaron durante 3 horas con la resina EZview red anti-c myc *affinity gel* (Sigma Aldrich, EE.UU.), en rotación a 4°C. Luego, se lavó 4 veces con buffer RIPA durante 5 min a 4°C y con agitación. Posteriormente, se centrifugaron los extractos a 8000 rpm en microcentrífuga a 4°C, descartándose el sobrenadante. Finalmente, el sedimento conteniendo la resina con los inmunocomplejos se resuspendió en solución de siembra 2X y se incubó a 80°C durante 2 min. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su siembra.

3.9.3 Preparación de extractos proteicos para ensayos de fraccionamiento celular.

El fraccionamiento celular de HeLa fue llevado a cabo con el equipo comercial *ProteoExtract Fractionation Kit* (Calbiochem, Alemania). Para dicho objetivo las células HeLa fueron tripsinizadas con cantidades adecuadas de Tripsina/EDTA por unos min hasta lograr el

desprendimiento de las células adheridas, tras lo cual se adicionó medio de cultivo, y se centrifugó a 900 g por 10 min. El *pellet* obtenido conteniendo las células fue resuspendido en 1 ml de buffer de lavado suplementado por el proveedor (Calbiochem, Alemania), e incubado en agitación a 4°C por 5 min. Posteriormente se centrifugó a 300 g durante 10 min, repitiéndose esta operación dos veces. El *pellet* obtenido fue resuspendido e incubado a 4°C durante 10 min en agitación, en 60 µl de buffer de extracción 1, que permite la extracción de las proteínas del citosol. Luego de dicha incubación los extractos fueron centrifugados a 1000g durante 10 min y a 4°C, obteniéndose un sobrenadante correspondiente a la fracción 1, la cual fue conservada a -20°C. Por otro lado, el *pellet* obtenido fue resuspendido en 60µl de buffer 2, incubado a 4°C por 30 min en agitación y centrifugado a 6000g. Así se obtuvo el sobrenadante correspondiente a la fracción 2, constituida por proteínas de las membranas celulares, el cual fue conservado a -20°C hasta su posterior utilización. Por otro lado, el *pellet* obtenido luego de la centrifugación, fue resuspendido en 50µl de buffer 3 suplementado con benzonasa (endonucleasa que forma parte del equipo comercial), tras lo cual fue incubado durante 10 min a 4°C en rotación. Luego de dicha incubación, se centrifugó el extracto a 6800g a 4°C y el sobrenadante de esta operación correspondió a la fracción 3 que contiene la fracción nuclear. Finalmente, el *pellet* restante fue resuspendido en 40µl de buffer 4, conteniendo la fracción de las proteínas presentes en el citoesqueleto.

Para corroborar la identidad de cada una de las fracciones celulares obtenidas se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti- α tubulina, anti-p84, anti-receptor de transferrina y anti-vimentina para las fracciones de citosol, nuclear, de membrana y de citoesqueleto, respectivamente. Las diluciones y origen de los anticuerpos se detallan en la Tabla 3.3.

3.9.4 Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas del extracto soluble se determinó por el método del ácido bicinonínico (Sigma Aldrich, EE.UU.). A 5 µl de muestra se agregaron 200 µl de reactivo conteniendo CuSO₄ y solución de ácido bicinonínico en una proporción 1:50 en volumen. Se incubó a 37°C durante 30 min. 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 (BSA, del inglés *bovine serum albumin*). En cada corrida se sembraron cantidades iguales de proteínas.

3.9.5 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 100°C en solución de siembra 6X [120 mM Tris-HCl (pH= 6,8), 0,5% (V/V) β-mercaptoetanol, 2% (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 25 mA. La concentración de acrilamida: bisacrilamida (30:0,8) utilizada en los geles de separación varió entre 7,5-15 % (P/V) según el tamaño de la proteína a separar.

3.9.6 Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (WB) e inmunodetecciones.

Se siguió la técnica descrita por Towbin y colaboradores (Towbin et al., 1979). Una vez finalizada la corrida electroforética, el gel de poliacrilamida y la membrana de nitrocelulosa fueron colocados en el *cassette* de transferencia. La electrotransferencia se realizó durante 4 h a 250 mA en una solución compuesta por 6 g/l de Tris-base; 28,8 g/l de glicina y 20% metanol. La correcta transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se determinó por tinción con el colorante Rojo *Ponceau*. La membrana fue preincubada en una solución conteniendo 5% de leche descremada en PBS, durante 1 h a 37°C con agitación, a excepción de aquellas membranas utilizadas para inmunodetectar PKC ζ/λ fosforilada (Thr410-403) (aPKC P)(sección 4.3) las cuales fueron incubadas en 5% leche descremada en Tampón salino Tris (TBS) [Tris base 2,42 g/l, NaCl 8 g/l. pH=7,2] con 0,1% Tween 20 (TBST). A continuación, se realizó una incubación a temperatura ambiente durante períodos variables de 2 a 16 hs, de acuerdo al experimento, con una dilución adecuada del anticuerpo primario en PBS/leche al 5%, a excepción del anticuerpo para aPKC P que se incubó en una dilución TBST/BSA al 5%. En esta Tesis fueron utilizados los anticuerpos que se señalan en la Tabla 3.3.

Finalizada la incubación con el correspondiente anticuerpo primario, se procedió al lavado de la membrana con 0,1% de Tween 20 en PBS (4 lavados de 5 min). Posteriormente, se realizó la incubación con una dilución adecuada del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Amersham GE Healthcare Life Sciences, Inglaterra, dilución 1/750) durante 1 h a temperatura ambiente, o anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Amersham GE Healthcare Life Sciences, Inglaterra dilución 1/750) según cada caso. Finalmente, después de 4 lavados con PBS/Tween 20 y uno con PBS, la membrana se incubó durante 5 min con la reacción de revelado para peroxidasa del equipo de quimioluminiscencia *SuperSignal West Pico Trial Kit* (Thermo Scientific, EE.UU.). Se realizó la exposición de la membrana a temperatura ambiente durante tiempos variables y la señal quimioluminescente se registró con placas radiográficas (GE Life Sciences, Inglaterra).

Nombre del Anticuerpo	Fabricante	Origen	Dilución
γ -tubulina (T6557)	Sigma Aldrich (EE.UU.)	ratón	1/5000
PAR 3 (07-330)	Millipore (EE.UU.)	conejo	1/500
PAR 3 (H70)	Santa Cruz (EE.UU.)	conejo	1/200
p53(DO-1)	Santa Cruz (EE.UU.)	ratón	1/1000
α tubulina(T6199)	Sigma Aldrich (EE.UU.)	ratón	1/5000
α actinina(H-2)	Santa Cruz (EE.UU.)	ratón	1/1000
vimentina(V-9)	Santa Cruz (EE.UU.)	ratón	1/1000
c Myc (9E10)	Santa Cruz (EE.UU.)	ratón	1/1000
rTf receptor de transferrina(3B82A1)	Santa Cruz (EE.UU.)	ratón	1/1000
p84(5E10)	Abcam (EE.UU.)	ratón	1/5000
β -galactosidasa (β -Gal)	Promega (EE.UU.)	ratón	1/1000
DLG1(2D11)	Santa Cruz (EE.UU.)	ratón	1/200
HA (12CA5)	Roche (Alemania)	ratón	1/200
PKC ζ	Sigma Aldrich (EE.UU.)	conejo	1/20000
aPKC P	Cell Signaling (EE.UU.)	conejo	1/1000

Tabla 3.3: Anticuerpos y las diluciones correspondientes utilizadas para ensayos de WB.

3.9.7 Síntesis de proteínas y ensayos de degradación *in vitro*.

Las proteínas fueron traducidas *in vitro* a partir de los siguientes vectores de expresión pcDNA3HA-E6 16, pcDNA3HA-E6 18, pK PAR 6 YFP, pKMyC PAR 3, pHACE PKC, pCDNA3 p53, utilizando el equipo que usa lisado de reticulocitos de conejo, siguiendo las especificaciones del fabricante (*TnT Coupled Reticulocyte Lysate Systems*, Promega, EE.UU.), en presencia de Cisteína [^{35}S] o Metionina [^{35}S] marcadas radioactivamente (Perkin Elmer, EE.UU.). Luego de corroborar la eficiencia de la expresión proteica *in vitro*, mediante corrida electroforética y posterior exposición en placas radiográficas, las proteínas sintetizadas fueron utilizadas para ensayos de degradación *in vitro*. Cantidades equivalentes de p53, PAR 3, PAR 6 o aPKC fueron incubadas a 30 °C, durante distintos periodos de tiempos (de 0 a 3 horas) en presencia o no de las distintas proteínas E6 de VPH (traducidas también *in vitro*), para evaluar degradación proteica como se detallará en la sección Resultados (secciones 4.1.7 y 4.3). La cantidad de proteína radiactiva residual, luego de la incubación, fue analizada en cada caso por técnicas de SDS-PAGE y autoradiografía.

3.10 Inmunofluorescencia (IF).

Las diferentes líneas celulares fueron cultivadas, según el experimento, sobre cubreobjetos desengrasados y esterilizados cubiertos con una fina capa de Matrigel (sistema enriquecido en colágeno [BD Biosciences, EE.UU.]) o sin dicho aditamento, en estufa gaseada a 37°C durante 24 horas. Luego, se procedió a transfectar las células, en aquellos casos en que la técnica lo requería. *A posteriori*, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con una solución al 2% de formaldehído en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Luego de varios lavados con PBS, las células fueron permeabilizadas con una solución de tritón 0,5% en PBS por 5 min a temperatura ambiente, tras lo cual se lavaron nuevamente tres veces con PBS. A continuación, se bloqueó con SFB al 10% en PBS para evitar reacciones inespecíficas, incubando 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas de interés fueron visualizadas usando los respectivos anticuerpos primarios como se detalla en la Tabla 3.4.

Nombre del Anticuerpo	Fabricante	Origen	Dilución
PAR 3 (07-330)	Millipore (EE.UU.)	conejo	1/100
PAR 3 (H70)	Santa Cruz (EE.UU.)	conejo	1/70
DLG1(2D11)	Santa Cruz (EE.UU.)	ratón	1/50
HA (12CA5)	Roche (Alemania)	ratón	1/50
ZO1 (H-300)	Santa Cruz (EE.UU.)	conejo	1/70
p53 (DO-1)	Santa Cruz (EE.UU.)	ratón	1/100
HScrib(C-20)	Santa Cruz (EE.UU.)	cabra	1/100

Tabla 3.4: Anticuerpos y las diluciones correspondientes utilizadas para los ensayos de IF.

El tiempo de incubación con el anticuerpo primario correspondiente fue de 1 h a 37°C. Luego de los lavados se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 488 dilución 1/1000 (para PAR 3 y ZO 1, Invitrogen, EE.UU.); anti-IgG de ratón conjugado con Cy3 1/1200 (para HA-E6, DLG1 y p53 Chemicon International, EE.UU.) o anti-IgG de cabra conjugado a Alexa Flúor 594 1/1000 (para Scribble, Invitrogen, EE.UU.). Las células fueron incubadas 30 minutos a 37°C y, luego de un lavado con PBS, se incubó con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) dilución 1/10000 (Santa Cruz, EE.UU.) para marcar los núcleos. A continuación, las células fueron lavadas varias veces con PBS, seguido de un último lavado con agua destilada. Finalmente, los cubreobjetos fueron montados sobre porta-objetos utilizando líquido de montaje *SlowFade Antifade Kit* (Molecular Probes, Invitrogen, EE.UU.). Los resultados fueron analizados utilizando microscopio de fluorescencia (Olympus BX50F4, Japón) y en algunos casos microscopio láser Confocal de Barrido invertido Nikon C1 (CLSM, Japón).

3.11 Técnica de Cambio en la concentración de Calcio.

Las diferentes líneas celulares adheridas a cubreobjetos (HaCaT y células HaCaT-HA E6 18) fueron crecidas en medio completo. Al día siguiente, las células fueron incubadas en medio DMEM sin suero y sin antibiótico durante 2 horas, luego fueron lavadas dos veces con PBS e incubadas durante 15 min con EGTA 2mM, con el objetivo de quelar el calcio extracelular y de esta manera disrumpir las UT. A continuación, las células fueron lavadas dos veces con PBS (tiempo cero) e incubadas con medio de cultivo completo, con el objetivo de restablecer las concentraciones normales de Calcio. La restauración de la polaridad celular se evaluó a distintos tiempos después del agregado de medio completo, mediante el análisis por IF de la expresión y localización de la proteína ZO1, marcador fidedigno de UT.

3.12 Silenciamiento de la expresión de PAR 3, E6, E6AP, DLG1 y Scribble a través de técnicas que utilizan ARN de interferencia.

Para este ensayo se utilizaron las líneas celulares HeLa y HaCaT dependiendo del experimento, las cuales fueron transfectadas con ARN pequeño interferente (siRNA, del inglés *Small interfering RNA*) para: PAR 3, DLG1, Scribble, E6AP (relevant Dharmacon Smart Pools, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), E6/E7 de VPH 18 (5'-CAUUUACCAGCCCGACGAG) o E6 de VPH 18 (5'-CUCUGUGUAUGGAGACACATT) (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), utilizando el método de *Lipofectamina 2000* (ver sección 3.6.3). Como control, se utilizó un siARN para luciferasa (Luci). Para la optimización se probaron distintas cantidades de siARN y distintos tiempos de incubación de las células con la mezcla de transfección. A las 72 hs post transfección, se prepararon extractos proteicos totales (ver secciones 4.1.7 y 4.3) o se realizó la técnica de fraccionamiento celular (ver sección 4.1.8) a partir de las células transfectadas con los distintos siRNA. Para los experimentos de IF (véase sección 3.9) las células fueron fijadas a 48 o 72 hs post transfección según el experimento (véase secciones 4.1.3 y 4.6).

3.13 Ensayos de interacción lípidos-proteínas.

Para los ensayos de interacción lípidos-proteínas, las células HEK293T (sobrexpresando PAR 3, MAGI o E6 y PAR 3 según cada caso (véase sección 4.5) adheridas a la superficie de las placas fueron lavadas en PBS frío e incubadas durante 10 min en hielo con solución de PBS conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (Halt Protease Inhibitor Single Use Cocktail, Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, EE.UU.), ortovanadato de sodio (Sigma Aldrich, EE.UU.) y fluoruro de sodio (Sigma Aldrich, EE.UU.). *A posteriori*, las células fueron despegadas, y los extractos celulares se recolectaron en tubos, tras lo cual fueron homogenizados con Homogeneizador (VWR Equipamiento de Laboratorio Modelo VDI 12, Italia) a potencia 1. Los

extractos fueron incubados o no (véase sección 4.5) con los péptidos sintéticos E6 18 (secuencia RLQRRETQV) o “Scramble” (Secuencia RRLQRTVEQR) durante una hora, a 4°C y con agitación. A continuación, las mezclas “extractos celulares-péptidos sintéticos” fueron diluidas en una solución 1% leche descremada en PBS, y fueron vertidas sobre membranas conteniendo lípidos inmovilizados (PIP Strips Echelon, EE.UU.). Dichas membranas habían sido previamente bloqueadas en la misma solución (PBS/leche) durante una hora. La incubación se llevó a cabo a 4°C con agitación durante 3 horas, en oscuridad (ya que las tiras conteniendo lípidos inmovilizados son sensibles a la luz), tras lo cual y luego de 2 lavados con PBS, las tiras fueron incubadas, durante 16 hs a 4°C y con agitación, con diluciones apropiadas de los anticuerpos primarios para inmunodetectar a PAR 3 o a MAGI-FLAG según el experimento. En este caso los anticuerpos y las respectivas diluciones que se utilizaron se detallan en la tabla 3.5:

Nombre del Anticuerpo	Fabricante	Origen	Dilución
PAR 3 (07-330)	Millipore (EE.UU.)	Conejo	1/100
FLAG (clon M2)	Sigma Aldrich (EE.UU.)	Ratón	1/100

Tabla 3.5: Anticuerpos y las diluciones correspondientes utilizadas en los ensayos de interacción lípidos-proteínas.

Finalizada la incubación con el correspondiente anticuerpo primario, se procedió al lavado de las membranas con PBS (4 lavados de 5 min). Posteriormente, se realizó la incubación con una dilución adecuada del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Amersham, GE Healthcare Life Sciences, Inglaterra; dilución 1/750) durante 1 h a temperatura ambiente o anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Amersham, GE Healthcare Life Sciences, Inglaterra; dilución 1/750), según cada caso. Finalmente, después de 4 lavados con PBS, la membrana se incubó durante 5 min con la reacción de revelado para peroxidasa del equipo de quimioluminiscencia *SuperSignal West Pico Trial Kit* (Thermo Scientific, EE.UU.). Se realizó la exposición de la membrana a temperatura ambiente durante tiempos variables y la señal quimioluminescente se registró con placas radiográficas (GE Life Sciences, Inglaterra).

3.14 Secuenciación de ADN.

Todas las construcciones derivadas de PCR fueron confirmadas por secuenciación del ADN. Los vectores de expresión correspondientes fueron purificados y enviados al servicio de secuenciación de la Universidad de Maine (EE.UU.).

3.15 Análisis estadístico.

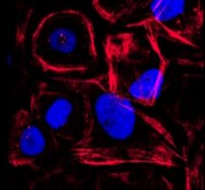
El análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de la cuantificación de la expresión de ZO1 en los bordes celulares en el experimento de cambios en la concentración de calcio descrito en la sección 4.4, fue realizado por el test de Mann Whitney. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado significativo.

3.16 Análisis digital de imágenes.

La cuantificación de los niveles de PAR 3 en las distintas fracciones en los ensayos de fraccionamiento celular (véase sección 4.1.8) se realizó con el programa *MacBiophotonics ImageJ 1.43 m software* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EE.UU.) con el cual se llevó a cabo la densitometría de las bandas obtenidas.

Las imágenes correspondientes a IF fueron digitalizadas con el fin de modificar la saturación y el gamma utilizando el programa *Nikon EZ-C1 3.70 Free Viewer*. Los cambios realizados se aplicaron por igual a todas las fotografías correspondientes al mismo ensayo. Los análisis de profundidad y barra de *pseudocolor* (véase sección 4.1.5) se llevaron a cabo en el programa "*EZ-C1Gold Version*" de Nikon. Las reconstrucciones tridimensionales (véase sección 4.1.5) se llevaron a cabo con el programa *NIS-Elements Advanced Research 4.00.03* de Nikon. La cuantificación de la localización de ZO1 en los experimentos de cambios en la concentración de Calcio (véase sección 4.4) se llevaron a cabo con el programa *MacBiophotonics ImageJ 1.43 m software* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EE.UU.).

Resultados



Capítulo 1

**Análisis de la interferencia de la proteína E6
de VPH sobre el complejo de polaridad celular
PAR.**

4.1 Estudio de la localización subcelular de PAR 3 en células que expresan la proteína E6 derivada de VPH 18.

De acuerdo a lo expresado en las secciones Introducción y Objetivos, nos abocamos a analizar la interferencia de E6 con componentes del complejo PAR, y la consecuencia de esto sobre el mantenimiento de la polaridad celular. Para ello, planteamos estudiar en primera instancia, los probables cambios en la expresión de la proteína PAR 3, componente de las UT, en presencia de las proteínas E6 de VPH, y ver si estas alteraciones son responsables de cambios en la polaridad celular. Si bien se ha identificado la interacción de E6 con otros componentes de tales uniones, como las proteínas PATJ (perteneciente al complejo Crumbs) y MAGI1 (Storrs and Silverstein, 2007; Kranjec and Banks, 2011), hasta el momento no se ha analizado la funcionalidad del complejo PAR en el contexto de una infección por VPH. Es importante destacar, además, que se ha reportado que la proteína E7 de RhPV (la cual presenta homología con E6 de VPH, ya que posee el sitio PBM [ver sección 1.3.5.2 I]) es capaz de interactuar y degradar a PAR 3 (Tomaic et al., 2008). Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado si esta actividad es compartida por la proteína E6 de VPH. Teniendo en cuenta lo expuesto, decidimos focalizar el análisis de la interferencia de E6 sobre PAR 3, la que como se señaló en las secciones 1.4.1.2 y 1.4.2, es una proteína clave en la organización de las UT y de la polaridad celular.

4.1.1 Clonado y expresión de las proteínas E6 derivadas de VPH.

Para iniciar el análisis mencionado, las secuencias codificantes de las proteínas E6 derivadas de distintos tipos de VPH (11, bajo riesgo; y 16 y 18, alto riesgo) se clonaron en un vector de expresión de células animales (pCDNA3, Invitrogene, EE.UU.), el cual permite obtener las proteínas fusionadas al epítoto HA (Figura 4.1). Dicha fusión permitió corroborar mediante técnicas de inmunodetección la expresión de E6 con un anticuerpo contra HA. Esto último considerando que los anticuerpos específicos para cada una de las proteínas virales, disponibles en el mercado, no permitían su eficiente detección al momento de llevar a cabo estos estudios.

Para dichos clonados se utilizaron cebadores que contienen en su secuencia sitios de corte para las enzimas de restricción *Bam*H1 (en el cebador sentido) y *Eco*R1 (cebador antisentido), que están también presentes en el sitio de múltiple clonado del vector pCDNA3 (sección 3.4.7). De esta manera, se favoreció el clonado direccional y, además, se tuvo en cuenta el marco de lectura de HA (los cebadores se describen en la sección 3.4.7). La identidad de los

constructos fue corroborada por técnicas de biología molecular con cortes con enzimas de restricción y por secuenciación.

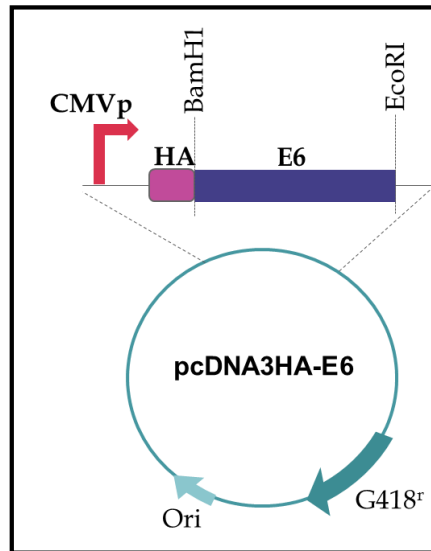


Figura 4.1: Vector de expresión para HA-E6. Representación esquemática del vector de expresión para las proteínas E6 fusionadas a HA. Se indica la región codificante para E6, el promotor para expresión en células eucariotas (CMVp) y el epítipo HA. Además, se muestran las regiones importantes para la replicación en *E. coli* (Ori), así como la resistencia al antibiótico G418, que se utilizó para la generación de líneas celulares estables. Se indica también la localización de los sitios para las enzimas de restricción *Bam*H1 y *Eco*R1, utilizadas para el clonado de las distintas secuencias.

A continuación los vectores obtenidos se transfectaron en células HaCaT para corroborar la eficiente expresión de las proteínas de interés. Las células se fijaron y la expresión de E6 se detectó por IF usando anti-HA, como anticuerpo primario, comprobándose que los constructos permitieron una expresión eficiente (Figura 4.2). Para el caso de E6 18 y de la proteína E6 derivada de VPH 16 (E6 16), se observó una localización predominantemente nuclear (Figura 4.2). Sin embargo, para E6 derivada de VPH 11 (E6 11) la localización de la proteína resultó ser preferentemente citoplasmática, como fuera descrito por otros autores (Guccione et al., 2004; Mesplede et al., 2012).

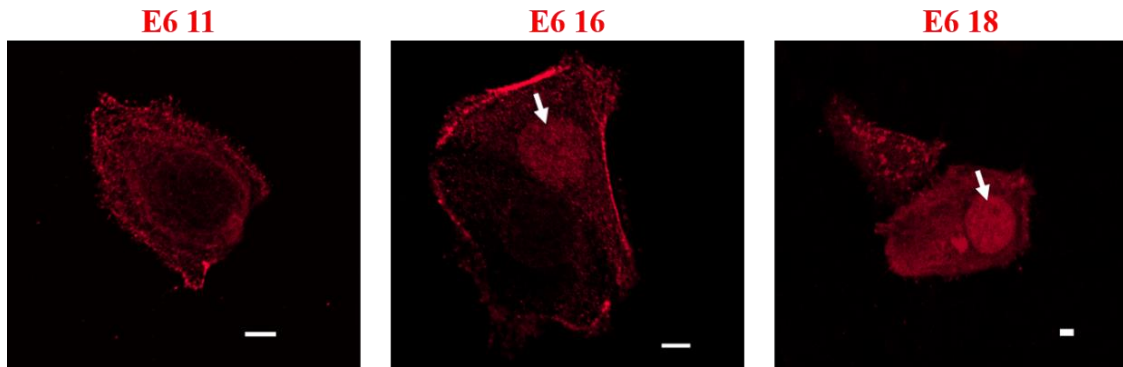


Figura 4.2: Expresión de HA-E6 en células epiteliales. Las secuencias codificando para las proteínas E6 derivadas de diferentes tipos de VPH (11, bajo riesgo; 16 y 18, alto riesgo) se clonaron fusionadas al epítotope HA. Los constructos se introdujeron de manera transitoria en las células HaCaT, el patrón de expresión de E6 fue analizado por IF usando anticuerpo secundario conjugado con Cy3 (rojo). Las flechas blancas señalan la localización de E6 en el núcleo en el caso de proteínas E6 derivadas de VPH de alto riesgo oncogénico. Barra de tamaño 5 μ m.

A *posteriori*, la funcionalidad de las proteínas expresadas fue corroborada analizando su capacidad para estimular o no la degradación del blanco celular DLG1 que, como se describió en la sección 1.3.5.2 II, es un blanco conteniendo dominios PDZ cuya degradación es estimulada ante la presencia de E6 de alto riesgo (Gardiol et al., 1999). Para ello se co-transfectó el vector pCDNA3HA-DLG1 que codifica para la proteína DLG1 fusionada al epítotope HA, y los diferentes constructos de E6, en la línea celular HEK293T, según se indica en la Figura 4.3. Como control de la expresión de HA-DLG1 en células que no expresan E6, se transfectaron a las células con el vector vacío (pCDNA3); también se corroboró la especificidad del anticuerpo anti HA incluyendo células sin transfectar. Como se observa en la Figura 4.3, las células que expresan E6 18 y E6 16 mostraron niveles más bajos de DLG1 respecto al control (células transfectadas con pCDNA3), y a las células que expresan E6 11. En las células sin transfectar no se observa la expresión de HA-DLG1, corroborándose de esta manera, la especificidad de las bandas obtenidas. Estas observaciones indicaron que las oncoproteínas E6 obtenidas fueron capaces de estimular la degradación de DLG1 (Gardiol et al., 1999), y por lo tanto, conservan la habilidad de estimular la degradación de sus blancos celulares.

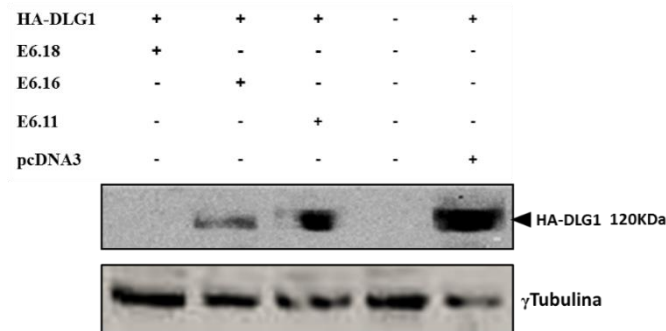


Figura 4.3: Las proteínas E6 16 y E6 18 estimulan la degradación de DLG1. Células HEK293T fueron co-transfectadas con vectores que codifican las proteínas E6 derivadas de distintos tipos virales o con el vector vacío (pcDNA3), en conjunto con el vector codificando para HA-DLG1, según se indica en la parte superior de la Figura. Para la inmunodetección del nivel de expresión de HA-DLG1 se utilizó un anticuerpo anti HA. Los niveles de γ -Tubulina se muestran como control de siembra de cantidades equivalentes de proteínas en todos los casos. Como control de la especificidad del anticuerpo se muestra la calle correspondiente a células no transfectadas con HA-DLG1.

4.1.2 Análisis de la expresión de PAR 3 en células epiteliales.

Posteriormente, una vez corroborada la funcionalidad de los vectores desarrollados, se iniciaron una serie de estudios para investigar el efecto de E6 sobre PAR 3. Para comenzar, se analizó la expresión de PAR 3 por técnicas de IF en células epiteliales (células blanco de VPH); para ello, se utilizaron las líneas celulares HaCaT, Caco 2 y HEK293T. Como puede observarse en la Figura 4.4 panel superior, PAR 3 se encuentra localizada preferentemente en las uniones celulares en las células epiteliales analizadas, en concordancia con lo reportado por otros autores (Joberty et al., 2000; Ebnet et al., 2001; Gopalakrishnan et al., 2007). Sin embargo, al estudiar la localización de PAR 3 en líneas derivadas de carcinomas de cuello de útero que expresan E6 18 (HeLa) o E6 16 (CaSKi) de manera constitutiva, se observó una disminución de la expresión de PAR 3 a nivel de los bordes celulares y regiones de contacto célula-célula (Figura 4.4 panel inferior). Es importante destacar que en la línea HeLa, PAR 3 se expresa también en el núcleo, lo que no se observó en las otras líneas analizadas (Figura 4.4). Estos resultados demuestran que en células transformadas por VPH, donde se expresan las oncoproteínas virales, PAR 3 presenta una localización alterada con una disminución en las uniones intercelulares.

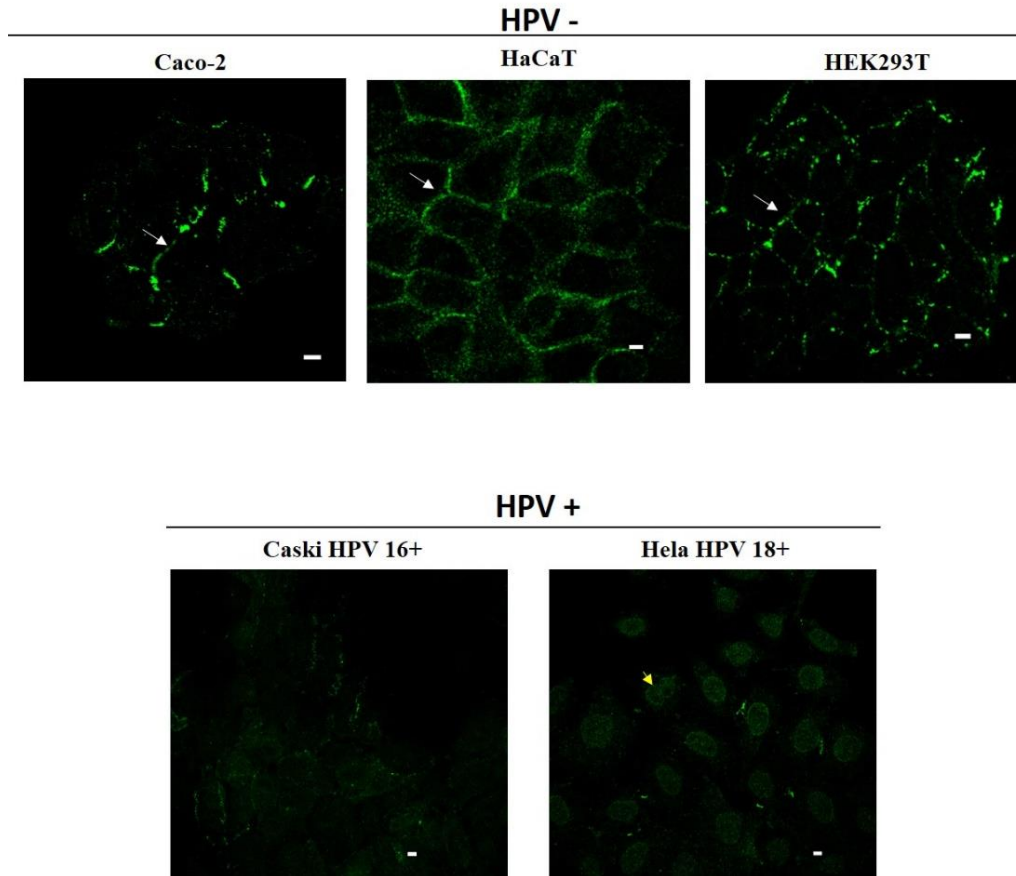


Figura 4.4: Análisis de la expresión de PAR 3 en líneas celulares epiteliales por IF. Las células HaCaT, HEK293T, Caco 2 (VPH-); HeLa (VPH 18+) y CaSKi (VPH 16+) fueron fijadas y analizadas para la expresión endógena de PAR 3 por IF, utilizando un anticuerpo anti-PAR 3 producido en conejo, y revelando con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, conjugado con Alexa 488(verde). Las flechas blancas señalan localización de PAR 3 en los bordes celulares. La flecha amarilla señala la localización nuclear de PAR 3 en células HeLa. Barra de tamaño 5 μ m.

4.1.3 La expresión de E6 18 induce una alteración de la localización subcelular de PAR 3.

A partir de los resultados expuestos anteriormente se decidió analizar si las alteraciones en la localización de PAR 3 en células VPH+ se deben específicamente a la expresión de E6. En primera instancia se focalizaron los estudios en el efecto de E6 18 sobre PAR 3, ya que: *i)* se había observado la interacción E6 18-PAR 3 *in vitro* (Tomaic et al., 2008), *ii)* VPH 18 resultó el tipo de VPH más agresivo en modelos de transformación *in vitro*, utilizando células en cultivo (Lace et al., 2009), y *iii)* varios reportes indicaron un comportamiento clínico más agresivo y con peor pronóstico para tumores VPH 18-positivos, con respecto a VPH 16 (Walker et al., 1989; Zhang et al., 1995).

Para este objetivo, se utilizó la línea celular HaCaT ya que había sido demostrado, por otros autores, que constituye un modelo apropiado para el análisis de la formación de las UT

(Aono and Hirai, 2008). Entonces, células HaCaT fueron transfectadas con los plásmidos codificando para HA-E6 18 o HA-E6 11 de manera transitoria. Como se observa en la Figura 4.5 PAR 3 adquiere una distribución difusa a lo largo del citoplasma y núcleo, en aquellas células que expresan HA-E6 18. Este efecto no se observa en células transfectadas con HA-E6 11 (que carece del PBM), donde PAR 3 se localiza preferentemente en los bordes celulares, como ocurre en células HaCaT sin transfectar (Figura 4.4). De esta manera, se pudo inferir que la proteína E6 18 tendría la capacidad de alterar la localización de PAR 3 en células epiteliales.

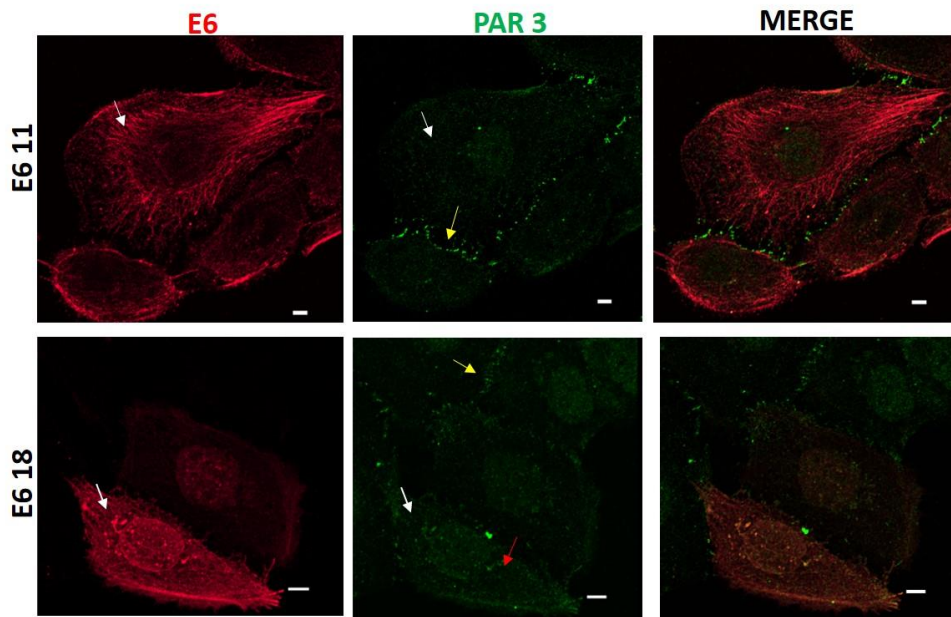


Figura 4.5: Efecto de la proteína E6 de VPH sobre la distribución de PAR 3 en células epiteliales. Las células HaCaT transfectadas con los vectores de expresión para HA-E6 11 o HA-E6 18 fueron fijadas y analizadas para la expresión endógena de PAR 3 por IF, utilizando un anticuerpo anti-PAR 3 producido en conejo y revelando con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, conjugado con Alexa 488 (verde). La expresión HA-E6 11 o HA-E6 18 fue corroborada por IF usando anticuerpo anti-HA (producido en ratón) y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Cy3 (rojo). Las flechas blancas indican las células que expresan E6 de bajo o alto riesgo, las flechas amarillas indican localización de PAR 3 en los bordes celulares y las rojas en el citoplasma. Barra de tamaño 5 μ m.

A *posteriori*, con el fin de abordar los estudios en un contexto más fisiológico, se generaron clones de células HaCaT expresando establemente las proteínas E6 11 y E6 18. La selección positiva de los mismos se efectuó con el antibiótico G418 (cuya resistencia se encuentra codificada en el vector de expresión pcDNA3 donde fueron clonadas las secuencias de E6, Figura 4.1) y su identidad se corroboró por detección de transcritos y expresión proteica, por RT-PCR e IF respectivamente. Como se observa en la Figura 4.6, E6 18 presentó una localización nuclear y perinuclear mientras que E6 11 mostró una expresión principalmente citoplasmática, lo que concuerda con lo reportado por diferentes autores (Guccione et al., 2004; Mesplede et al., 2012). Corroborada la expresión de E6 en las distintas líneas celulares estables,

se procedió a analizar por IF la distribución de PAR 3. Tanto en células HaCaT, utilizadas como control, como en células expresando E6 11 se observó la expresión de PAR 3 en los bordes celulares, en regiones de contacto célula-célula (Figura 4.6). Sin embargo, en células que expresaban E6 18, esta localización se vio alterada encontrándose una distribución nuclear y citoplasmática (Figura 4.6). Así, en concordancia con los experimentos de expresión transitoria de E6 (Figura 4.5), se pudo demostrar que E6 18 altera la localización de PAR 3, con probables cambios funcionales.

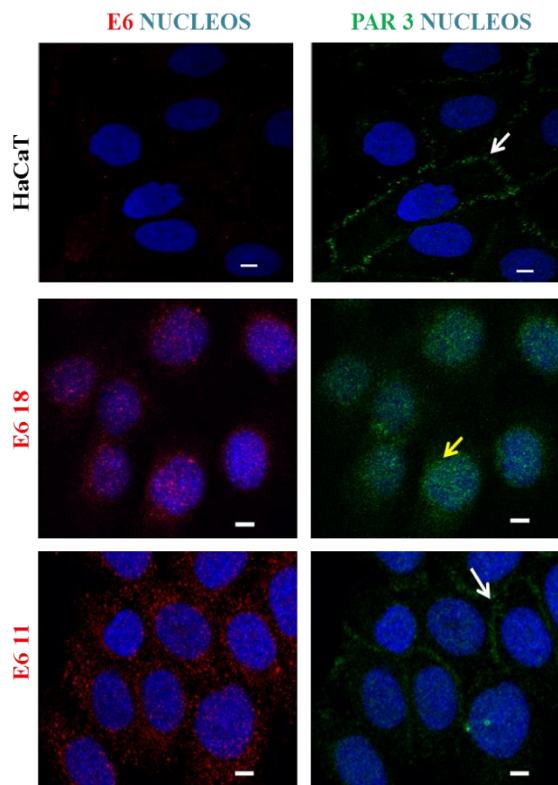


Figura 4.6: La expresión de la oncoproteína E6 18 está asociada con la alteración de la localización celular de PAR 3. Células HaCaT (control) o aquellas que expresan establemente HA-E6 11 o HA-E6 18(rojo), fueron fijadas y analizadas para la expresión endógena de PAR 3 (verde) por IF. Pueden apreciarse cambios en la localización de PAR 3 en células que expresan establemente E6 de alto riesgo (flecha amarilla), comparando con las células control (HaCaT) o aquellas que expresan E6 11, en donde PAR-3 localiza preferentemente en los bordes celulares (flecha blanca). En azul se observan los núcleos por tinción con el colorante fluorescente azul DAPI. Barra de tamaño 5 μ m.

Para profundizar el estudio del efecto de E6 18 sobre la localización de PAR 3, fue utilizada la técnica de ARN de interferencia (siRNA) para silenciar la expresión de E6 18 en la línea celular HeLa la cual, como se mencionó anteriormente, expresa dicha proteína constitutivamente. Como control positivo del silenciamiento de E6, se analizó por IF el incremento en la expresión del supresor de tumores p53, principal blanco de E6 como fuera detallado en la sección 1.3.5.1 (Scheffner et al., 1993). Como se observa en la Figura 4.7, en aquellas células transfectadas durante 48 hs con siRNA E6 o con siRNA E6/E7 se distingue un

aumento en los niveles de p53, la cual está localizada principalmente en el núcleo. Así se demostró, como fuera reportado por otros autores, el silenciamiento efectivo de E6 (Scheffner et al., 1993; Kranjec and Banks, 2011). En este experimento se silenció la expresión tanto de E6 como de E6/E7, ya que ha sido demostrado que al silenciar a E6 y E7 en conjunto, la ablación de E6 es más eficiente y, por lo tanto, la recuperación de p53 es más acentuada, como se observa en la Figura 4.7 (Kranjec and Banks, 2011). Como control negativo de silenciamiento, se utilizaron células HeLa silenciadas para Luci, ya que dicha proteína no se encuentra codificada en el genoma celular. En Figura 4.7 además, se aprecia un patrón difuso de PAR 3 en las células control, donde la marca se localiza principalmente en núcleo y citoplasma, con una leve expresión a nivel de los bordes celulares. Sin embargo, en aquellas células en donde se silenció la expresión de E6 18 (células p53+), se observó un incremento en la localización citoplasmática de PAR 3, con un enriquecimiento de dicha proteína en las uniones celulares. Este resultado concordó con lo mostrado para algunas de las líneas celulares epiteliales analizadas anteriormente (Figura 4.4), y como fuera reportado por otros autores (Joberty et al., 2000; Ebnet et al., 2001). De esta manera, los resultados de este experimento corroboran los datos anteriores acerca del efecto de E6 18 sobre la localización de PAR 3. Además, al demostrarse que la ablación de la proteína viral restaura la expresión de PAR 3 en los bordes celulares en células HeLa, se podría sugerir que la distribución diferencial de PAR 3 en estas células (Figura 4.4) se debería a la expresión de E6 18 en dicha línea tumoral.

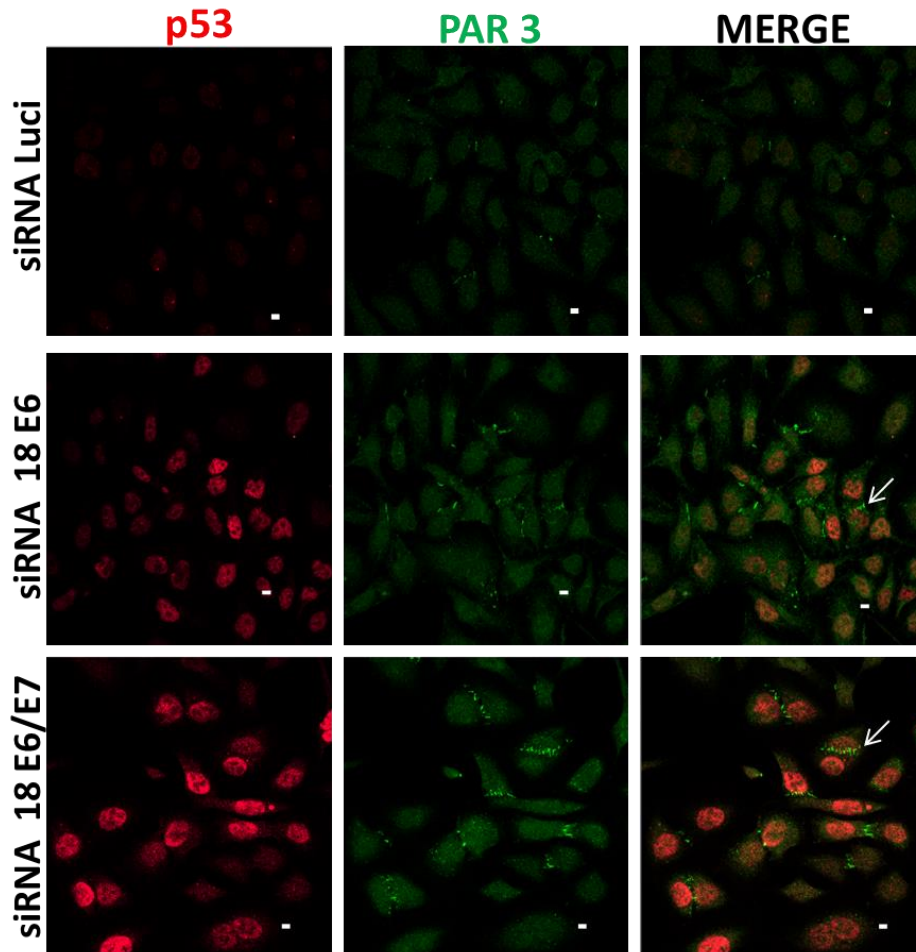


Figura 4.7. El silenciamiento de E6 18 en células HeLa restaura la expresión de PAR 3 en las uniones celulares. Células HeLa fueron transfectadas con: siRNA VPH 18 E6/E7, siRNA E6 18 o siRNA Lucif durante 48 hs. Posteriormente, fueron fijadas y analizadas para la expresión endógena de PAR 3 por IF, utilizando un anticuerpo anti-PAR 3 producido en conejo y revelando con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 488 (verde). La expresión de p53 (control de silenciamiento) fue corroborada por IF usando anticuerpo anti-p53 (producido en ratón) y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Cy3 (rojo). Las flechas blancas indican localización de PAR 3 en los bordes celulares en aquellas células p53+. Barra de tamaño 5 μm.

A continuación, se evaluó si la localización nuclear de PAR 3 era específica, de manera de descartar que los hallazgos descritos no eran un artefacto de la técnica o se deban a inespecificidad del anticuerpo utilizado. Para esto, se llevaron a cabo experimentos de silenciamiento de PAR 3, transfectando células HeLa con siRNA PAR 3 (Dharmacon pool) o siRNA Lucif, como control. Al cabo de 72hs, las células fueron fijadas y se analizó la expresión de PAR 3 por IF. Como se puede apreciar en la Figura 4.8, en aquellas células tratadas con siRNA PAR 3 se pudo observar una marcada disminución de sus niveles y, específicamente, de su expresión a nivel nuclear, comparando con las células control (siRNA Lucif). Por lo tanto, este resultado corrobora que la redistribución de PAR 3 hacia el núcleo en presencia de E6 18 es específica, y que no es un artefacto de los experimentos (Figura 4.8).

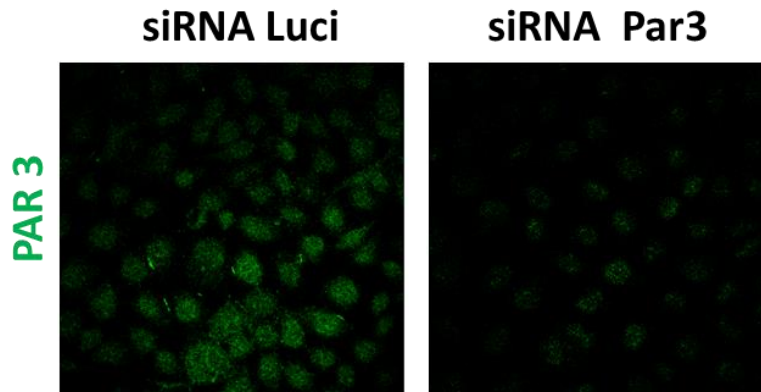


Figura 4.8: El silenciamiento de la expresión de PAR 3 corrobora su localización nuclear en células HeLa. Células HeLa fueron transfectadas con: siRNA PAR 3 o siRNA Luci durante 72 hs, posteriormente fueron fijadas y analizadas para la expresión endógena de PAR 3 por IF, utilizando un anticuerpo anti-PAR 3 producido en conejo y revelando con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 488 (verde). Nótese la disminución de la marca nuclear de PAR 3 en las células silenciadas, lo que indica que la marca era específica.

Resumiendo, los datos presentados hasta el momento sugieren que la proteína E6 18 altera la localización subcelular de PAR 3, desde los bordes celulares hacia núcleo y citoplasma, lo que podría derivar en alteraciones en sus funciones celulares. Es importante destacar que las alteraciones mencionadas de PAR 3 no se observaron en células que expresan proteínas E6 derivadas de VPH de bajo riesgo, que carecen del sitio de interacción con dominios PDZ. En este sentido, restaba analizar a este punto la real contribución del sitio PBM de E6 18 en la alteración de la localización de PAR 3.

4.1.4 Importancia de la interacción E6-PDZ en los cambios de localización de PAR 3.

De lo expuesto se desprendía la necesidad de corroborar si el efecto observado en la localización de PAR 3, en células que expresaban E6 18, dependía del PBM presente en E6 18 y ausente en E6 11. Lo último considerando que PAR 3 presenta 3 dominios PDZ, los cuales podrían potencialmente interaccionar con el sitio PBM de E6 18. Para dicho objetivo se construyó, mediante mutagénesis sitio dirigida, una mutante de E6 18 en el PBM ubicado en la región C-terminal, la que se denominó E6 18mut (el cebador antisentido utilizado para la generación de la mutante se encuentra detallado en la sección 3.4.7). El ADN codificando para dicha mutante fue secuenciado, pudiéndose corroborar los cambios nucleotídicos introducidos, y fue clonado en el vector de expresión como proteína de fusión a HA como se describió en 4.1.2. En dicha mutante se sustituyeron los aminoácidos carboxilo terminal Treonina (T) y Valina (V), conservados entre las proteínas E6 de VPH de alto riesgo, y fundamentales para la interacción con los dominios PDZ tipo I (Figura 4.9) y sección 1.3.5.1. Estos residuos forman los puentes de

hidrógeno con aminoácidos del bolsillo hidrofóbico que se encuentra entre las hélices β A y B del motivo PDZ (Doyle et al., 1996), y su sustitución por Aspartato (D) y Alanina (A) reducen notablemente dicha interacción (Thomas and Banks, 2005).

• HPV-18 E6	QRRR ETQV
• HPV-18 E6 Mut	QRRR EDQA
• <i>Motivo consenso de unión a PDZ</i>	XTXV S L

Figura 4.9: Secuencia C terminal de la proteína E6 18 y E6 18mut utilizadas en este estudio. La secuencia consenso del PBM de E6 18 está resaltada en azul. Los cambios aminoacídicos introducidos en la mutante E6 18mut están señalados en rojo.

Luego de corroborar la expresión de E6 18mut por técnicas de IF (Figura 4.10), se evaluó el efecto de la misma sobre la localización de PAR 3. Para ello, y para comparar los distintos efectos, se transfectaron de manera transitoria los vectores de expresión de E6 18 y E6 18mut en la línea celular HaCaT. Como se puede observar en la Figura 4.10 y se describió en la sección anterior, la localización de PAR 3 se encuentra alterada, adquiriendo una distribución a lo largo del citoplasma y en el núcleo celular, en aquellas células que expresaban E6 18 (observar magnificación de líneas punteadas). Este efecto no se evidenció ante la expresión de E6 18mut, donde PAR 3 se expresó especialmente en los bordes celulares (Figura 4.10) de la misma manera que ocurría en la línea celular HaCaT (Figura 4.4, panel superior). Esto sugiere que la mutación en el sitio de unión a PDZ revierte la interferencia de E6 18 sobre la expresión de PAR 3.

Para corroborar estos resultados se decidió desarrollar una línea celular expresando establemente E6 18mut y, analizar en ella la expresión de PAR 3. Sin embargo y, tras varios intentos, no fue posible obtener dicha línea.

El conjunto de datos obtenidos indicarían que las alteraciones observadas en la expresión de PAR 3 en presencia de E6 18, fundamentalmente su disminución en los bordes celulares, dependería de la interacción de la proteína viral con proteínas PDZ.

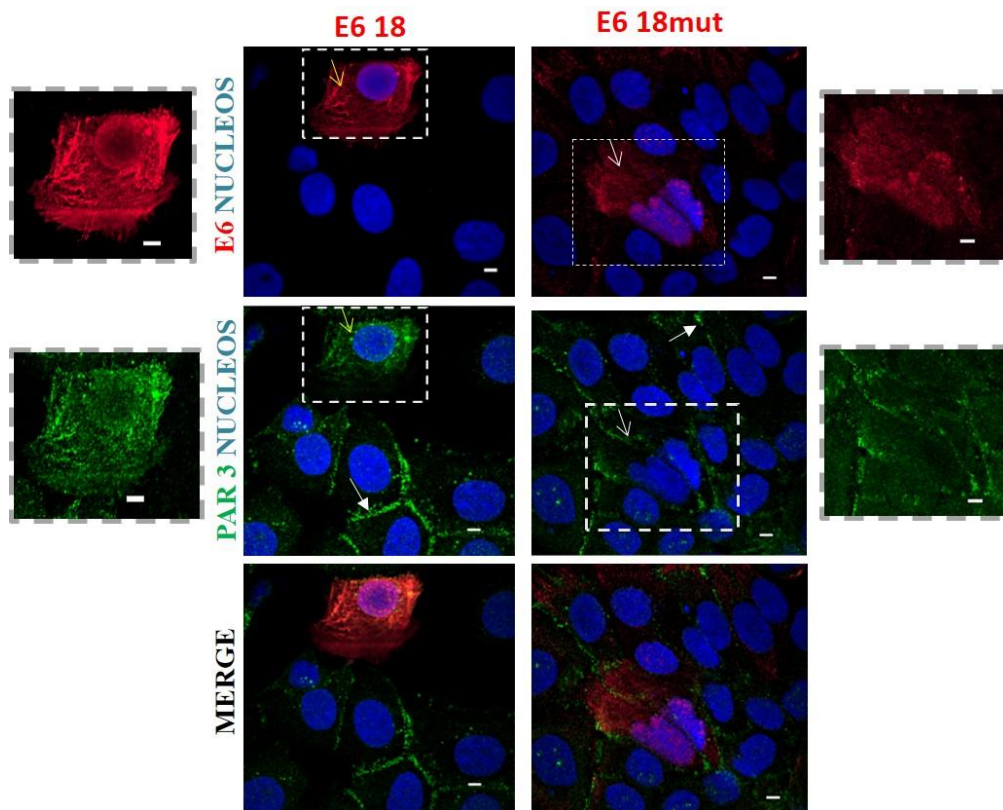


Figura 4.10: La alteración en la localización de PAR 3 mediada por E6 18 depende del dominio de interacción con PDZ. Células HaCaT transfectadas con vectores de expresión para E6 18 o E6 18mut fueron fijadas y analizadas para la expresión endógena de PAR 3 por IF, utilizando un anticuerpo anti-PAR 3 producido en conejo y revelando con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 488 (verde). La expresión de HA-E6 18 o su mutante fue corroborada por IF usando anticuerpo anti-HA (producido en ratón) y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Cy3 (rojo). Las flechas blancas señalan la expresión de PAR 3 en los bordes celulares en células que expresan E6 18mut o en células sin transfectar, y las amarillas la redistribución de PAR 3 en aquellas células que expresan E6 18. Como se puede observar en la Figura los cambios en la localización de PAR 3 sólo se distinguen en aquellas células que expresan E6 18. Las magnificaciones corresponden a la zona delimitada por las líneas punteadas. En azul se observan los núcleos por tinción con el colorante fluorescente azul DAPI. Barra de tamaño 5 μ m.

4.1.5 Análisis de la interferencia de E6 de VPH sobre la expresión de la proteína PAR 3 utilizando la metodología de cultivos histotípicos.

4.1.5 A Optimización de Cultivos usando el Sistema Matrigel.

Para poder analizar detalladamente el efecto de E6 sobre la polaridad celular *in vitro*, se optimizaron sistemas de cultivos de tipo histotípico. Estos cultivos mimetizan el microambiente celular, y constituyen modelos en los cuales se puede analizar más eficientemente los cambios en la expresión de las proteínas que conforman las UT (Debnath et al., 2003). Para dicha optimización se utilizó el Sistema comercial Matrigel enriquecido en colágeno (BD Biosciences). La elección de este sistema se basó en que la polaridad celular se inicia cuando las células toman contacto con la matriz extracelular, específicamente, a partir de la interacción de las células con

colágeno, que se encuentra presente en altas concentraciones en Matrigel (Martin-Belmonte and Mostov, 2007).

Los cultivos histotípicos se llevaron a cabo utilizando células HaCaT, que poseen la capacidad de polarizar *in vitro*, cultivadas sobre cubreobjetos recubiertos con una capa delgada de Matrigel durante distintos períodos de tiempos (72 y 96 hs). Para corroborar si las células se encontraban polarizadas se tomaron imágenes en distintos planos a lo largo del eje Z (*z stack*), evaluando la distribución de marcadores cuya localización a lo largo de dicho eje era conocida. Para este fin, se aplicó microscopía confocal de barrido utilizando el microscopio láser Confocal de Barrido invertido Nikon C1 (CLSM, Japón). Las imágenes se tomaron a partir de células cultivadas sobre Matrigel, así como también a partir de células cultivadas sin Matrigel, como control. El primer marcador de polaridad que se decidió utilizar fue el biosensor fluorescente PH PLC-GFP (ver Tabla 3.1), el cual une con gran afinidad a PI(4,5)P2 (Martin-Belmonte and Mostov, 2007). Este marcador, sensor fidedigno de PI(4,5)P2, presenta en células polarizadas una localización netamente apical, evidenciando la presencia de PI(4,5)P2 en esa región celular (ver sección 1.4.2)(Martin-Belmonte and Mostov, 2007). Para esto, células HaCaT crecidas o no sobre Matrigel, se transfectaron con el vector que expresa PH PLC-GFP y se analizó su localización por microscopía de fluorescencia (Figura 4.11). Es importante destacar que durante la optimización, las células fueron cultivadas sobre Matrigel durante distintos periodos de tiempo, resultando ser la mejor condición una incubación previa de 72 hs. La incubación durante tiempos mayores (92 hs) implicó una confluencia celular tal que no permitió la transfección eficiente del biosensor. En la sección XY se pudo observar, en ambas condiciones de cultivo, que el biosensor estaba distribuido principalmente en los bordes celulares (Figura 4.11). En relación al eje *apicobasal*, para las células cultivadas sin Matrigel se observó una distribución difusa a lo largo de dicho eje. Sin embargo, las células cultivadas en el sistema de polarización *in vitro* mostraron un patrón apical del biosensor (Figura 4.11 panel inferior). Por lo tanto, los resultados obtenidos demostraron una alta eficiencia de la técnica.

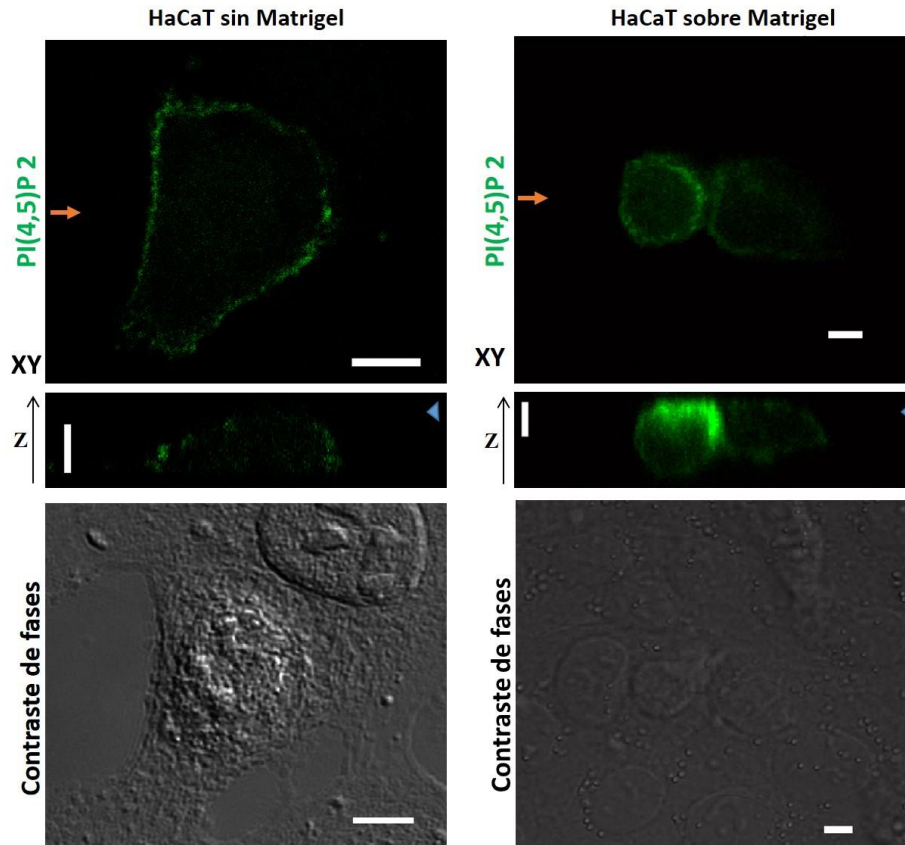


Figura 4.11: Optimización de cultivo histotípico. Marcador PI(4,5)P2. Células HaCaT crecidas sobre Matrigel o no durante 72 hs, fueron transfectadas con el biosensor para PI(4,5)P2, PHPLC GFP (verde); posteriormente, fueron fijadas y analizadas. En el panel de abajo se presenta la sección X-Z tomada desde la posición señalada con flecha naranja en la sección XY. Puede apreciarse que en el caso de las células crecidas sobre Matrigel, el patrón de PI(4,5)P2 en el eje Z es principalmente apical (flecha celeste). Por el contrario, en células que no fueron cultivadas sobre Matrigel el biosensor está localizado de manera difusa en el eje *apicobasal*. En el panel inferior se muestran las imágenes de las células tomadas en contraste de fases. Barra de tamaño 5 μ m.

Para confirmar la polarización, se utilizó un segundo marcador que consistió en la proteína de polaridad DLG1, para la cual había sido reportada una localización basolateral en células cultivadas sobre Matrigel (Awad et al., 2013). Así, se crecieron nuevamente células HaCaT como sin Matrigel durante 72 hs, como se indica en la Figura 4.12, y se observó la distribución subcelular de DLG1 por IF. Como puede apreciarse en el panel inferior (Figura 4.12), DLG1 se encuentra preferentemente en la región basal en el caso de las células crecidas sobre Matrigel a lo largo del eje Z. Por el contrario, en aquellas células que no fueron crecidas sobre Matrigel, la localización fue más difusa a lo largo de dicho eje (Figura 4.12 panel inferior). Es importante destacar que en la sección XY, en ambas condiciones, la proteína DLG1 se encuentra ubicada en los bordes celulares.

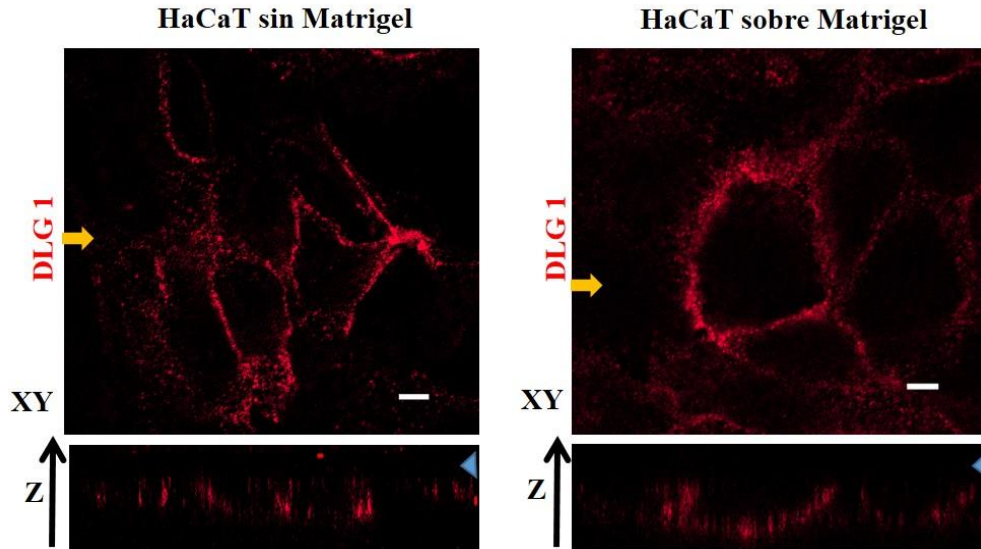


Figura 4.12: Optimización de cultivo histotípico. Marcador DLG1. Células HaCaT crecidas sobre Matrigel o no durante 72 hs fueron fijadas y analizadas para la expresión endógena de DLG1 (rojo) por IF. En cada caso se muestra una sección representativa del eje XY. En el panel de abajo se presenta la sección X-Z tomada desde la posición señalada en la sección XY con flecha amarilla. La flecha azul en los paneles inferiores indica localización apical. Puede apreciarse en el caso de las células cultivadas sobre Matrigel una localización basolateral de DLG1 a lo largo del eje Z. Barra de tamaño 5 μ m.

Una vez analizada la localización de DLG1 y PI(4,5)P2 en células cultivadas sobre Matrigel, con resultados satisfactorios, se analizó la localización de PAR 3, objeto de este estudio. De esta manera, se podría evaluar luego con mayor profundidad su deslocalización mediada por E6 18. Para dicho objetivo, células HaCaT fueron cultivadas con y sin Matrigel, y se analizó la localización de la proteína PAR 3 por técnicas de IF. Posteriormente, se tomaron imágenes de distintos planos a lo largo del eje Z con el microscopio confocal, a partir de los cuales se realizaron análisis de profundidad utilizando el programa *EZ-C1 Gold Version* de Nikon (Tokio, Japón). Los resultados se muestran en la Figura 4.13, en donde se presenta el análisis de localización de PAR 3 en células HaCaT junto con una barra de *pseudocolor*, como referencia de profundidad (*EZ-C1 Gold Version* de Nikon). Esta barra de *pseudocolor* es una proyección del eje Z, en donde se asignan colores según la profundidad a lo largo de dicho eje (localización apical corresponde al color blanco-rosa, localización basal del negro al celeste). Dicha barra es generada por el programa *EZ-C1 Gold Version* de Nikon. En la Figura 4.13 se observa una imagen representativa donde se le asignaron colores de acuerdo a la profundidad a la señal del fluoróforo Alexa 488 con el cual se inmunomarcó PAR 3. Teniendo en cuenta la barra indicadora, se concluyó que en el caso de aquellas células crecidas sobre Matrigel, PAR 3 está presente en promedio en la región apical (ya que se aprecia que la marca de PAR 3 en su mayoría presenta un *pseudocolor* amarillo o rosa). Lo expuesto anteriormente concuerda con reportes de otros autores, que indicaron que PAR 3 presenta una localización apical en células polarizadas, en

concordancia con su participación en la formación de las UT (Horikoshi et al., 2009). Por el contrario, en el caso de aquellas células crecidas sin Matrigel, se observó que la marcación para PAR 3 correspondía al *pseudocolor* amarillo-celeste indicando una localización más difusa a lo largo del eje Z (Figura 4.13, derecha).

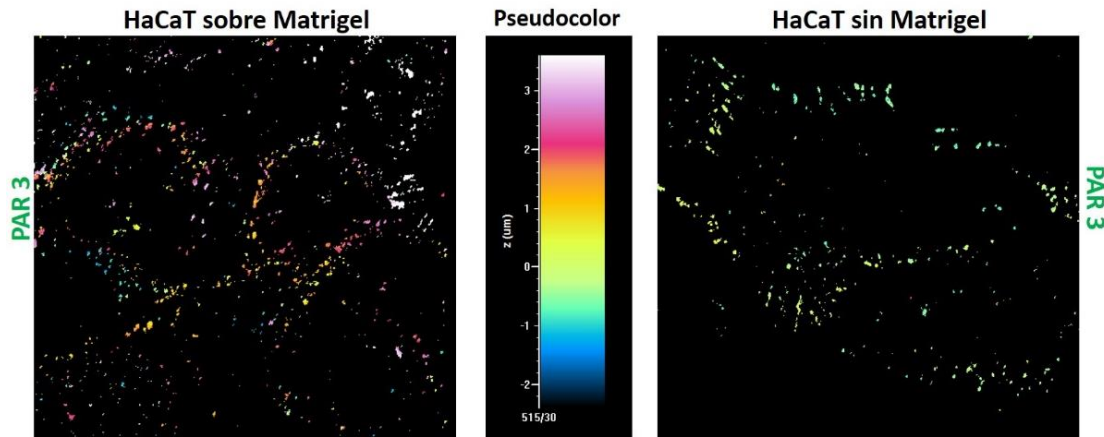


Figura 4.13: Optimización de cultivo histotípico. Marcador PAR 3 en análisis de profundidad en el eje Z. Células HaCaT crecidas sobre Matrigel o no durante 72 hs, fueron fijadas y analizadas para la expresión endógena de PAR 3 por IF. La intensidad de PAR 3 a lo largo del espesor celular (en el eje *apicobasal* o Z) está indicada en *pseudocolor* (generado a partir del programa *EZ-C1 Gold Version de Nikon*). El análisis se llevó a cabo con el programa “*EZ-C1 Gold versión*” (Nikon).

Para corroborar los resultados anteriores en cuanto a la distribución apropiada de los marcadores en células cultivadas sobre Matrigel, se muestran los resultados de IF para la localización de PAR 3. En la Figura 4.14, se puede apreciar que en aquellas células cultivadas sobre Matrigel, PAR 3 adquiere una localización apical correspondiente a una proteína de las UT, en concordancia con el análisis descripto precedentemente con las barras de *pseudocolor*. Por el contrario, en células crecidas sin Matrigel, la localización de PAR 3 es más difusa y en concordancia con los análisis de profundidad descriptos anteriormente. Es importante destacar que en la sección representativa XY, en ambas condiciones, la proteína se encuentra ubicada en los bordes celulares.

De esta manera, las distintas condiciones de cultivo (con o sin matriz extracelular) influyen en la distribución de los marcadores analizados PI(4,5)P2, DLG1 y PAR 3. Si bien en ambas condiciones se observa la localización de estos elementos en los bordes celulares en las secciones XY, la modalidad de cultivo histotípico favorece su correcta ubicación a lo largo del eje *apicobasal* de las células epiteliales.

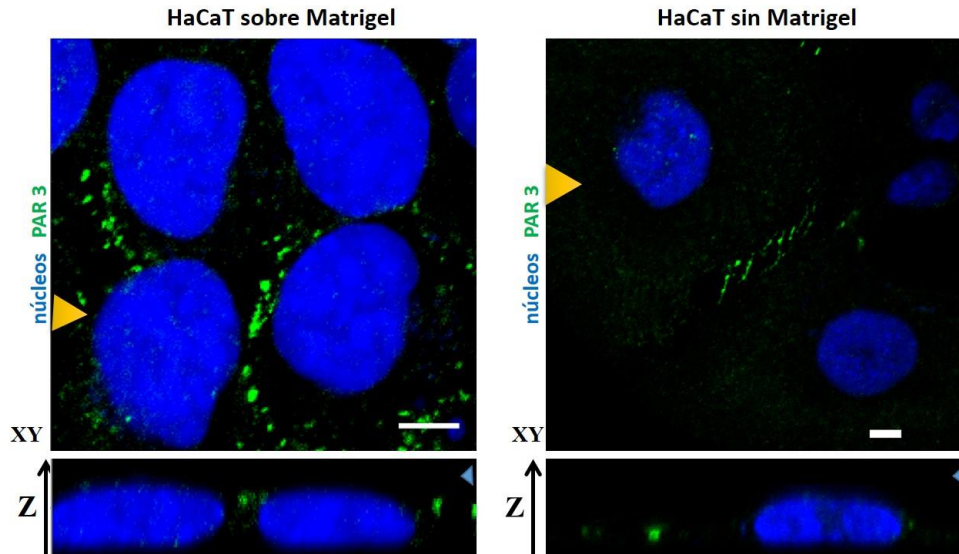


Figura 4.14: Optimización de cultivo histotípico. Marcador PAR 3. Células HaCaT crecidas sobre Matrigel o no durante 72 hs, fueron fijadas y analizadas para la expresión endógena de PAR 3 por IF, utilizando un anticuerpo anti-PAR 3 producido en conejo y revelando con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 488 (verde). En cada caso se muestra una sección representativa de plano XY. En el panel de abajo se presenta la sección X-Z tomada desde la posición señalada en la sección XY con flecha amarilla. La localización apical en el panel inferior se señala con una flecha azul. En azul se observan los núcleos por tinción con el colorante fluorescente azul DAPI. Barra de tamaño 5 μ m.

4.1.5 B Efecto de la proteína E6 sobre la expresión de PAR 3 en cultivos histotípicos.

Puesto que se observaron diferencias significativas en la localización de los marcadores utilizados para la optimización, se pudo concluir que los cultivos histotípicos constituyen una herramienta válida para analizar detalladamente los cambios en la localización de PAR 3 en presencia de E6 18. Esto último teniendo en cuenta que dichos cambios habían sido observados solo en cultivos en dos dimensiones, y considerando también la importancia de la ubicación de PAR 3, cuya función depende de una correcta localización en las UT. Así, se analizó la expresión de PAR 3 en células HaCaT (como control) y en los clones derivados que expresaban establemente E6 18 y E6 11, cultivados sobre Matrigel durante 72 hs. La expresión de PAR 3 (Figura 4.15 A panel inferior) se observó en la región apical de las células HaCaT, tal como fuera reportado por otros autores, y como descrito en la optimización (Horikoshi et al., 2009) (Figuras 4.13, 4.14). El mismo patrón de expresión se observó en la sección XZ (panel inferior) en células que expresaban E6 11 establemente (Figura 4.15 B). También es importante destacar que según la imagen XY, PAR 3 está ubicada en los bordes celulares, como en células HaCaT, mientras que en las que expresaban E6 18, se observó una marcada redistribución hacia el citoplasma y núcleo (Figura 4.15 B). Para las células E6 18 positivas, no se observó una neta localización apical de PAR 3 (sección XZ), ya que dicha proteína no adquirió una localización definida (Figura 4.15 B). Este resultado indicaría E6 18 produce una alteración de la localización de PAR 3 en modelos

tridimensionales, en concordancia con lo observado en cultivos en dos dimensiones (Figura 4.4, 4.6 y 4.9). Asimismo, el efecto puede ser visualizado más claramente en reconstrucciones tridimensionales, generadas a partir de las imágenes obtenidas en los distintos planos a lo largo del eje *apicobasal* y utilizando el programa *NIS-Elements Advanced Research 4.00.03* de Nikon. Las reconstrucciones que se observan en la Figura 4.15C, muestran que en el caso de las células que expresan E6 18 (Figura 4.15C), la marca de PAR 3 está distribuida a lo largo de toda la célula y no en la región apical, como en el caso de las células que expresan E6 11, comprobándose el efecto de E6 18 sobre la distribución de PAR 3.

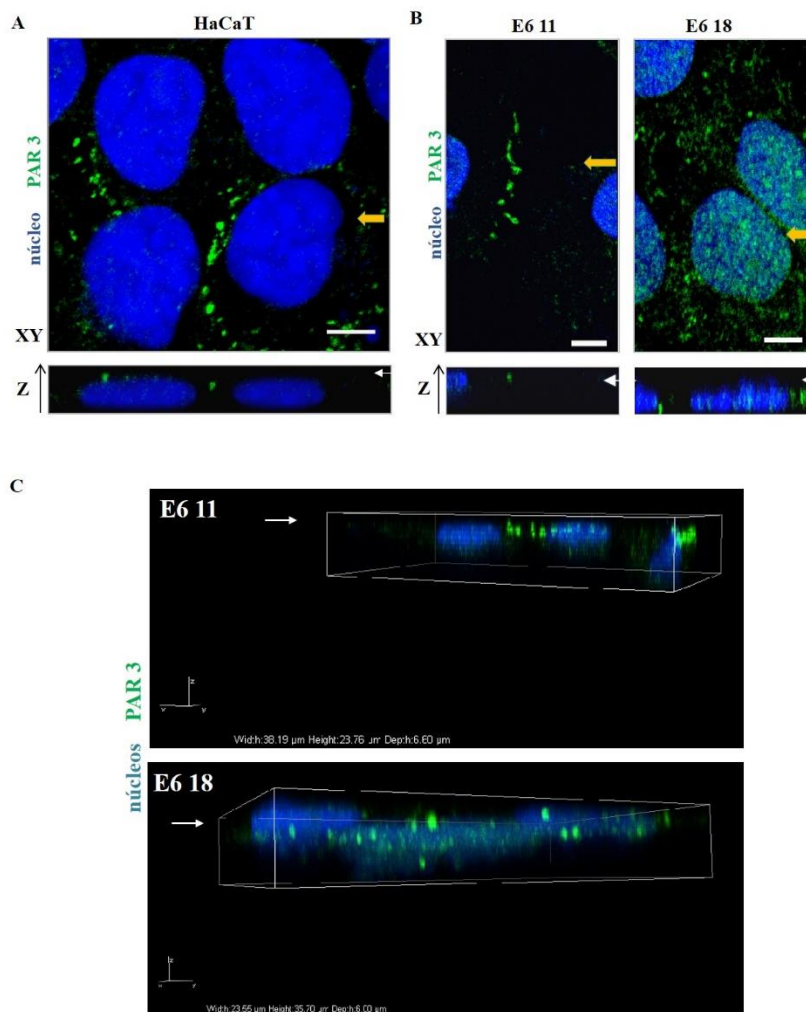


Figura 4.15: La expresión de E6 18 promueve la pérdida de la localización apical de la proteína PAR 3. Células HaCaT (A) y aquellas expresando establemente E6 11 o E6 18 (B), fueron cultivadas sobre Matrigel durante 72 hs, luego fueron fijadas y analizadas para la expresión endógena de PAR 3 (verde) por IF. En cada caso se muestra una sección representativa del eje XY. En el panel de abajo se presenta la sección X-Z tomada desde la posición señalada en la sección XY con flecha naranja. La localización apical en el panel inferior se señala con una flecha blanca. Barra de tamaño 5 μm. C) **Reconstrucción tridimensional.** Se realizaron los *z stack* y posteriormente, a partir de ellos, las reconstrucciones tridimensionales con el programa *NIS-Elements Advanced Research 4.00.03* de Nikon. Las flechas blancas indican localización apical. En azul se observan los núcleos por tinción con el colorante fluorescente azul DAPI.

4.1.6 Análisis de la interacción entre las proteínas PAR 3 y E6.

De acuerdo a los datos presentados hasta el momento se comprobó que la proteína E6 de VPH de alto riesgo altera la localización de la proteína PAR 3 tanto en cultivos en dos dimensiones, como en cultivos histotípicos. Sin embargo, restaba establecer si el efecto observado era ocasionado o no, por la unión entre ambas proteínas, ya sea directa o a través de la formación de complejos multiproteicos. También era probable que la deslocalización de PAR 3 se debiera a un efecto secundario, derivado de la interacción e interferencia de E6 con otras proteínas PDZ pertenecientes a otros complejos de polaridad celular, como DLG1 o Scribble (sección 1.4.1) (Gardiol et al., 1999; Nakagawa and Huibregtse, 2000). Esto último considerando que existe una interconexión entre las distintas proteínas de polaridad que regulan la ubicación subcelular particular de cada una de ellas y, especialmente la localización de PAR 3 (McCaffrey and Macara, 2009). A partir de lo expuesto, y teniendo en cuenta reportes anteriores que señalaron una débil interacción *in vitro* de E6 18 y PAR 3, se decidió esclarecer este punto de una manera más fisiológica (Tomaic et al., 2008). Para ello se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación para evaluar la formación o no del complejo PAR 3-E6 en extractos celulares. Se co-transfectaron el vector pKMycPAR 3 (para sobreexpresar cMyc-PAR 3) y los diferentes constructos de HA E6 en la línea celular HEK293T, posteriormente, se prepararon los extractos proteicos en buffer RIPA y se utilizó el anticuerpo anti-HA para la inmunoprecipitación de HA-E6. Los extractos se incubaron con Proteína A Sefarosa, y se lavó para eliminar las interacciones inespecíficas. Las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron de la resina y se resolvieron en SDS-PAGE. En todos los casos se separó una parte del extracto previo a la inmunoprecipitación, como control de expresión de PAR 3 en cada una de las muestras (INPUT).

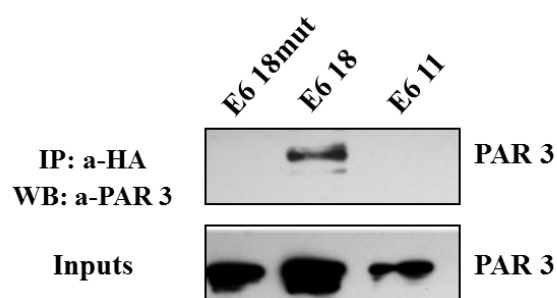


Figura 4.16: Análisis de la interacción de E6 con la proteína PAR 3. Técnica de inmunoprecipitación. Células HEK293T fueron co-transfectadas con vectores de expresión que codifican para las distintas proteínas HA-E6 y con el vector de expresión de PAR 3. La inmunoprecipitación se llevó a cabo con el anticuerpo anti-HA. La inmunodetección del nivel de expresión de PAR 3 se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PAR 3.

Los resultados que se muestran en la Figura 4.16, sugieren una interacción entre E6 18 y la proteína PAR 3 de manera PDZ-dependiente. Esto último considerando la ausencia de bandas específicas en el caso en que se expresaba E6 11 o E6 18mut. Sin embargo, con estos ensayos no se puede discernir si la interacción identificada se trata de una interacción directa entre ambas proteínas, o si se produce a través de la formación de complejos multiproteicos a partir de un *partner* común.

Para corroborar el resultado de la Figura 4.16 se realizó otro ensayo de inmunoprecipitación, utilizando en este caso la estrategia inversa. Para ello, se usaron resinas de agarosa conjugadas al anticuerpo anti-Myc para poder precipitar a cMyc-PAR 3. Para este objetivo, se co-transfectaron el vector pKMycPAR 3 y los diferentes constructos de HA-E6 en la línea celular HEK293T. *A posteriori*, se prepararon los extractos proteicos en buffer RIPA tras lo cual se incubaron con las resinas de agarosa y se eluyeron las proteínas inmunoprecipitadas (ver sección 3.9.2 de Materiales y Métodos). En todos los casos se separó una parte del extracto previo a la inmunoprecipitación, como control de expresión de PAR 3 y HA-E6 (INPUT). Como se aprecia en la Figura 4.17, se corroboró el resultado detallado en la Figura 4.16, ya que a partir de los inmunocomplejos analizados por WB se pudieron obtener bandas específicas cuando se expresaba E6 18 pero no para E6 18mut.

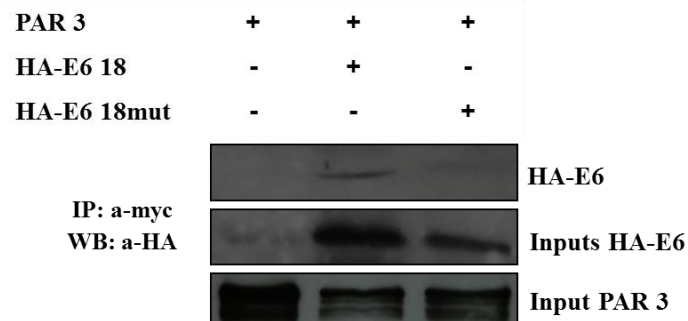


Figura 4.17: Análisis de la interacción de E6 con la proteína PAR 3. Técnica de inmunoprecipitación. Células HEK293T fueron co-transfectadas con vectores de expresión que codifican para las distintas proteínas HA-E6 y con el vector de expresión de cMyc-PAR 3. La inmunoprecipitación se llevó a cabo con el anticuerpo anti-myc. La inmunodetección del nivel de expresión de HA-E6 se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HA.

En conjunto y a partir de los dos experimentos de inmunoprecipitación, anteriormente expuestos, se puede concluir que existe una interacción entre E6 18 y PAR 3, la cual puede ser directa o mediada por otras proteínas, y que depende del PBM presente en E6 18. Dicha interacción podría ser la responsable de los cambios en la localización de PAR 3 en células expresando E6 18.

4.1.7 Estudio de los niveles de expresión de la proteína PAR 3 en células que expresan E6 18.

A partir de los resultados de la sección anterior se decidió analizar si la interacción PAR 3-E6 18 tiene como consecuencia la estimulación de la degradación de PAR 3, considerando lo que ocurre con muchos blancos de E6, como fuera detallado en 1.3.5.2 I (Pim et al., 2012). Con este propósito se realizaron, en primera instancia, ensayos de degradación *in vitro*. Para llevar a cabo estos experimentos, los vectores que contenían las secuencias que codifican para PAR 3, p53 y E6 18 fueron empleados para dirigir la síntesis *in vitro* de dichas proteínas, en un sistema de traducción comercial de reticulocitos de conejo (TnT Coupled Reticulocyte Lysate Systems, Promega, EE.UU.). La síntesis se realizó en presencia de Metionina ^{35}S o Cisteína ^{35}S , luego las proteínas marcadas radiactivamente se analizaron por SDS-PAGE y fueron expuestas a placas radiográficas para verificar la expresión proteica (Figura 4.18 A). Para corroborar la funcionalidad de la proteína E6 18 traducida *in vitro*, se llevó a cabo un ensayo de degradación *in vitro* incubando la proteína E6 18 junto con p53 (Figura 4.18 B). Esto último considerando que p53 es uno de los blancos más caracterizados de E6, tal como fue detallado en la sección Introducción 1.3.5.1. En la Figura 4.18 B se puede observar una marcada disminución en los niveles de p53 en los casos en donde se incubó en presencia de E6 18, comparado con los niveles de p53 en ausencia de la proteína viral. Por lo tanto, la proteína E6 18 sintetizada *in vitro* fue eficiente en la degradación de este blanco y, en consecuencia, fue utilizada para los ensayos ulteriores de degradación de PAR 3 *in vitro*, como se describe a continuación.

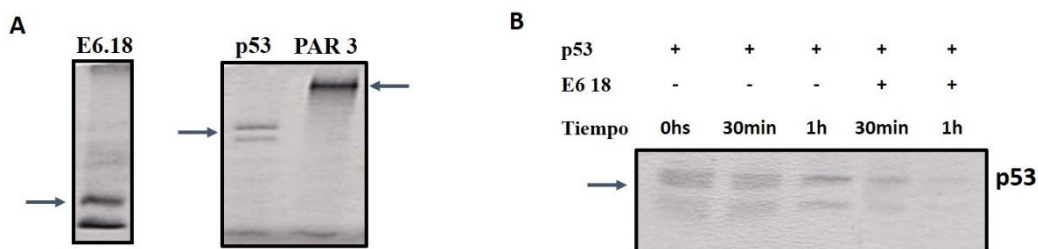


Figura 4.18: Síntesis de proteínas *in vitro*. Ensayos de degradación *in vitro* de p53. En A se muestra la traducción eficiente de PAR 3, p53 y E6 18. En B la proteína p53 traducida *in vitro* fue incubada durante distintos períodos de tiempo, sola o en presencia E6 18, como se indica. Posteriormente, los niveles de p53 residuales fueron analizados por SDS-PAGE y autoradiografía.

Una vez verificada la funcionalidad de E6 18, en cuanto a su capacidad de degradar a sus blancos celulares, se incubaron cantidades iguales de PAR 3 en presencia o no de la proteína E6 18 (Figura 4.19). Como se puede apreciar, a diferencia de lo obtenido para p53, no se observó una disminución significativa de los niveles de PAR 3 en presencia de E6 por periodos de

incubación de 1 hora, sin embargo sólo se pudo observar una leve disminución en sus niveles, cuando ambas proteínas se incubaron por periodos mayores de 3 horas (Figura 4.19).

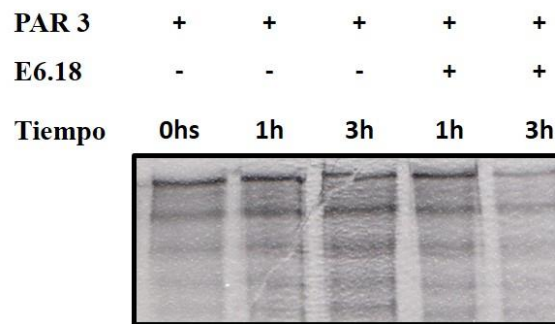


Figura 4.19: Ensayos de degradación *in vitro* de la proteína PAR 3. La proteína PAR 3 traducida *in vitro* y marcada radioactivamente fue incubada durante distintos tiempos, en presencia o no de E6 18. Posteriormente, se analizaron los niveles de PAR 3 residual por SDS-PAGE y autoradiografía.

Teniendo en cuenta que se comprobó una interacción *in vivo* entre PAR 3 y E6 18 (Figuras 4.16 y 4.17), se decidió analizar los niveles proteicos de PAR 3 *in vivo* en células que expresan E6. Es importante destacar que en modelos *in vivo*, el microambiente celular es distinto de los sistemas *in vitro*, lo que podría estimular o inhibir la degradación de los distintos blancos; por lo tanto, resultó fundamental analizar la probable degradación de PAR 3 en este sistema.

Para dicho objetivo se analizaron los niveles en sistemas de sobreexpresión en presencia o ausencia de E6 18, y del inhibidor de *proteasomas*, CBZ. De esta manera, se puede evaluar si los niveles de expresión de un marcador en particular son regulados por el mecanismo de degradación mediado vía *proteasomas*, como ocurre con algunos de los blancos de E6 (Gardioli et al., 1999; Thomas et al., 2008a). Sin embargo, antes de llevar a cabo los experimentos con el marcador PAR 3, se evaluó primero el sistema de estudio utilizando el blanco de E6 18, DLG1. Células HEK293T se cotransfectaron con los vectores codificando para HA-DLG1 y E6 18 o E6 18mut. Luego de 24 horas y, antes de la preparación de los extractos proteicos, las células se incubaron o no durante dos horas con el inhibidor CBZ. Como se muestra en la Figura 4.20, CBZ fue eficiente en la reconstitución de los niveles de DLG1 en células que expresaban E6 18. Esto permitió demostrar, una vez más, la degradación de este blanco por la vía dependiente de *proteasomas* y la validez del sistema de estudio. Es importante destacar que los niveles de DLG1 no sufrieron cambios en aquellas células que expresaban E6 18mut, incubadas con o sin CBZ. Esto permitió corroborar que los aminoácidos que habían sido sustituidos dentro del PBM de E6 18 en la mutante, son fundamentales para la degradación de los blancos celulares.

A *posteriori*, y una vez verificada la eficiencia del sistema de estudio, se co-transfectó el vector pKMyC PAR 3, los diferentes constructos de E6 y el vector β gal (como control interno de transfección) en la línea celular HEK293T. Como se muestra en la Figura 4.21 no se observaron cambios significativos en los niveles de PAR 3 en células que expresaban E6 18, con respecto a aquellas que expresaban E6 11 o la mutante de E6 18mut. Así, los datos obtenidos sugerían que la interacción entre E6 18 y PAR 3 no conlleva a la degradación proteolítica de PAR 3, como ocurre para otros blancos de E6 (sección 1.3.5.2).

Además, tampoco se observó un incremento de los niveles de PAR 3 en aquellas células tratadas con CBZ con respecto a las no tratadas, sugiriendo que los niveles de PAR 3 no son regulados fisiológicamente por la vía de *proteasomas*.

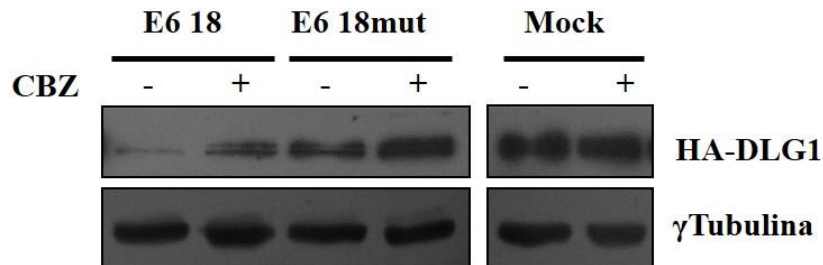


Figura 4.20: E6 18 estimula la degradación de DLG1 por el mecanismo de *proteasomas*. Células HEK293T fueron transfectadas con vectores codificando para HA-DLG1 (Gardiol et al., 1999) en ausencia (mock) o presencia de E6 18 o E6 18mut. Después de 24hs, las células se incubaron durante dos horas con o sin el inhibidor de *proteasomas* CBZ, como se indica en la Figura. Posteriormente, se prepararon los extractos proteicos y cantidades iguales de proteínas fueron separadas por SDS-PAGE. La inmunodetección del nivel de expresión de HA-DLG1 se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HA. γ -Tubulina se muestra como control de siembra de cantidades equivalentes de proteínas en todos los casos.

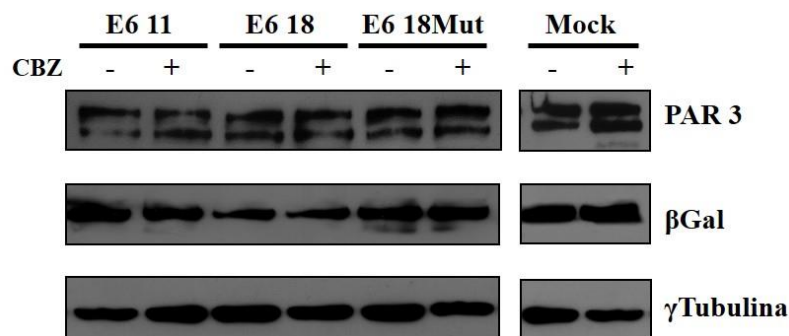


Figura 4.21: E6 18 no estimula la degradación PAR 3 por el mecanismo de *proteasomas*. Células HEK293T fueron cotransfectadas con vectores de expresión que codifican las distintas proteínas E6, con el vector de expresión pK Myc PAR 3 y el vector de expresión para β gal. Pevio a la preparación de los extractos, las células se incubaron o no con el inhibidor CBZ, según se indica. La inmunodetección del nivel de expresión de PAR 3 se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PAR 3. γ -Tubulina se muestra como control de siembra de cantidades equivalentes de proteínas en todos los casos. β gal se muestra como control de transfección.

A continuación, se analizaron los niveles proteicos endógenos de PAR 3 en células HeLa (E6 18-positivas) y HaCaT e incubándose o no con CBZ, previamente a la preparación de los extractos. En este caso, como se observa en la Figura 4.22, tampoco se observaron cambios significativos en los niveles de PAR 3, comparando entre células tratadas o no, en concordancia con lo observado en la Figura 4.21. En conjunto, estos resultados sugieren que los niveles de expresión de PAR 3 no son regulados por la vía proteolítica dependiente de *proteasomas* en presencia o ausencia de E6 18.

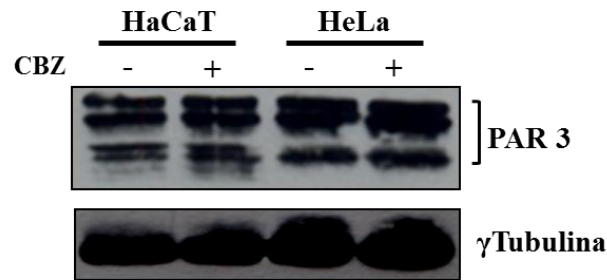


Figura 4.22: Los niveles de PAR 3 no son regulados por la vía proteolítica de *proteasomas*. Células HaCaT o HeLa fueron incubadas con o sin CBZ, previamente a la preparación de los extractos proteicos. La inmunodetección del nivel de expresión endógeno de PAR 3 se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PAR 3. γ -Tubulina se muestra como control de siembra de cantidades equivalentes de proteínas en todos los casos.

Para confirmar los resultados presentados anteriormente, se analizó si el silenciamiento de E6 18 en células HeLa podría afectar los niveles proteicos de PAR 3. Para ello, se transfectó a células HeLa con los silenciadores siRNA E6 18, siRNA E6AP o siRNA Luci (control). En este caso se silenció, además de E6 18, la expresión de E6AP, la cual es una ubiquitín ligasa asociada a E6 que está involucrada en la degradación de numerosos blancos de E6 (Scheffner et al., 1993). En la Figura 4.23, se observa un incremento en los niveles de p53 en aquellas células silenciadas para E6 18 o E6AP, comparando con aquellas células control (silenciadas para Luci), corroborándose la eficiente ablación de las respectivas proteínas. Asimismo, en concordancia con los resultados anteriores, no se observaron cambios en los niveles de PAR 3 en las células silenciadas para E6 18 o E6AP, indicando que E6 no estaría estimulando la degradación de la proteína PAR 3, y además, que PAR 3 no es degradada por un mecanismo que utilice a E6AP como ubiquitín ligasa.

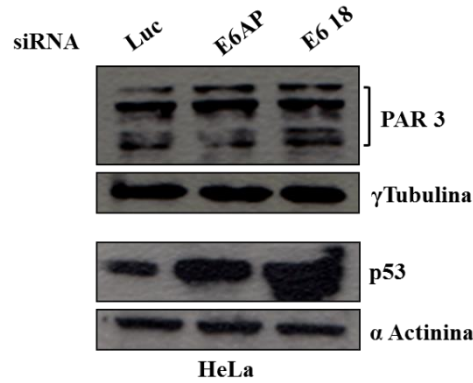


Figura 4.23: La expresión de E6 18 no afecta los niveles de PAR 3. Células HeLa fueron transfectadas con siRNA Luci, siRNA E6AP o siRNA E6 18. Después de 48 hs se prepararon los extractos y los niveles endógenos de PAR 3 fueron analizados por WB, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PAR 3. γ -Tubulina y α -actinina se muestran como controles de siembra de cantidades equivalentes de proteínas en todos los casos. Los niveles de p53 se analizaron como control de silenciamiento de E6 18 y E6AP.

De acuerdo a los datos que se presentaron hasta el momento la proteína E6 18 es capaz de alterar la localización subcelular de PAR 3, sin afectar significativamente los niveles proteicos totales.

4.1.8. Análisis de los niveles de PAR 3 en distintas fracciones celulares en presencia de E6 18.

A partir de los resultados anteriores, se decidió profundizar los estudios acerca de cómo E6 influye sobre la redistribución de la expresión de PAR 3 en las distintas fracciones proteicas celulares. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de fraccionamiento celular utilizando células HeLa transfectadas con siRNA E6 18 o siRNA Luci. Luego de 48 hs, las fracciones celulares de citoesqueleto, membrana, núcleo y citosol fueron obtenidas utilizando para tal fin un equipo comercial y siguiendo las instrucciones del fabricante (ProteoExtract Fractionation Kit, Calbiochem, Alemania). Nuevamente, para corroborar el silenciamiento de E6 18, se utilizó como marcador la proteína p53 la cual presentó altos niveles de expresión en el núcleo de las células tratadas con siRNA E6 18 (Figura 4.24). Los niveles de PAR 3 fueron comprobados por WB e inmunodetección. Los resultados se presentan en la Figura 4.24, en aquellas células silenciadas para E6 18, se observó un incremento de los niveles de PAR 3 en la fracción de membrana y una disminución en las fracciones nuclear y citoplasmática, comparando con las células control. En la fracción citoesquelética no se evidenció la presencia de PAR 3.

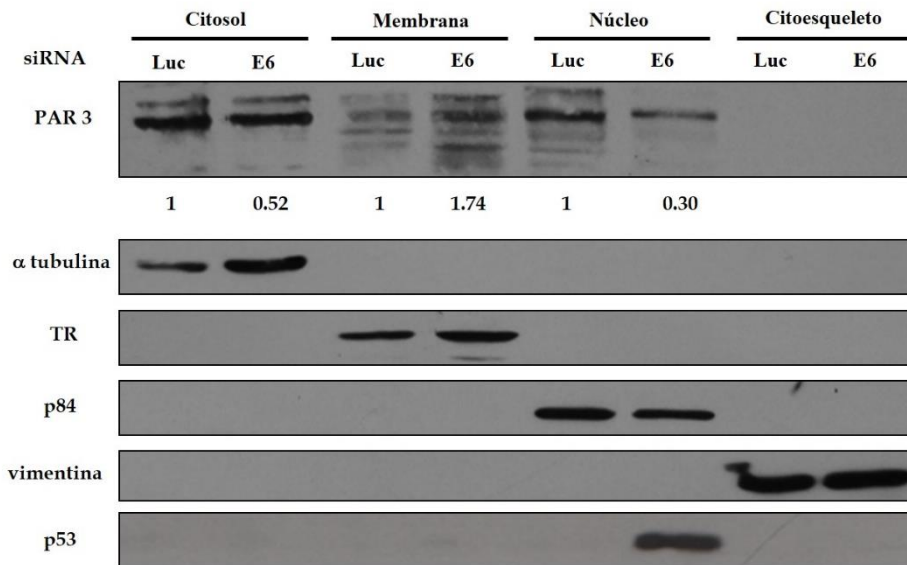


Figura 4.24: Redistribución subcelular de PAR 3 en células que expresan E6 18 mediante ensayos de fraccionamiento. Células HeLa fueron transfectadas con siRNA Luci o siRNA E6 18. Después de 48 hs los extractos proteicos obtenidos fueron separados en las fracciones: citosol, membrana, núcleo y citoesqueleto. La inmunodetección del nivel de expresión de PAR 3 y de los marcadores de las distintas fracciones se realizó utilizando los siguientes anticuerpos: PAR 3, α Tubulina (fracción citosólica), TR (fracción de membrana), p84 (fracción nuclear) y vimentina (fracción citoesqueleto). Como control de silenciamiento de la expresión de E6 se muestra el incremento de p53 en la fracción nuclear. Los números debajo de la inmunodetección de PAR 3 corresponden a las intensidades de las bandas de PAR 3 en células siRNA 18, con respecto a las células silenciadas para Luci (considerado como 1). La intensidad de cada banda fue normalizada con respecto a los controles de carga para la fracción subcelular correspondiente.

El resultado de este experimento indicó que E6 18 induce una redistribución de PAR 3 desde el borde celular al citoplasma y núcleo, con potenciales consecuencias sobre su actividad y función. Además, dicha observación coincidió con los resultados de IF presentados en la sección 4.1.3, en donde se describió que el silenciamiento de la expresión de E6 enriquecía la localización de PAR 3 en los bordes celulares (Figura 4.7).

Los cambios en la localización de PAR 3 pueden alterar su función (como detallado en la sección 1.4.1.3 para el caso de tumores de mama y queratoacantomas), y teniendo en cuenta que PAR 3 es un componente clave en la formación de las UT y de la polaridad celular, es probable que los hallazgos descriptos tengan relevancia durante la progresión maligna asociada a VPH. A partir de esto, se decidió analizar si proteínas E6 derivadas de otros VPH de alto riesgo ejercían el mismo efecto que E6 18.

4.2 Análisis de la interferencia de E616 sobre PAR 3.

Para analizar si el efecto de E6 18 sobre PAR 3 es un evento común para proteínas E6 derivadas de distintos tipos de VPH oncogénicos, se decidió analizar si E6 16 era capaz de alterar la localización de PAR 3 y/o estimular su degradación como ocurre con otros blancos (Pim et al.,

2012). Es importante destacar que si bien E6 16 y E6 18 presentan el sitio consenso de interacción con dominios PDZ, los aminoácidos que los constituyen son distintos (ETQL para E616 y ETQV para E6 18). Por lo tanto, los efectos sobre PAR 3 podrían ser diferentes, como ocurre para blancos de E6 con dominios PDZ, en donde el cambio de un solo aminoácido tiene como consecuencia distinta eficiencia en la degradación (Thomas et al., 2001; Kranjec and Banks, 2011).

Para este objetivo, se analizó la localización de PAR 3 en células HaCaT que expresan establemente E616, tanto en cultivos convencionales (Figura 4.25 A), como en cultivos histotípicos (Figura 4.25 B). En la Figura 4.25 se puede apreciar que en cultivos convencionales (A) aquellas células que expresaban establemente E6 16 presentaron una localización de PAR 3 citoplasmática, a diferencia de las células control en donde la marca de PAR 3 se ubica en bordes celulares. Por lo tanto, en este caso y al igual que para las células que expresaban E6 18 (Figura 4.15), hay una alteración en la localización de PAR 3. En la Figura 4.25 B se observa una inmunotinción para PAR 3 en cultivos histotípicos. En dicha Figura se puede observar la localización de PAR 3 en los bordes celulares en la sección XY y en la región apical en el eje Z para las células HaCaT. En contraste, aquellas células que expresaban E6 16 presentaron una localización de PAR 3 citoplasmática y nuclear en XY, acompañada de una disminución de la marca apical en el eje Z. Por lo tanto, en conjunto, tanto en el caso de cultivos convencionales como en cultivos histotípicos, se observó la deslocalización del marcador PAR 3 en células que expresaban E6 16, en concordancia con E6 18. Así, se demostró un efecto común de proteínas oncogénicas derivadas de distintos tipos de VPH. Esto sugiere mecanismos comunes de interferencia, aunque el efecto observado en el caso de E6 18 sobre la redistribución de PAR 3 fue mayor en todos los casos analizados.

Para corroborar este resultado se intentó llevar a cabo ensayos de silenciamiento de E6 16 en la línea celular CaSKi, la cual expresa E6 16 constitutivamente; sin embargo, tras numerosos intentos no fue posible la ablación de la expresión de E6 16 porque no funcionó correctamente el siRNA comercial correspondiente.

donde se puede apreciar que no hay cambios significativos en los niveles de PAR 3 en presencia de CBZ en ninguna de las líneas ensayadas. Esto indica que su expresión no sería regulada por el mecanismo de *proteasomas* en presencia o ausencia de E6 16. Este resultado sugiere que, como para E6 18, no hay una degradación proteolítica de PAR 3 en células expresando E6 16.

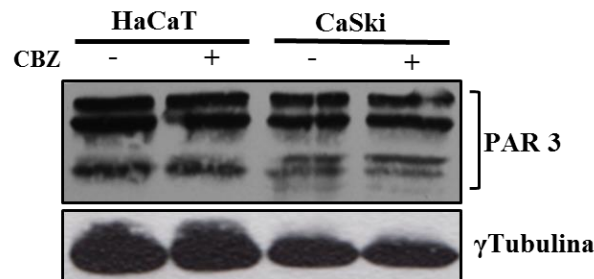


Figura 4.26: Los niveles de PAR 3 no son afectados por la presencia de E6 16 en ensayos *in vivo*. Extractos proteicos de células HaCaT o CaSki fueron incubados con o sin el inhibidor de *proteasomas* CBZ. La inmunodetección del nivel de expresión endógeno de PAR 3 se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PAR 3 de Millipore. γ -Tubulina se muestra como control de siembra de cantidades equivalentes de proteínas en todos los casos.

Para profundizar en el análisis acerca de la ausencia de degradación de PAR 3 por parte de E6 derivadas de VPH de alto riesgo oncogénico, se analizaron los niveles endógenos de PAR 3 en células HEK293T sobreexpresando distintas cantidades de E6 16 o E6 18, con el objetivo de correlacionar el efecto de ambas proteínas. En los ensayos de degradación *in vivo* descriptos en la sección 4.1.7 (Figura 4.21) se utilizó una concentración de vector pcDNA3HA-E6 18 de 1 μ g. Sin embargo, en este caso, se utilizaron distintas concentraciones de ambos vectores para evaluar si distintas cantidades de E6 16 o E6 18 podrían influir en los niveles de PAR 3, variando desde 0,5 a 4 μ g, como se indica en la Figura 4.27. A partir de esto, no se observaron cambios significativos en los niveles de PAR 3 en células que expresaban distintas cantidades de E6 16 o E6 18 cuando se compara con células que no expresan las proteínas virales (transfectadas con 1 μ g de pcDNA3) (Figura 4.27). Por lo tanto, y en conjunto con los resultados anteriores, se puede concluir que los niveles de PAR 3 no son afectados por la presencia de E6 16 ni de E6 18.

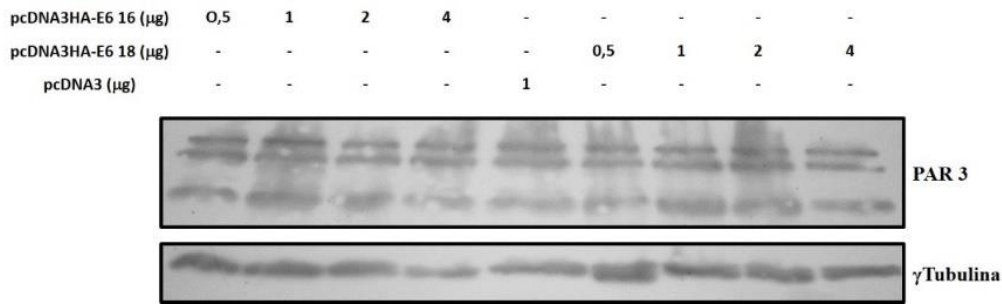


Figura 4.27: La expresión de E6 16 o de E6 18 no modifica los niveles de PAR 3. Células HEK293T fueron transfectadas con distintas cantidades (expresadas en µg) de los vectores que codifican las proteínas E6 16 o E6 18, o con el vector vacío pcDNA3, según se indica. La inmunodetección del nivel de expresión de PAR 3 endógeno se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PAR 3. γ -Tubulina se muestra como control de siembra de cantidades equivalentes de proteínas en todos los casos.

A partir del conjunto de resultados presentados hasta el momento, podría especularse la existencia de un mecanismo común que module la deslocalización de PAR 3 en células que expresan E6 16 y E6 18, sin cambios significativos de sus niveles. Resulta importante señalar en este punto que se llevaron a cabo ensayos de interacción *in vivo* entre PAR 3 y E6 16, no obteniéndose resultados positivos como para E6 18. Por lo tanto, el mecanismo de deslocalización de PAR 3 en el caso de E6 16 parecería ser indirecto y será discutido en detalle en la sección Discusión de la presente Tesis.

4.3 Análisis de la interferencia de E6 sobre otros componentes del complejo de polaridad PAR: aPKC y PAR 6.

Como fue detallado en la Introducción (sección 1.4.1) el complejo de polaridad PAR está compuesto por tres proteínas: PAR 3, PAR 6 y aPKC. Hasta el momento se ha analizado la interferencia de E6 sobre la localización y niveles de PAR 3, pero no ha sido estudiado aún que es lo que ocurre con los otros componentes del complejo en presencia de E6. Analizar la situación de los otros integrantes del complejo en células que expresan E6 de alto riesgo es de suma importancia, ya que los cambios que se observaron en la localización de PAR 3, podrían ser indirectos y debidos a alteraciones en otros componentes con los cuales PAR 3 interacciona.

PAR 6 es una proteína con muchas actividades en células epiteliales, entre ellas, es un adaptador clave para la funcionalidad del complejo PAR, ya que interacciona dinámicamente con los otros complejos de polaridad celular. Además, tal como se describió en la sección Introducción, PAR 6 puede activar a aPKC mediante unión directa, permitiendo de este modo que aPKC fosforile a PAR 3, proceso importante para el ensamblaje del dominio apical (McCaffrey and Macara, 2009). La proteína aPKC, por otro lado, controla la localización de los dominios apical y basolateral, siendo de suma importancia para la polaridad celular. Por ello,

resultaba interesante evaluar si existen alteraciones en los niveles o funcionalidad de los otros componentes del complejo PAR en presencia de E6 de VPH.

Teniendo en cuenta esta información se llevaron a cabo ensayos de traducción *in vitro*, para analizar los niveles de las dos proteínas en presencia de E6 16 y E6 18. Como fuera detallado en la sección 4.1.7, en primera instancia se tradujeron *in vitro* las proteínas aPKC y PAR 6 a partir de los plásmidos descritos en Materiales y Métodos (véase sección 3.1). En la Figura 4.28 A se muestra la síntesis eficiente de dichas proteínas, luego de ser analizada su expresión por SDS-PAGE y autorradiografía. A *posteriori*, se llevaron a cabo ensayos de degradación *in vitro* y, tal como fue descrito previamente para PAR 3, se enfrentaron cantidades iguales de PAR 6 o aPKC con las distintas proteínas E6. Posteriormente, dichos extractos fueron analizados por SDS-PAGE y revelados radiográficamente para evaluar la cantidad de proteína remanente. Como se puede observar en la Figura 4.28 B, no se produjeron cambios significativos en los niveles de estas proteínas al incubarlas con E6 16 o E6 18 durante los periodos de tiempo ensayados. Por lo tanto, por análisis *in vitro* se demostró que no había una degradación estimulada por E6 para estos dos componentes del complejo PAR. Dicha afirmación era de esperar para el caso de aPKC, ya que dicha proteína no contiene un sitio PDZ con el cual las distintas E6 pudieran interactuar. Sin embargo, no se podría descartar la existencia de una interacción indirecta mediada, por ejemplo, por PAR 3 y/o PAR 6, que pudiera activar de alguna manera su degradación. Por otro lado, PAR 6 presenta un motivo PDZ, con el cual las proteínas E6 de alto riesgo oncogénico podrían interactuar, no obstante, el presente resultado indicaría que esta proteína no sería degradada por E6 al menos *in vitro*.

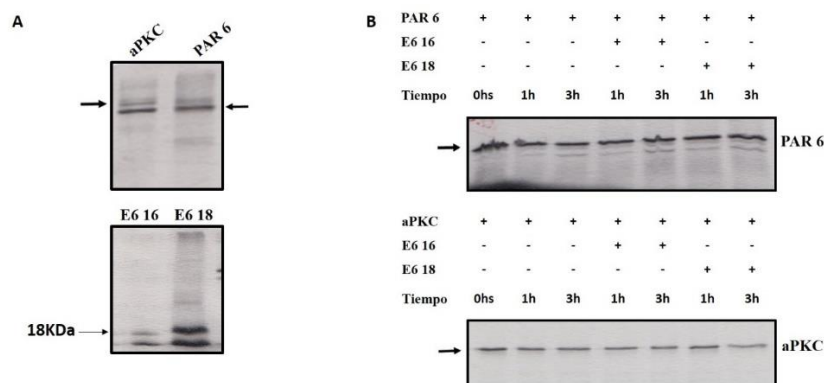


Figura 4.28: Síntesis de proteínas *in vitro*. Ensayos de degradación *in vitro* para PAR 6 y aPKC. En **A** se muestran la traducción eficiente de PAR 6, aPKC, E6 16 y E6 18. Se señalan con flechas las diferentes proteínas. **B** Las proteínas PAR 6 o aPKC traducidas *in vitro* fueron incubadas durante distintos periodos de tiempos con o sin E6 16 o 18 traducidas *in vitro* y marcadas radioactivamente, como se indica. Posteriormente, los niveles residuales de las proteínas se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía.

Teniendo en cuenta que en los experimentos precedentes no se observaron cambios en los niveles de aPKC *in vitro*, ante la presencia de E6, se analizaron *in vivo* los niveles proteicos de aPKC, tanto totales como de la fracción fosforilada en el sitio Thr410 (aPKC P, que representa aPKC activada). El análisis de la fosforilación de aPKC en este sitio es de suma importancia, ya que la fosforilación puede alterar su función y el patrón de interacción con otras proteínas de los complejos de polaridad celular (McCaffrey et al., 2012). Para estos experimentos se utilizaron las líneas celulares CaSKi (E6 16-positiva), HeLa (E6 18-positiva) y HaCaT (VPH negativa, control). Previamente a la preparación de los extractos proteicos, las células se incubaron con el inhibidor de *proteasomas* CBZ. Como puede observarse en la Figura 4.29 no se produjeron cambios en los niveles proteicos totales de aPKC, demostrándose que esta proteína no es regulada por la vía de *proteasomas*, en presencia o ausencia de E6. Sin embargo, es importante destacar que la fracción aPKC P sólo se observó en las células derivadas de tumores como CaSKi y HeLa, y no en células HaCaT, línea celular inmortalizada. Dichos hallazgos están en concordancia con reportes de otros autores que indican que aPKC se encuentra fosforilada durante los procesos carcinogénicos (Cohen et al., 2006). Por lo tanto, se pudo demostrar por primera vez que en líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales asociados a VPH, aPKC se encuentra fosforilada en el sitio Thr410, lo que podría tener consecuencias sobre las proteínas que conforman los otros complejos de polaridad celular.

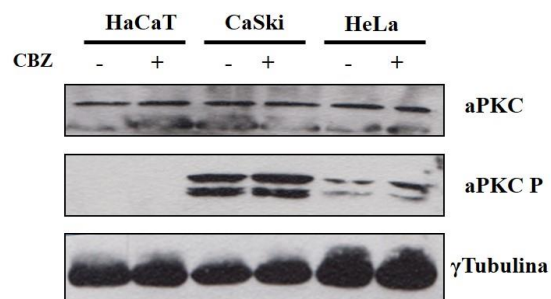


Figura 4.29: Análisis de la expresión endógena de aPKC y aPKC P en células VPH-positivas. Células HaCaT, HeLa y CaSKi fueron incubadas con o sin CBZ, previamente a la preparación de los extractos proteicos. La inmunodetección del nivel de expresión endógeno de aPKC o aPKC P se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-aPKC o aPKC P. γ -Tubulina se muestra como control de siembra de cantidades equivalentes de proteínas en todos los casos.

Para analizar si el estado de fosforilación de aPKC está mediado por la presencia de E6 en dichas células, se procedió a silenciar la expresión de E6 18 en HeLa. Para ello, células HeLa fueron transfectadas con los silenciadores siRNA E6 18, siRNA E6AP o siRNA Luci, como control. En la Figura 4.30 se muestran los resultados de un ensayo representativo y, como puede apreciarse, no se observaron cambios relevantes en los niveles de aPKC P al silenciar a E6 18 o E6AP. Por lo tanto, la activación de aPKC es independiente de la presencia de E6 y/o de la

degradación de algunos de sus blancos, y podría estar mediada por otros mecanismos no dilucidados hasta el momento. En la Figura 4.30 también se aprecia un incremento en los niveles de p53 en las células silenciadas para E6 18 y E6AP, corroborándose de esta manera la ablación eficiente de las respectivas proteínas.

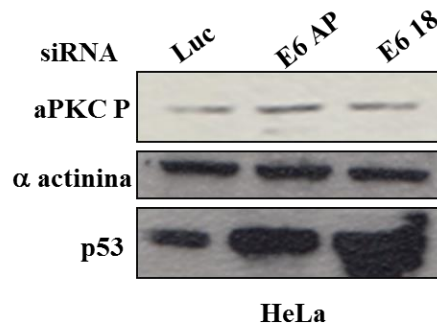


Figura 4.30: Los niveles de aPKC P no son afectados por la expresión de E6 18 o E6AP. Células HeLa fueron transfectadas con siRNA Luci, siRNA E6AP o siRNA E6 18. Después de 48 hs se prepararon los extractos y los niveles proteicos fueron analizados por WB utilizando un anticuerpo monoclonal anti- aPKC P para analizar los niveles endógenos de dicha proteína. α -actinina se muestran como control de siembra de cantidades equivalentes de proteínas en todos los casos. p53 se muestra como control de silenciamiento de E6 18 y E6AP.

Lamentablemente el análisis de la interferencia de E6 sobre la localización y los niveles *in vivo* de PAR 6 no pudo ser llevado a cabo, ya que los anticuerpos comerciales que se emplearon no fueron eficientes en la detección de dicha proteína.

En conjunto, los resultados que se presentaron hasta el momento indican que aPKC se encuentra fosforilada en el residuo Thr 410 en células derivadas de carcinomas VPH-positivos, como CaSKi y HeLa. Además, se comprobó que esta fosforilación no depende de E6 18 (Figura 4.30), por lo tanto, otros factores desconocidos hasta el momento estarían estimulando la fosforilación de aPKC en dichas células.

Capítulo 2

**Análisis de la interferencia de la proteína E6
sobre la polaridad celular.**

4.4 Análisis de la interferencia de E6 18 en la reconstitución de las UT.

Muchos de los blancos celulares de las oncoproteínas E6 conteniendo dominios PDZ son proteínas que participan en la formación de las uniones intercelulares y en el control de la polaridad celular, como DLG1 (Gardiol et al., 1999), Scribble (Nakagawa and Huijbrechtse, 2000), PATJ (Storrs and Silverstein, 2007), MAGI 1 (principal blanco PDZ de E6 16 y E6 18) (Kranjec and Banks, 2011) y PAR 3 (esta Tesis). Teniendo en cuenta esta información, se completaron los estudios tendientes a comprender cómo la interferencia de E6 sobre las proteínas mencionadas podría influir sobre la formación de las uniones intercelulares y el establecimiento de la polaridad celular.

En primer lugar se puso a punto en el laboratorio la técnica de cambio en la concentración de Calcio (*switch* de calcio) para células HaCaT, ensayo estándar utilizado para evaluar la polaridad celular (McNeil et al., 2006). Brevemente, las células se cultivaron en un medio sin suero y luego se le adicionó el quelante de calcio EGTA; en estas condiciones se desarticulan las uniones intercelulares y la polaridad celular (Lawrence et al., 2002). *A posteriori*, se lavaron las células para eliminar el EGTA, y se adicionó medio de cultivo completo (con suero) para restaurar los niveles de calcio extracelular. Luego, las células se fijaron a distintos tiempos y se evaluó la expresión del marcador ZO1 (proteína de UT). La localización de ZO1 en los bordes celulares es un índice de la repolarización y restablecimiento de las uniones intercelulares (McNeil et al., 2006).

Como segundo paso, se optimizaron algunos parámetros de la metodología. Entre ellos, se evaluó el tiempo de incubación de la células con medio sin suero, mediante monitoreo de la morfología y viabilidad celular. Se eligió una incubación por dos horas, ya que a tiempos inferiores no se observaron cambios en la localización de ZO1, y a tiempos superiores, por el contrario, se una observó una alta tasa de muerte celular. También se optimizó el efecto del tratamiento con EGTA, para lo cual se probaron distintas concentraciones (2mM, 3mM, 4mM) y distintos tiempos de incubación. La mejor condición resultante fue un tratamiento con EGTA 2mM por 15 minutos, ya que a tiempos superiores se notaron cambios importantes en la morfología celular.

Una vez optimizada la técnica, se procedió a analizar el efecto que ejerce la expresión de E6 sobre la capacidad de la célula para relocalizar el marcador ZO1 después de la disminución del calcio, índice de la capacidad de restablecer las uniones intercelulares y la polaridad celular. El ensayo se realizó en paralelo para la línea HaCaT como control, y células expresando establemente E6 18 (Capítulo 1, sección 4.1.3, Figura 4.6). Como se muestra en la Figura 4.31,

en las células HaCaT la localización neta de ZO1 en los bordes, en regiones de contacto con otras células, se observó a tiempos más cortos post-agregado de medio completo, comparando con células E6 18-positivas. Puede observarse claramente que luego de una hora de incubación con medio completo, ZO1 se ubicó preferentemente en el borde celular en células HaCaT. Sin embargo, las células que expresaban establemente E6 18 no reordenaron sus UT luego de una hora (evaluado por la localización de ZO1), situación que se alcanzó alrededor de las dos horas (Figura 4.31). Estos datos mostraron un retardo en el restablecimiento de las UT ante la presencia de la proteína viral, sugiriendo una disfunción en el establecimiento de la polaridad celular.

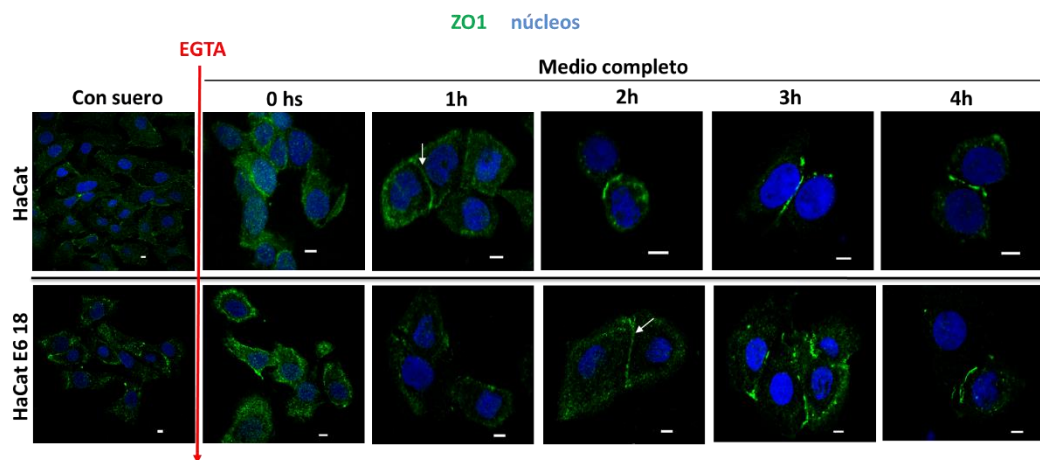


Figura 4.31: Ensayos de cambios en la concentración de calcio para evaluar restablecimiento de la polaridad celular en células expresando E6 18. Células HaCaT (control) o expresando establemente E6 18 fueron fijadas a distintos tiempos y analizadas para la expresión endógena de ZO1 (verde) por IF. En rojo se señala el momento del agregado de EGTA por un periodo de 15 min, tras lo cual se agregó medio completo. Los tiempos indicados señalan los tiempos de incubación después del agregado de medio completo. Las flechas blancas señalan la marca de ZO1 en los bordes celulares representando el restablecimiento de las UT y la repolarización celular. En azul se observan los núcleos por tinción con el colorante fluorescente azul DAPI. Barra de tamaño 5µm.

Con el objetivo de corroborar de manera más precisa el retardo observado y las diferencias entre células que expresan o no E6 18, se llevó a cabo el mismo experimento pero fijando las células cada treinta min, y a tiempos menores post agregado de medio completo. Como se observa en la Figura 4.32, otra vez, la localización de ZO1 en bordes celulares se recuperó más rápidamente en células HaCaT que en células expresando E6 18. Para las células HaCaT la expresión de ZO1 en los contactos celulares se empezó a observar a los 30 min, y se completó a los 60 min. Mientras que, en las células E6 18 positivas, se observó un retardo en la marca de ZO1 en los bordes celulares, ya que a los 60 min la marca se observó sólo en algunas células, y recién a las 2 horas se pudo visualizar una mayor recuperación con una menor distribución de ZO1 en el citoplasma. En las incubaciones a tiempos mayores no se observaron

diferencias entre las dos líneas celulares. Esto indicaría que la perturbación en la repolarización o restablecimiento de las UT, mediada por E6 18, ocurre en los estadios iniciales de dichos eventos. Como observación general, en todos los casos la expresión de ZO1 fue más difusa en células E6 positivas que en los controles, en donde la marcación en los bordes resultó ser mucho más notable.

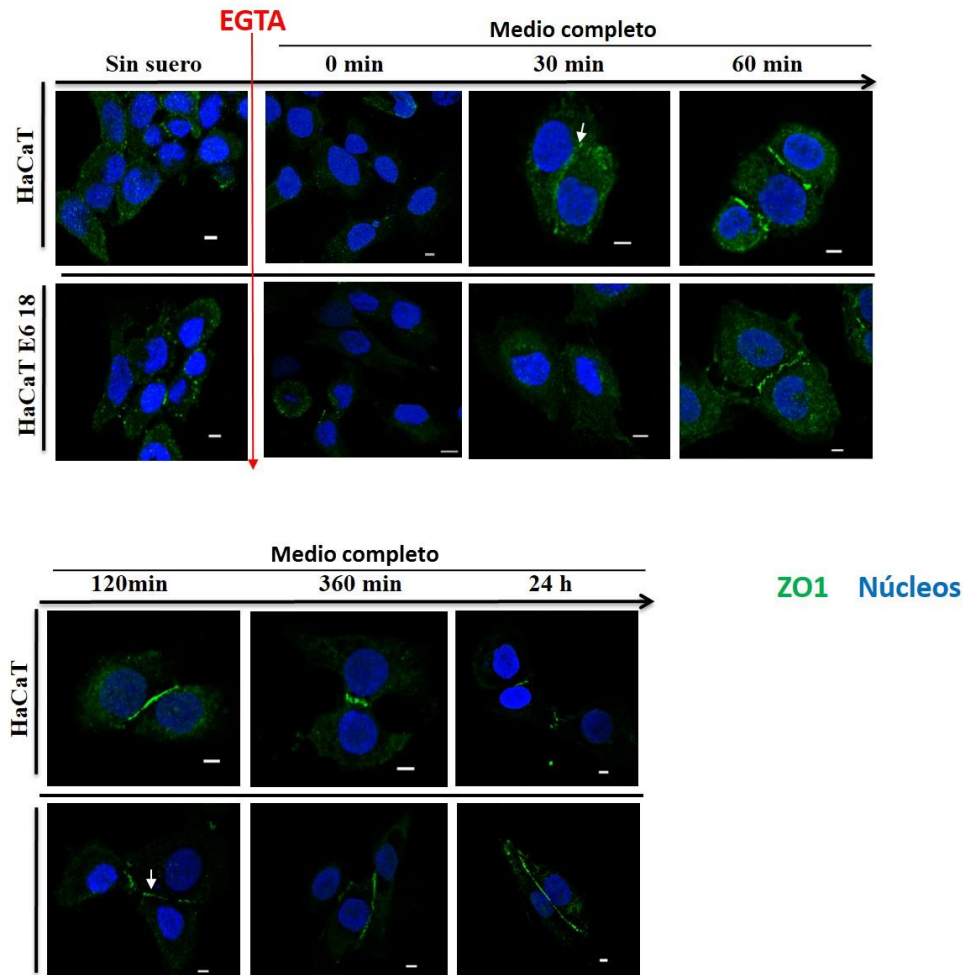


Figura 4.32: Ensayos de cambios en la concentración de calcio para evaluar restablecimiento de la polaridad celular en células expresando E6 18. Células HaCaT (control) o expresando E6 18 fueron fijadas a distintos tiempos y analizadas para la expresión endógena de ZO1 (verde). Las células fueron incubadas durante 2 hs con medio sin suero, y luego de lavados se las incubó por 15 minutos con el quelante de calcio EGTA (indicado con flecha roja). *A posteriori*, las células fueron incubadas con medio completo. Los tiempos señalados se refieren al periodo de incubación después del agregado de medio completo antes de la fijación. Las flechas blancas señalan la marca de ZO1 en los bordes celulares representando el restablecimiento de las UT y la repolarización celular. En azul se observan los núcleos por tinción con el colorante fluorescente azul DAPI. Barra de tamaño 5 μ m.

Por último, se decidió cuantificar la alteración en el restablecimiento de las UT observada en las Figuras 4.31 y 4.32. Para ello, se midieron los niveles de ZO1 en los bordes celulares y en citoplasma a los distintos tiempos post agregado de medio completo, tanto en células expresando E6 18 como en células HaCaT (control) utilizando el analizador de Imágenes

MacBiophotonics ImageJ 1.43 m software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EE.UU.). Para dicha medición fue necesario seleccionar en cada imagen las regiones de interés correspondientes a las zonas en donde se encontraba la marca de ZO1. Por lo tanto, las áreas de cuantificación resultaron ser diferentes en cada caso, y para independizarnos de la misma, se decidió trabajar con las áreas integradas. En la Gráfica 4.33 se muestra el valor que surge de la resta de la intensidad en borde celular con respecto a la intensidad en citoplasma (eje Y, unidades arbitrarias), para cada tiempo. Los valores promedios se obtuvieron a partir de 3 experimentos independientes, tomando varias imágenes de cada tiempo en particular. Como se observa en la Figura 4.33, a los 30, 60 y 120 min, existen diferencias estadísticamente significativas para los niveles de ZO1 en los bordes celulares. Esto último indicaría que a esos tiempos el restablecimiento de las UT, medido con el marcador ZO1, fue estadísticamente menor en aquellas células expresando E6 18 con respecto a las células HaCaT, utilizadas como control.

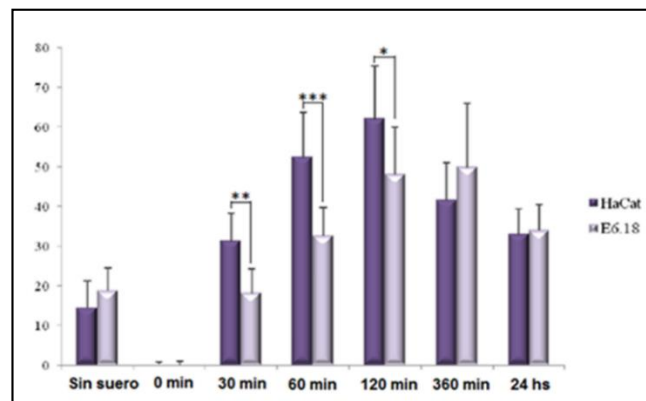


Figura 4.33: Retardo de reconstitución de la expresión de ZO1 en bordes celulares en células que expresan E6 18. Los niveles de ZO1 en el borde celular fueron normalizados con respecto a los del citoplasma, en células control HaCaT (representado con barras violeta oscuro) como en células HaCaT E6 18 (barras lilas). Los valores fueron tomados en campos seleccionados de al menos 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas entre células HaCaT y las células que expresan E6 18 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

En resumen, un retardo en la reconstitución de las uniones intercelulares indicaría una disfunción de los mecanismos que regulan la polaridad celular en células que expresan E6 18 (McNeil et al., 2006; Wu et al., 2007). El retardo observado puede deberse a la interacción de E6 con algunos de los blancos que regulan la polaridad celular mencionados anteriormente (sección 1.3.5.2 II). Es importante destacar, que el retardo en la repolarización se observó en estadios tempranos de la formación de las uniones celulares, ya que a las 3 horas no se observaron diferencias significativas en la localización del marcador ZO1, entre aquellas células que expresan o no E6 18.

4.5 Análisis de la distribución de PIs de membrana en células que expresan proteínas E6.

Entre los objetivos que se plantearon en la presente Tesis se encontraba también analizar si E6, a través de su interacción con dominios PDZ (sección 1.4.2), podía interferir con la localización de los PIs, los cuales son importantes para crear los dominios subcelulares *apicobasales* (Martin-Belmonte and Mostov, 2007). Esto último, teniendo en cuenta que la unión de PIs a PDZ solapa el sitio de unión de ligandos peptídicos parcialmente, siendo la unión de ambos factores mutuamente excluyente (Ivarsson et al., 2013). Por lo tanto, podría especularse que E6 podría desplazar la interacción PDZ-lípidos. El análisis de la probable interferencia de E6 sobre la interacción PIs-PDZ es de relevancia, ya que la correcta localización de PIs depende, en parte, de su interacción con proteínas PDZ. A su vez, la distribución de PIs es importante para el reclutamiento de componentes específicos involucrados en el mantenimiento de la polaridad celular (véase sección 1.4.2) (Goldstein and Macara, 2007). Así, E6 podría inferir también, por este mecanismo, con la correcta localización de los complejos que forman las uniones celulares y en el establecimiento de la polaridad *apicobasal*.

En primera instancia, se optimizó el uso de herramientas moleculares para poder llevar a cabo estos estudios. Para estos análisis se utilizó el biosensor fluorescente PH PLC-GFP (descrito en la Tabla 3.1), que interacciona con los PI(4,5)P2 con gran afinidad, y por esta razón, pudo ser usado como un biosensor específico. Además, al estar fusionado a la proteína GFP permite examinar la distribución de estos lípidos por fluorescencia (Wu et al., 2007). El vector expresando PH PLC-GFP fue introducido por transfección en distintas líneas epiteliales. En células VPH-negativas como HaCaT, la distribución analizada refleja una localización de PI(4,5)P2 especialmente en los bordes celulares, preferentemente en las uniones intercelulares (Figura 4.34 A), como fuera reportado por otros autores y mostrado en la sección XY de la Figura 4.11 en el Capítulo 1 de la presente Tesis (Zimmermann, 2006). No obstante, cuando se analizó la distribución del biosensor en células HeLa (E6 18-positivas), la distribución de PI(4,5)P2 fue difusa (Figura 4.34B). Para poder comprender si la distribución de PI(4,5)P2 se veía alterada por la expresión de E6 de VPH de alto riesgo y de acuerdo a la hipótesis planteada, se co-transfectaron células HaCaT con vectores de expresión que codifican para HA-E6, y con el vector biosensor de PI(4,5)P2 (PH PLC-GFP). Luego de 24hs, las células fueron fijadas y la expresión de HA-E6 11, -E6 18 o -E6 18mut fue corroborada por IF usando el anticuerpo anti-HA. Los resultados se presentan en la Figura 4.34 C, en donde, para el caso de E6 11 y E6 18mut no se observaron cambios netos en la distribución de los lípidos PI(4,5)P2, ya que preferentemente se

ubicaban en los bordes celulares (Figura 4.34 C). Sin embargo, en las células que expresaban E6 18, se pudo observar una redistribución difusa del biosensor hacia el citoplasma (Figura 4.34 C), como fue observado en células HeLa (Figura 4.34 B). Por lo tanto, los datos sugieren que la presencia de E6 18 en la célula podría interferir en la distribución de los PI(4,5)P2 y, además, que el PBM de E6 18 estaría involucrado en esta alteración, ya que, aquellas células expresando E6 18mut presentaron una distribución del biosensor comparable a las células control.

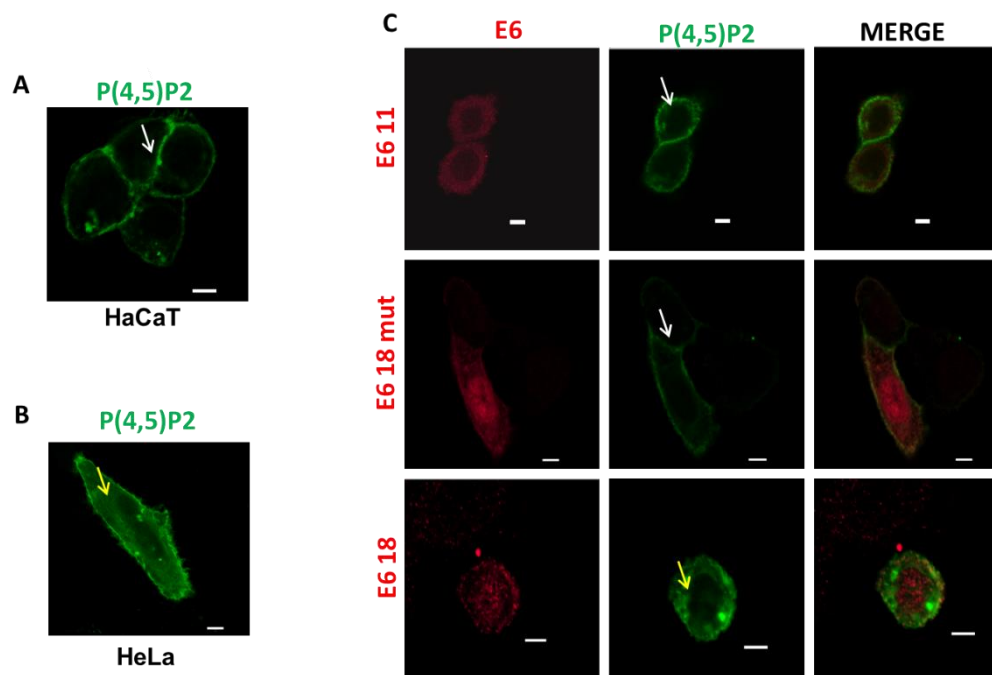


Figura 4.34: Efecto de la expresión de la proteína E6 sobre la localización de PI(4,5)P2. En **A** se muestra la localización del biosensor en células HaCaT transfectadas con el biosensor de PI(4,5)P2 (verde). En **B** se muestra la localización del biosensor en células HeLa, en donde se observa marca difusa. En **C** células HaCaT fueron co-transfectadas con el biosensor, PHPLC-GFP (verde), y un vector de expresión para HA-E6 11, HA- E6 18 o HA- E6 18mut (rojo). Se indica con flechas blancas la localización de PI(4,5)P2 en borde celular y con flechas amarillas la localización difusa del biosensor. Barra de tamaño 5 μ m.

Recientemente han sido descriptas la prevalencia, especificidad y constantes de afinidad de las interacciones de los dominios proteicos PDZ con los PIs (Ivarsson et al., 2013). Los reportes señalaron que entre las proteínas que interaccionan con PIs se encuentran algunas que son blancos de E6, como DLG1, MAGI 1 y PAR 3. Si bien los cambios observados en los patrones de distribución de PI(4,5)P2 (Figura 4.34), pueden deberse a distintos factores, podría especularse que la interacción directa de E6 con las proteínas PDZ mencionadas, podrían alterar la unión PIs-PDZ, necesaria para una correcta localización de ambos agentes. Para analizar este punto, se optimizaron ensayos de interacción *in vitro* entre proteínas PDZ y PIs, para lo cual se transfectaron células HEK293T con los vectores que codifican para las proteínas DLG1, MAGI 1 y PAR 3. Es importante aclarar, que se seleccionaron estas proteínas para estos análisis ya que

son blancos de E6 de alto riesgo, poseen dominios PDZ y se ha demostrado su interacción con PIs para todos los casos (Ivarsson et al., 2013). Luego de 24 horas, se prepararon los extractos proteicos en el tampón salino PBS con el agregado de una mezcla de inhibidores de proteasas (sección 3.12), y fueron rápidamente homogeneizados a potencia 1 con el Homogeneizador VWR (Equipamiento de Laboratorio Modelo VDI 12, Italia). A continuación, se corroboró la expresión de las distintas proteínas por técnicas de WB, tras lo cual se procedió a la incubación de dichos extractos proteicos con tiras conteniendo los lípidos inmovilizados en membranas (Echelon, Figura 4.35 A). Tras varios lavados, se agregaron los anticuerpos correspondientes para la inmunodetección de cada proteína y luego los anticuerpos secundarios adecuados. Los resultados se pueden observar en la Figura 4.35 B, en donde se ven señales específicas para MAGI1 y PAR 3. Para el caso de PAR 3, corresponden a la interacción con inositolídeos monofosfatos (3, 4 y 5), con difosfato 3,5 o 4,5 y con trifosfato 3,4,5, como fue reportado previamente por otros autores (Wu et al., 2007; Ivarsson et al., 2013). Es importante destacar, que la interacción de PAR 3 con PIs difosfato, en particular 4,5, es de suma importancia ya que se ha planteado que dicha unión es responsable de la localización de PAR 3 en membrana (sección 1.4.2) (Wu et al., 2007; Ivarsson et al., 2013). En el caso de MAGI1, se observó interacción con los inositolídeos monofosfatos (4 y 5), como descripto previamente (Ivarsson et al., 2013). Por otro lado, si bien la bibliografía reporta interacción de DLG1 con PIs en el sistema optimizado en la presente Tesis no pudo ser comprobada (Wu et al., 2007). Es necesario resaltar que este análisis fue realizado en condiciones de sobre-expresión de las proteínas de interés, ya que se obtuvieron resultados negativos al analizar las interacciones utilizando extractos celulares que contenían niveles endógenos de las proteínas ensayadas.

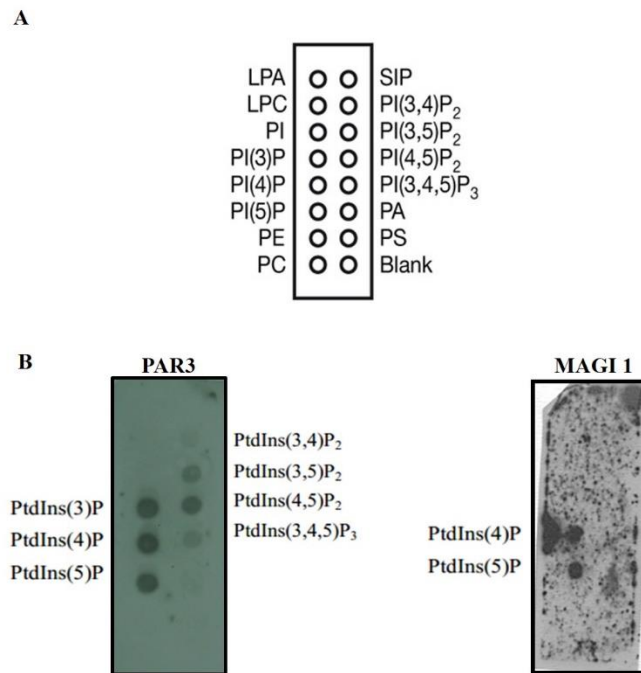


Figura 4.35: Análisis de la interacción *in vitro* de proteínas PDZ con fosfoinosítidos. A) Esquema de la composición de las membranas que contienen los lípidos inmobilizados utilizados para los ensayos de interacción PDZ-PIs *in vitro* (Echelon EE.UU.). **B)** Las tiras conteniendo lípidos inmobilizados fueron incubadas con extractos proteicos homogenizados obtenidos a partir de células HEK293T sobreexpresando PAR 3 o MAGI1, según se indica. Las posibles interacciones fueron analizadas utilizando los anticuerpos primarios correspondientes, y revelando con el sistema descrito para los ensayos de WB. La señal quimiluminescente en forma de puntos indica interacción.

Referencias: LPA ácido lisofosfatídico, LPC lisofosfocolina, PI fosfoinosítidos, PI(3)P fosfatidilinositol 3P, PI(4)P fosfatidilinositol 4P, PI(4)P fosfatidilinositol 5P, PE fosfatidiletanolamina, PC fosfatidilcolina, SIP esfingolípido, PI(3,4) fosfatidilinositol 3,4P, PI(4,5) fosfatidilinositol 3,5 P, PI(4,5) fosfatidilinositol 4,5 P, PI(3,4,5) fosfatidilinositol 3,4,5 P, PA ácido fosfatídico, PS fosfatidilserina, Blank (Blanco).

Los resultados obtenidos fueron alentadores, de modo que se continuó con estos estudios. Así, se decidió analizar si la inclusión de la proteína E6 en las incubaciones de los homogenizados celulares con las tiras (Echelon), disminuía o inhibía las interacciones identificadas. Como primera aproximación, dichos experimentos fueron llevados a cabo con péptidos sintéticos conteniendo las secuencias carboxilo terminal de E6 18, donde localiza el PBM. También, se incluyó el péptido arbitrariamente denominado “Scramble”, como control negativo (las secuencias de los péptidos se detallan en la sección 3.12 de Materiales y Métodos). Dichos péptidos sintéticos fueron cedidos gentilmente por la Dra. Miranda Thomas del Laboratorio de Virología Tumoral de Trieste, Italia. El hecho de utilizar los péptidos sintéticos, se debe a que la purificación de la proteína E6 es muy dificultosa, ya que se trata de una proteína insoluble en distintas condiciones de ensayos (Liu et al., 2009b). Para iniciar el análisis, entonces, células HEK293T fueron transfectadas con el vector que codifica con PAR 3 y luego de 24 horas, se realizaron los extractos proteicos como se describió previamente. *A posteriori*, y luego de comprobar la sobreexpresión proteica de PAR 3 por técnicas de WB, los extractos celulares

fueron incubados en PBS con 500µg de los péptidos conteniendo las secuencias carboxilo terminal de E6 18 o Scramble (disueltos previamente en agua) a 4°C, en rotación, durante una hora. Estas mezclas fueron luego enfrentadas a las membranas conteniendo los lípidos inmovilizados, y se procedió a la inmunodetección, como se indicó anteriormente. Como resultado de este experimento, se observó un cambio en el patrón de interacción de PAR 3 con PIs, comparando los extractos incubados con los diferentes péptidos (Figura 4.36). Se pudo apreciar una mayor intensidad de interacción de PAR 3 con los PIs monofosfato tipo PI(3)P y PI(5)P, para el caso de los extractos incubados con el péptido E6 18. A su vez, se observó una disminución de su interacción con PIs difosfato como PI(4,5)P₂, PI(3,5)P₂ y PI(3,4)P₂ y en menor medida con el trifosfato PI(3,4,5)P₃. Estos hallazgos fueron consistentes a lo largo de tres experimentos independientes, sugiriendo que existiría una unión diferencial PDZ de PAR 3-PIs ante la presencia del péptido conteniendo el PBM de E6 18.

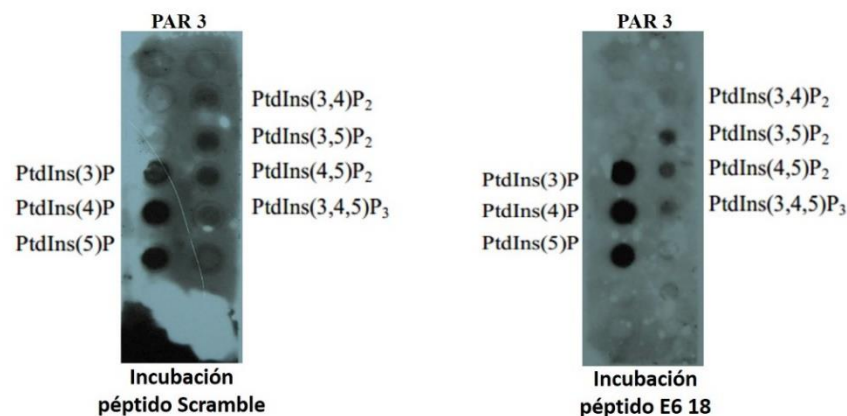


Figura 4.36: Análisis de la interferencia de la secuencia carboxilo terminal de E6 18 sobre la interacción PAR 3-PIs. Extractos proteicos obtenidos a partir de células HEK293T transfectadas con el vector que codifica para PAR 3 fueron incubados con péptidos conteniendo las secuencias carboxilo terminal de E6 18 o el péptido Scramble (control negativo). Luego de la incubación, dichos extractos fueron enfrentados con tiras conteniendo lípidos inmovilizados para evaluar la interferencia del sitio carboxilo terminal de E6 18 sobre la interacción PAR 3-PIs. La proteína PAR 3 interaccionando con PIs fue inmunodetectada utilizando el anticuerpo anti-PAR 3 y revelada con el sistema descrito para los ensayos de WB. La señal quimioluminiscente indica interacción.

A partir de los resultados obtenidos se decidió continuar con estas investigaciones. Así, en esta fase del estudio se co-transfectaron células HEK293T con los vectores de expresión codificando para PAR 3 y E6 11 o E6 18. Luego de la transfección, se procedió a la preparación de los extractos celulares y se analizaron los niveles de PAR 3 en las distintas condiciones por técnicas de WB (Figura 4.37 A). Una vez corroborada la correcta expresión de PAR 3, dichos extractos fueron incubados sobre las membranas conteniendo los lípidos inmovilizados, procediéndose posteriormente a la inmunodetección, como fuera descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 4.37 B, en donde se puede apreciar que en el caso de la

membrana incubada con los extractos proteicos expresando E6 18 se produjo un cambio en el patrón de interacción de PAR 3-PIs, al comparar con las membranas que se incubaron con extractos conteniendo E6 11. En este caso, no se observaron diferencias significativas en la intensidad de interacción de PAR 3 con los PIs monofosfato; sin embargo, al comparar los patrones de interacción de los PIs bifosfato y trifosfato, si se observaron cambios. En el caso de los extractos proteicos que expresaban E6 18, se apreció una notable disminución en la interacción de PAR 3 con PI(3,4,5)P₃ y en menor medida con los PIs bifosfato. De lo descripto se desprende que, al igual que en el caso de incubación con el péptido sintético E6 18 C-Terminal, la presencia de E6 18 podría alterar los patrones de interacción de PAR 3 con PIs (Figura 4.36, 4.37) aunque dichas alteraciones fueron distintas en los diferentes experimentos.

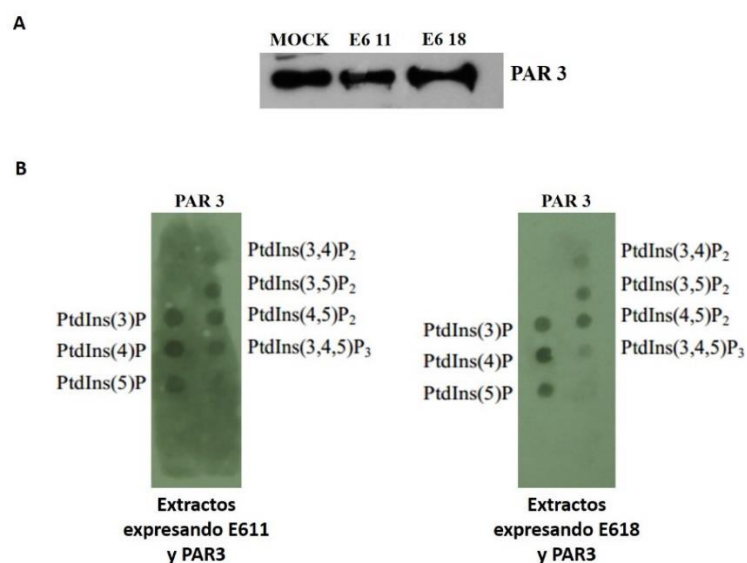


Figura 4.37: Análisis de la interferencia de E6 18 sobre la interacción de PAR 3 con PIs. En **A)** Extractos proteicos homogenizados a partir de células HEK293T co-transfectadas con los vectores que codifican para PAR 3 y para E6 11 o E6 18 (según cada caso). La inmunodetección del nivel de expresión de PAR 3 se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PAR 3. **B)** Los extractos fueron enfrentados con tiras conteniendo lípidos inmovilizados (Echelon, EE.UU.). La proteína PAR 3 interaccionando con PIs fue inmunodetectada utilizando el anticuerpo anti-PAR 3 y revelando con el sistema descripto para los ensayos de WB. La señal quimioluminescente indica interacción.

En conclusión, a partir de los experimentos anteriormente descriptos, se puede sugerir que la presencia de E6 18 tiene como consecuencia la redistribución del biosensor de PI(4,5)P₂. Además, tanto la presencia de la secuencia de unión a dominios PDZ en la proteína viral E6, o de la proteína completa, provocaría un cambio en el patrón de interacción de los PIs con PAR 3, interfiriendo de esta manera en la unión lípido-proteína.

4.6 Análisis de la intercomunicación entre los distintos complejos de polaridad celular.

Como se describió en la Introducción (sección 1.4.1), los complejos de polaridad celular no son estáticos, sino que son complejos dinámicos que están en intercomunicación constante. Es por este motivo que se planteó analizar cómo la ablación de alguno de los componentes de los complejos, blancos de las oncoproteínas E6 (DLG1, Scribble y PAR 3), influye sobre la expresión de otros efectores de polaridad. Se llevaron a cabo ensayos de silenciamiento para DLG1, Scribble y PAR 3 en células HaCaT, a fin de analizar la influencia del silenciamiento de la expresión de un componente sobre la expresión de los otros, independientemente de E6. Para este objetivo células HaCaT transfectadas con siRNA DLG1, siRNA PAR 3, siRNA Scribble (según corresponda) o siRNA Luci (control), fueron fijadas e inmunomarcadas para evaluar la expresión endógena de las proteínas mencionadas (Figura 4.38). Se puede observar que en aquellas células en donde se silenció la expresión de DLG1 o Scribble, la marca de PAR 3 en los bordes celulares se encuentra disminuida al compararla con las células control (Luci, en donde la localización de PAR 3 en los contactos célula-célula es más acentuada). Es importante destacar, que al comparar el efecto del silenciamiento de DLG1 o Scribble sobre PAR 3, se apreció que la disminución en los bordes celulares era más acentuada en el caso de la ablación de Scribble. Por otro lado, cuando se silenció la expresión de PAR 3, la marca de DLG1 y Scribble se mantuvo en los contactos célula-célula, al comparar con las células control siLuci. Por lo tanto, este resultado demostró que existe una interconexión entre los complejos, indicando que DLG1 y Scribble serían importantes para la localización de PAR 3, si bien no ocurre lo contrario. Entonces, podría plantearse que las alteraciones en la localización de PAR 3 descriptas en el Capítulo 1 de la presente Tesis (Figuras 4.6, 4.7, 4.15 y 4.25), podrían deberse, en parte, a la disminución de los niveles de DLG1 y/o Scribble mediada por las oncoproteínas E6. Esto último considerando los reportes acerca de la degradación de dichas proteínas celulares por parte de E6 de alto riesgo (Gardioli et al., 1999; Nakagawa and Huibregtse, 2000).

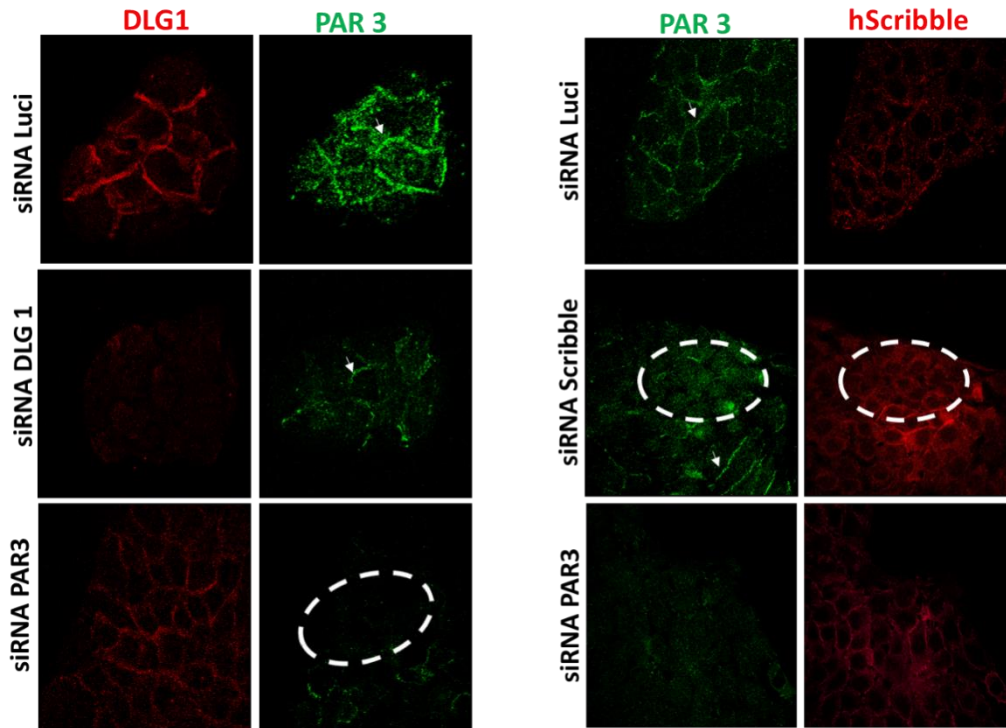


Figura 4.38: El silenciamiento de DLG1 o Scribble en células HaCaT altera la localización de PAR3. Células HaCaT fueron transfectadas con: siRNA PAR3, siRNA DLG1, siRNA Scribble o siRNA Luci durante 72 hs, posteriormente fueron fijadas y analizadas para la expresión endógena de PAR3, DLG1 o Scribble por IF. El círculo punteado indica silenciamiento en bloque en el caso de Scribble y PAR3. Las flechas blancas señalan localización de PAR3 en los bordes celulares.

A continuación, se analizó la expresión de DLG1, Scribble y PAR3 en líneas celulares HaCaT silenciadas establemente para la expresión de DLG1 (HaCaT-siDLG1) o Scribble (HaCaT-siScribble), con el objetivo de profundizar los estudios precedentes. Estas líneas celulares fueron desarrolladas y cedidas por la Dra. Paola Massimi del Laboratorio de Virología Tumoral de Trieste, Italia (Massimi et al., 2012). En primera instancia, se analizó la línea celular HaCaT-siScribble en donde se silenció transitoriamente la expresión de DLG1 o de Luci (Figura 4.39). En la Figura 4.39 panel A, se observa la expresión de PAR3 y DLG1 en la línea celular HaCaT (control de expresión). En el panel B se corroboró la eficiente ablación de Scribble en la línea HaCaT-siScribble. Luego se analizó la localización de PAR3 en estas células. En siLuci (Figura 4.39 panel C), se puede observar una disminución en la marca de PAR3 en los bordes celulares al comparar con la célula control (Figura 4.39 A), de manera similar a lo observado en las células en donde se silenció la expresión de Scribble de manera transiente (Figura 4.38). Por otro lado, la marca de DLG1 en los contactos célula-célula se encuentra disminuida en las células siLuci, al comparar con la marca de DLG1 en las células HaCaT (Figura 4.39A), indicando que hay un efecto sobre la expresión de DLG1 en las células en donde se silenció establemente a Scribble. Reportes de otros

autores indican que la localización de DLG1 depende en parte de la distribución de Scribble, lo que podría estar explicando el efecto mencionado (Massimi et al., 2008).

Por último, en las células HaCaT-siScribble se silenció transitoriamente la expresión de DLG1 (Figura 4.40C). En dichas células, la marca de PAR 3 se encontró disminuida en los bordes al comparar con las células HaCaT control (Figura 4.39A). Este resultado coincide con lo descrito en las células HaCaT-siScribble siLuci, lo que indica que no hay diferencias en la expresión de PAR 3 entre las células doblemente silenciadas (Scribble y DLG1), con respecto a las silenciadas sólo con Scribble.

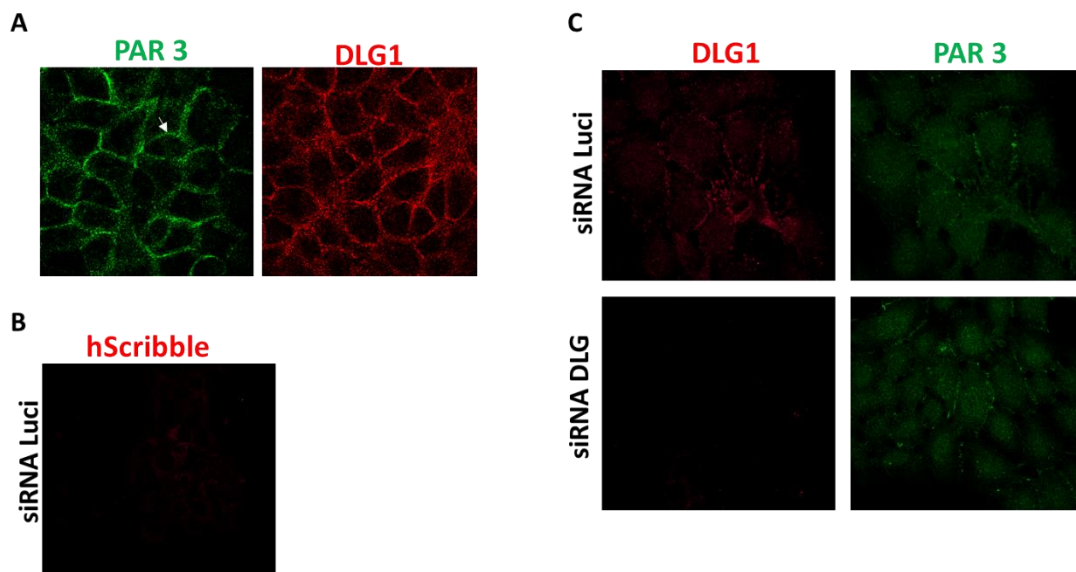


Figura 4.39: Análisis de la expresión de PAR 3 y DLG1 en células HaCaT silenciadas establemente para Scribble. A) Células HaCaT fueron fijadas y analizadas para la expresión endógena de PAR 3 y Scribble por IF. **B)** Células HaCaT-siScribble fueron fijadas y analizadas para corroborar la ablación de Scribble en esta línea. **C)** Células HaCaT-siScribble fueron transfectadas con: siRNA DLG1 o siRNA Luci durante 72 hs, posteriormente fueron fijadas y analizadas para la expresión endógena de PAR 3 o DLG1 por IF. Las flechas blancas indican localización de PAR 3 en borde celular.

El mismo análisis se llevó a cabo en células HaCaT-siDLG1, en donde se silenció la expresión de Scribble y de Luci (control). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.40, en donde en el panel B se evaluó la ablación de DLG1, comprobándose el silenciamiento eficiente del marcador. Por otro lado, en las células HaCaT-siDLG1 control (siLuci) se observó un cambio en la localización de PAR 3, en este caso la marca de PAR 3 se vio disminuida en bordes celulares, al comparar con la expresión de PAR 3 en las células HaCaT control (Figura 4.40 A). Además, llamativamente se observó marca de PAR 3 en el núcleo, efecto que no fue observado en las células en donde se silenció de manera transitoria la expresión de DLG1 (Figura 4.39). La localización nuclear de PAR 3 fue descrita en el Capítulo 1 en aquellas células que expresaban proteínas E6 derivadas de VPH oncogénicos (Figura 4.6, 4.7, 4.8).

En las células HaCaT-siDLG1 control (siLuci) se pudo observar una leve disminución de la expresión de Scribble en los contactos célula-célula (Figura 4.40 C), al comparar con células HaCaT control (Figura 4.40 A). Esto indicaría que la localización de Scribble depende en parte de la expresión de DLG1. Por último, se analizó la expresión de PAR 3 en células HaCaT-siDLG1, en donde adicionalmente se silenció en forma transitoria a Scribble. El resultado obtenido demostró una disminución más acentuada de la marca de PAR 3 en los bordes celulares, al comparar con células HaCaT-siDLG1 (siLuci control). Por lo tanto, en este caso, y a diferencia del efecto observado en el doble silenciamiento presentado anteriormente (HaCaT-siScribble/siDLG1 transitorio, Figura 4.39C), el silenciamiento de Scribble en células HaCaT-siDLG1 produjo un efecto más marcado sobre la expresión de PAR 3.

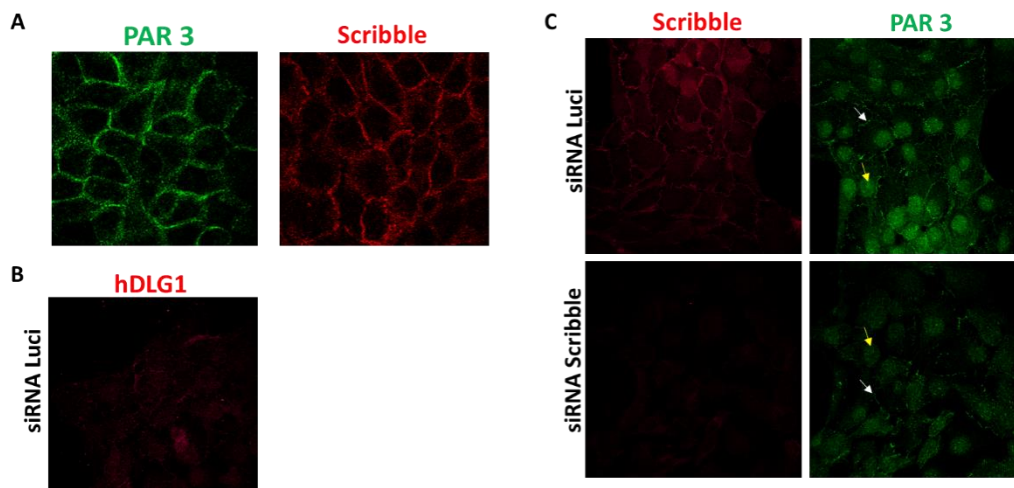


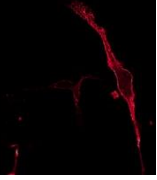
Figura 4.40: Análisis de la expresión de PAR 3 y Scribble en células HaCaT silenciadas establemente para la expresión de DLG1. **A)** Células HaCaT fueron fijadas y analizadas para la expresión endógena de PAR 3 y DLG1 por IF. **B)** Células HaCaT-siDLG1 fueron fijadas y analizadas para la expresión de DLG1, para corroborar la integridad de la línea. **C)** Células HaCaT-siDLG1 fueron transfectadas con: siRNA Scribble o siRNA Luci durante 72 hs, posteriormente fueron fijadas y analizadas para la expresión endógena de PAR 3 o Scribble por IF. Las flechas blancas señalan marca de PAR 3 en los bordes celulares, mientras que las amarillas señalan marca nuclear.

En conjunto, la localización de PAR 3 resultó alterada ante la ablación de DLG1 o de Scribble, ya que se afectaron de manera significativa los niveles de PAR 3 en los bordes celulares en células HaCaT. Además, en el caso de las células HaCaT-siDLG1 se observó que PAR 3 adquiere una localización nuclear. Por lo tanto, si bien son necesarios estudios ulteriores para poder comprender en profundidad los mecanismos implicados, no se puede descartar que la degradación de DLG1 o Scribble mediada por E6, pudiera contribuir a los cambios observados en la localización de PAR 3 en células E6-positivas (Capítulo 1).

En resumen, los hallazgos presentados en este trabajo de Tesis contribuyen a incrementar el conocimiento acerca de la disrupción de la polaridad celular en las infecciones asociadas a VPH y, con probables implicancias en el desarrollo de las lesiones tumorales asociadas. En particular, se analizó al complejo PAR, demostrándose que la expresión de la proteína E6 derivada de VPH oncogénicos provoca alteraciones en la distribución subcelular de PAR 3, de una manera PDZ-dependiente, y sin cambios significativos en sus niveles. De esta forma, se describió un nuevo blanco de E6 de VPH conteniendo dominios PDZ, cuya función es relevante en el establecimiento de la polaridad apicobasal y la formación de las uniones intercelulares. Además, se describió que aPKC se encuentra activada en células derivadas de carcinomas asociados a VPH y, que E6 no estaría implicada en esta activación. También, se observó que E6 provoca un retraso en la formación de las UT y en consecuencia, una disfunción en los mecanismos de polaridad celular. Asimismo, se iniciaron los estudios tendientes a conocer las alteraciones que provoca VPH sobre la distribución de lípidos tipo PIs. Dichos lípidos tienen funciones muy importantes en los mecanismos de traducción de señales que regulan la proliferación y la diferenciación celular, argumento no analizado hasta el momento para este virus. Por último, se profundizó el conocimiento acerca de la intercomunicación entre los distintos componentes de los complejos de polaridad y, cómo regulan mutuamente su expresión, demostrándose que la localización de PAR 3 depende, en parte, de Scribble y DLG1.

Los resultados presentados en un modelo de VPH, por lo tanto, son importantes para comprender la biología del cáncer en general, considerando que la disrupción de la polaridad celular es un evento clave de los procesos tumorales.

Discusión



El objetivo general de la presente Tesis Doctoral consistió en profundizar el conocimiento acerca de la interferencia de VPH con los mecanismos que regulan la polaridad celular y la formación de las uniones intercelulares. Esto es relevante en el sentido de que la transformación maligna está frecuentemente asociada a la pérdida de la polaridad celular. Por ello, los datos arrojados por este estudio contribuyen no sólo a analizar la carcinogénesis asociada a VPH, sino también a entender la biología del cáncer en general. En este sentido, esta propuesta refuerza el concepto de que los virus oncogénicos constituyen sistemas útiles para abordar el análisis de los procesos moleculares que conllevan al desarrollo tumoral. Así, los resultados obtenidos podrían servir de base para el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas, que permitan disminuir el avance de dicha enfermedad.

En este trabajo nos focalizamos en el análisis de las consecuencias de la expresión de la oncoproteína E6 de VPH sobre las proteínas que forman parte del complejo de polaridad PAR, clave para la integridad de las UT. Asimismo, nos propusimos analizar la implicancia de la expresión de E6 sobre el proceso de polarización celular y la interconexión entre distintos efectores del *network* que regula la polaridad celular.

Como detallamos en la sección Introducción 1.3.5.2 I, las proteínas E6 derivadas de VPH interactúan con proteínas con dominios PDZ a través del PBM presente en su región carboxilo terminal, el cual se encuentra conservado en los VPH mucosotrópicos de alto riesgo oncogénico. Entre las proteínas que presentan dominios PDZ se encuentran aquellas que regulan la polaridad celular, algunas de las cuales son blancos de E6 (Thomas et al., 2008b; Pim et al., 2012). El complejo de polaridad PAR está involucrado en diferentes tipos de polaridad y en vías de traducción de señales que regulan la proliferación. Además, varios estudios han demostrado que la desregulación de la actividad del complejo es fundamental para iniciar los procesos de transformación maligna (Aranda et al., 2008). Dentro de este complejo se encuentra la proteína PAR 3, que posee tres dominios PDZ con los cuales E6 podría potencialmente interactuar; por ello en primer lugar nos abocamos al estudio del efecto de dicha proteína viral sobre la expresión de PAR 3. Los resultados demostraron que la expresión de E6 16 y E6 18 alteran la localización subcelular de PAR 3, con una disminución en los bordes celulares y una redistribución hacia citoplasma y núcleo (Figuras 4.5, 4.6 y 4.7). Asimismo, analizamos las modificaciones en la localización de PAR 3 en células que expresaban E6 16 o E6 18 en cultivos histotípicos, utilizando el sistema comercial Matrigel puesto a punto en nuestro laboratorio durante el presente trabajo (Figuras 4.15 y 4.25B). De esta manera, pudimos estudiar la deslocalización de PAR 3 tridimensionalmente, obteniendo como resultado un cambio de su distribución a lo largo del eje *apicobasal* en células expresando E6 16 o E6 18. Específicamente, observamos una distribución

difusa de PAR 3 a lo largo del eje Z, al comparar con células epiteliales HaCaT, donde PAR 3 se ubica en la región apical, tal como fuera reportado y de acuerdo a sus funciones biológicas (Horikoshi et al., 2009). Es importante destacar que el efecto de E6 sobre PAR 3 fue más notorio en el caso de E6 18 que para el caso de E6 16. Asimismo, pudimos observar el cambio en expresión de PAR 3 en células HeLa (E6 18-positivas), con una disminución en los bordes celulares y una redistribución hacia núcleo y citoplasma (Figuras 4.4 y 4.7). En estas células, la ablación por silenciamiento de la oncoproteína viral nos permitió confirmar que dichas alteraciones se debían específicamente a la expresión de E6 18 (Figura 4.8), lo que corroboramos también por experimentos de fraccionamiento celular (Figura 4.24).

Considerando los resultados descriptos anteriormente, nos propusimos profundizar la investigación de los fenómenos celulares y/o moleculares que pudieran explicar las diferencias en la localización de PAR 3, observadas en células que expresan E6 de alto riesgo oncogénico. De esta manera, nos planteamos una serie de probables mecanismos que podrían contribuir a explicar estos hallazgos:

- 1- *Mecanismos mediados por una interacción de E6 y PAR 3*, que pueda estar estimulando su relocalización.
- 2- *Alteraciones de la expresión de los otros componentes del complejo PAR, PAR 6 y α PKC*. Los miembros de este complejo interactúan entre sí; por lo tanto el efecto de E6 sobre uno de ellos puede tener consecuencias sobre los otros constituyentes.
- 3- *Interferencia de E6 sobre la unión PIs- PDZ*, la cual es fundamental para la localización de PAR 3 y para la regulación de PI(4,5)P2 y PI (3,4,5)P3 en la membrana plasmática, como fue descrito en la sección 1.4.2.
- 4- *Mecanismos indirectos*. Los distintos complejos de polaridad están intercomunicados entre sí (Pieczynski and Margolis, 2011). Podría especularse que la deslocalización de PAR 3 se relacione con la acción de E6 sobre otros blancos conteniendo dominios PDZ, como DLG1 o Scribble. Estas proteínas pertenecen al complejo SCRIB y son blancos bien caracterizados de E6 (Gardioli et al., 1999; Nakagawa and Huibregtse, 2000).

Entonces, a lo largo de este trabajo nos propusimos analizar algunos de los aspectos señalados.

Para poder explicar la deslocalización de PAR 3 a través de mecanismos de interacción con E6, analizamos la unión E6 18-PAR 3 mediante ensayos de inmunoprecipitación. Abordamos estos experimentos a través de distintas estrategias de precipitación (Figuras 4.16 y 4.17) y,

como resultado, obtuvimos una interacción positiva para E6 18. Es importante destacar que estos datos no permitieron aseverar si la interacción E6 18-PAR 3 es directa o no. Es posible que los inmunoprecipitados incluyan complejos proteicos que se formen a partir de un *partner* común de ambas proteínas. No obstante, podemos afirmar que la interacción identificada es PDZ-dependiente, ya que no observamos unión para E6 18mut ni E6 11 (bajo riesgo no codifica para PBM). Esto concuerda con lo observado por IF en las células expresando E6 18Mut o E6 11, en donde no se produjeron cambios en la localización de PAR 3. Por ello, el sitio PBM fue fundamental para el efecto de E6 18 sobre PAR 3, probablemente a través de la interacción con el blanco celular. Sería interesante completar los análisis en lo que respecta a la importancia del sitio PBM de E6 18 en la deslocalización de PAR 3 en sistemas tridimensionales. Sin embargo, no hemos podido desarrollar la línea celular estable expresando E6 18mut, necesaria para generar los cultivos histotípicos. Al respecto, diferentes autores han reportado que el PBM de E6 es requerido para la estabilidad de la proteína, mediante su interacción con motivos PDZ (Liu et al., 2009b; Nicolaides et al., 2011). Esto último podría explicar la dificultad mencionada, y la posibilidad de observar su efectiva expresión solamente en experimentos de transfección transiente donde se sobreexpresaba la proteína. Otro punto importante para abordar en estudios ulteriores consiste en determinar con cuál de los tres sitios PDZ de PAR 3 interacciona E6. Esto es relevante a la luz de que PAR 3 une distintas proteínas a través de los diferentes sitios PDZ (véase sección 1.4.1.2), y por lo tanto, en presencia de E6 alguna de estas interacciones podrían verse alterada de manera diferencial.

Por otro lado, es necesario aclarar que no observamos interacción de E6 16 con PAR 3 con el sistema de inmunoprecipitación detallado en Materiales y Métodos (véase sección 3.9.2). Es posible que la interacción entre estas proteínas sea débil, y por lo tanto, las técnicas utilizadas no sean lo suficientemente sensibles para poder detectarla. Sin embargo, no puede descartarse que en el caso de E6 16, otros mecanismos participen de la deslocalización de PAR 3. Es importante destacar, que E6 16 y E6 18 presentan en el sitio PBM diferencias en la composición aminoacídica, como puede observarse en la Figura 5.1. Esto puede resultar en diferencias en la afinidad por los distintos blancos celulares; por ejemplo, se ha descrito que E6 16 tiene mayor afinidad por Scribble, mientras que E6 18 por DLG1 (Thomas et al., 2001). Sin embargo, se ha reportado que las diferencias en los aminoácidos carboxilo terminal, dentro del PBM, no explican completamente la afinidad diferencial de E6 derivadas de distintos VPH por los diferentes blancos celulares, ya que las secuencias corriente arriba al sitio PBM también son importantes para la especificidad de la interacción (Thomas et al., 2005). Por ello, la diferencia en aminoácidos dentro del PBM, o bien en regiones adyacentes, de E6 16 podría sugerir una

infectadas con VPH, la proteína E7 provoca daños en el ADN contribuyendo a alteraciones cromosomales (Moody and Laimins, 2010). Por lo tanto, E6 al relocalizar a PAR 3 en el núcleo compensaría dichas actividades de E7, favoreciendo de esta manera el ciclo de replicación viral. Además, tanto en nuestros experimentos como en los de Fang, se utilizaron como modelo líneas celulares derivadas de tumores, lo que señalaría que esta función de PAR 3 podría ser importante para compensar las alteraciones en el ADN presentes en las células tumorales. Por otro lado, el análisis de la secuencia de PAR 3 reveló la presencia de una potencial señal de localización nuclear. Sin embargo, se desconoce si PAR 3 localiza en el núcleo de manera independiente o si por el contrario requiere de otras proteínas aún no identificadas, que participen de su translocación (Fang et al., 2007). En este sentido, ha sido reportado por distintos autores la interacción de PAR 3 con la proteína importina α , la cual participa en el transporte de proteínas desde citoplasma al núcleo (Zhou et al., 2008; Itoh et al., 2010). Por lo tanto resultaría importante analizar en el contexto de la infección por VPH, la interacción de PAR 3 con importinas nucleares.

Para poder analizar en profundidad las funciones de PAR 3 en el núcleo celular y en citoplasma, decidimos identificar las proteínas a las cuales PAR 3 se une en células expresando E6 18, llevando a cabo experimentos de espectrometría de masa. De esta manera se puede evaluar el *interactoma* de PAR 3, en ausencia o presencia de E6 18. Para esto, purificamos a la proteína PAR 3 y al complejo PAR 3-E6 18 a partir de extractos celulares, mediante resinas de afinidad. Los productos purificados fueron enviados a analizar con el espectrómetro de masa [LTQ Espectrómetro de masas tipo Trampa de Iones con fuente de ionización de *electrospray* (ESI) (Thermo Electron, EE.UU.)] del Servicio de Proteómica del Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología (ICGEB), Trieste. Lamentablemente, los resultados arrojados no fueron satisfactorios, ya que no pudimos identificar ninguno de los *partners* caracterizados y reportados previamente (sección 1.4.1.2), los cuales servían como control de la especificidad del estudio, invalidando así, el análisis llevado a cabo (Joberty et al., 2000).

De lo expuesto hasta el momento, surge la necesidad de estudios más profundos que permitan esclarecer la importancia biológica de la redistribución de PAR 3 hacia el núcleo, en el contexto de la infección viral y las consecuencias de esto en el desarrollo de las patologías asociadas.

Recientemente, y durante el desarrollo de este trabajo de Tesis, otros autores han reportado que, además de PAR 3, otras proteínas con funciones similares son relocalizadas hacia el núcleo en presencia de E6 (Hernandez-Monge et al., 2013). Hernández-Monge y

colaboradores han demostrado que la proteína E6 16 trasloca a ZO2 (perteneciente a las UT) desde los bordes celulares al núcleo y citoplasma en células MDCK (Hernández-Monge et al.). Esto sugiere que la deslocalización de proteínas pertenecientes a las UT, como PAR 3 y ZO2, constituye un mecanismo que podría contribuir a la transformación celular y el desarrollo de cáncer cervical asociado a VPH. Más aún, un reporte de Lelièvre y colaboradores indicó que algunas de las proteínas que regulan la polaridad apical pueden, en determinadas circunstancias, relocalizarse en el núcleo y reprimir la transcripción de genes con el objetivo de mantener el fenotipo diferenciado (Lelièvre, 2010). Asimismo, ha sido demostrado que cuando la polaridad apical se disrumpe, y las proteínas de las uniones celulares se disocian, pueden dirigirse al núcleo para regular la actividad transcripcional (Polette et al., 2005). Por lo tanto se podría especular que E6, al alterar la localización de PAR 3, podría facilitar su relocalización nuclear y su actividad como represor o activador de genes que faciliten la replicación viral.

Además, estudios llevados a cabo por Latorre y colaboradores, revelaron que la oncoproteína E4 ORF de Adenovirus, la cual posee el sitio PBM al igual que E6, es capaz de alterar la localización de ZO1, MUPP1, PATJ, ZO2 y MAGI de UT (Latorre et al., 2005). En dicho estudio, las proteínas conteniendo dominios PDZ son relocalizadas al citoplasma en presencia de la oncoproteína viral, lo que inhibe la formación de las UT y la polaridad celular en células epiteliales. Los autores también aseveran que el cambio de localización de ZO 1 favorece su relocalización nuclear y su actividad como factor de transcripción (Latorre et al., 2005). En células MDCK la expresión de E4 ORF, además, produce un cambio en la localización de PAR 3, lo que coincide con nuestros resultados e indicaría que proteínas derivadas de distintos virus tienen como blancos las mismas proteínas PDZ, como se detalló en la sección 1.3.5.1 II. Es importante destacar también, que en dicho estudio sólo comprobaron interacción de E4ORF con PATJ y ZO2, por lo tanto la deslocalización de las demás proteínas parecería ser un efecto indirecto (Latorre et al., 2005).

Resulta interesante mencionar que nuestros experimentos concuerdan con resultados previos de nuestro grupo y de otros, en donde se describió que en lesiones asociadas a infecciones por VPH, DLG1 y Scribble (blancos PDZ de E6 de alto riesgo) se expresan con una localización alterada, principalmente con una disminución de sus niveles en bordes celulares (Cavatorta et al., 2004; Nakagawa et al., 2004). El cambio en la localización de DLG1 y Scribble ocurre durante el proceso de progresión desde L-SIL a H-SIL, sugiriendo que durante el desarrollo oncogénico la deslocalización de estas proteínas podría alterar sus actividades biológicas constituyendo una causa o consecuencia de la transformación maligna (Cavatorta et al., 2004;

Nakagawa et al., 2004). Por ello, resultaría fundamental analizar los patrones de expresión de PAR 3 en biopsias derivadas de lesiones de distinto grado asociadas a VPH, de manera de evaluar la incumbencia de los hallazgos de este trabajo de tesis en la progresión maligna asociada a VPH.

Por lo tanto, uno de objetivos actuales de nuestro laboratorio consiste en la optimización de la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) para PAR 3, técnica que no pudo ser puesta a punto durante el presente trabajo. En reiterados intentos tratamos de optimizar la metodología utilizando biopsias derivadas de epitelio cervical y el anticuerpo de la empresa Santa Cruz (EE.UU.). Hemos evaluado la incorporación de diferentes métodos de exposición antigénica (TRIS 1M pH9-EDTA 0,25 M o Citrato 0,1 M pH6), así como distintas diluciones del anticuerpo primario, obteniendo en todos los casos una marca difusa a lo largo de todo el citoplasma. Sin embargo, recientemente han sido publicados trabajos acerca de la expresión de PAR 3 en biopsias derivadas de cáncer de mama, en donde se utilizaba para los análisis el anticuerpo PAR 3 de la empresa Millipore (EE.UU.), con resultados satisfactorios (McCaffrey et al., 2012; Xue et al., 2013). Más aún, dichos trabajos han sido claves para revelar la importancia de PAR 3 en la inhibición de la metástasis. A partir de esto, la optimización de la técnica de IHQ para PAR 3, dentro de nuestro grupo de investigación, y como continuidad del presente trabajo, se está realizando con el mencionado anticuerpo. Estos estudios permitirán analizar probables cambios en los patrones de expresión de PAR 3 durante el desarrollo tumoral, utilizando biopsias derivadas de lesiones de distinto grado de severidad y evaluar su potencial uso como un biomarcador pronósticos de lesiones VPH-positivas (de Freitas et al., 2014).

Esta técnica, una vez optimizada, también será importante para analizar la expresión de PAR 3 en cultivos tipo *raft* generados a partir de queratinocitos expresando las secuencias genómicas de VPH (véase sección Introducción 1.3.2). Estos cultivos organotípicos han sido recientemente implementados en nuestro laboratorio y constituyen una herramienta esencial para investigar los mecanismos carcinogénicos asociados a VPH (Boccardo et al., 2004; Andrei et al., 2010). Esto último dado la estricta dependencia del ciclo de replicación de VPH con la diferenciación del epitelio infectado (sección 1.3.2). Así, el análisis de los niveles y patrones de expresión de PAR 3 en cultivos *raft*, como perspectiva de esta Tesis, permitirá establecer en qué momento se produce la alteración de la localización del marcador por E6, en relación al ciclo de replicación viral. Además, dichos datos podrán ser cotejados con los resultados obtenidos utilizando muestras derivadas de biopsias cervicales.

Siguiendo las hipótesis planteadas en el inicio de esta Discusión, nos propusimos analizar la interferencia de E6 sobre otros componentes del complejo PAR (aPKC y PAR 6). Es necesario

aclarar que las tres proteínas que forman parte del complejo interactúan entre sí, por lo tanto, si E6 ejerce un efecto sobre una de ellas, esto podría tener consecuencias sobre el complejo. Para esclarecer esta situación, en primera instancia analizamos los niveles de PAR 6 y aPKC en presencia de E6 16 y E6 18. Los ensayos de degradación *in vitro* indicaron que no se produjeron cambios significativos en los niveles de ninguna de las proteínas en presencia de E6 (Figura 4.28). Además, analizamos los niveles proteicos de aPKC *in vivo*, tanto totales como la fracción activada de aPKC, aPKC P, fosforilada en el residuo Thr410 (McCaffrey et al., 2012) (Figura 4.29 y 4.30). Observamos que no se producen cambios en los niveles totales de aPKC, en células VPH positivas como HeLa y CaSKi, pero sí en los niveles de la fracción aPKC P (Figura 4.29). Nuestros resultados concuerdan con los de otros autores que demostraron que en células derivadas de tumores de cabeza y cuello, aPKC se encuentra fosforilada en Thr 410, demostrándose, además, un incremento en la fosforilación (activación) de aPKC durante la progresión maligna (Cohen et al., 2006). Sin embargo, ninguno de los tumores analizados estaba asociado a la presencia de VPH, por lo que los hallazgos de la presente Tesis constituyen el primer reporte en que se asocia la activación de aPKC en células VPH-positivas. Es importante destacar que la activación aPKC está implicada en la progresión tumoral, incluyendo la desregulación la proliferación celular, supervivencia, migración y angiogénesis (Cohen et al., 2006). Además, la activación de aPKC ha sido reportada en cáncer de mama, en donde se demostró que facilita los procesos de metástasis al activar la vía JAK-STAT (del inglés *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*), la cual es la responsable del comportamiento invasivo (McCaffrey et al., 2012). La activación de esta vía también se observó en modelos de carcinoma cervical, pero hasta el momento no se había establecido la causa de dicha activación. Por lo tanto, podría especularse que el incremento de la fracción fosforilada de aPKC podría contribuir a la activación de la vía JAK-STAT en tumores asociados a VPH (Chen et al., 2007; Schroer et al., 2011; Shukla et al., 2013). Además, también ha sido descrito que durante la infección con HSV8 se induce la activación de aPKC, siendo importante para la infección viral (Naranatt et al., 2003). Por lo anteriormente expuesto, resultaría interesante analizar la expresión de aPKC P en biopsias derivadas de cuello de útero, investigando su importancia en el desarrollo de cáncer cervical y, por ende, evaluar si podría ser utilizado como un potencial biomarcador.

Para estudiar si E6 estaba implicada en la activación de aPKC decidimos silenciar en células HeLa la expresión de E6 18. Los resultados obtenidos demostraron que la ablación de E6 no tiene como consecuencia cambios en los niveles de aPKC P (Figura 4.30). Por lo tanto, la activación de aPKC no sería un evento estimulado por la expresión de E6 18. Además, el silenciamiento de E6 en células HeLa restaura la expresión de PAR 3 en los bordes celulares

(Figura 4.7), y en esas condiciones, los niveles de aPKC siguen altos. Por lo tanto, la redistribución de PAR 3 en presencia de E6 no dependería de cambios en aPKC como tampoco la activación de aPKC dependería de la localización de PAR 3 en estas condiciones (infección con VPH). Sin embargo, tal como se mencionó en la sección Introducción 1.4.1.2, otras quinasas pueden fosforilar a PAR 3 regulando su localización, tal es el caso de PP1 α entre otras. La fosforilación/desfosforilación de PAR 3 depende del contexto celular y, por lo tanto, resultaría trascendente analizar el estado de activación o no de quinasas en el contexto de una infección por VPH.

Por otro lado, en lo que respecta al tercer integrante del complejo PAR, PAR 6, no hemos podido analizar hasta el momento el efecto de E6 sobre su expresión *in vivo*. Esto debido a que los anticuerpos disponibles no fueron eficientes en la detección de la proteína ni en experimentos de IF o WB. Sin embargo, el análisis de la situación de PAR 6 en células expresando E6 18 o E6 16 resultaría importante, ya que además de poseer un sitio PDZ, con el cual potencialmente podría interactuar con las oncoproteínas E6, ha sido demostrado que actúa como una proteína de andamiaje que facilita las funciones de aPKC (Cline and Nelson, 2007; Pieczynski and Margolis, 2011). También se describió que PAR 6 es capaz de interactuar con la proteína LGL (complejo SCRIB), y con Crumbs y PALS (complejo CRUMB), regulando la localización de proteínas involucradas en el establecimiento de la polaridad celular (Pieczynski and Margolis, 2011). Por lo tanto, resultaría fundamental analizar la situación de PAR 6 en el contexto de una infección con VPH.

El tercer fenómeno que planteamos como mecanismo posible para explicar el cambio en la localización celular de PAR 3 en presencia de E6, consistía en la interferencia de E6 sobre la unión PIs-PDZ (Wu et al., 2007). Para abordar esta hipótesis, en primera instancia, estudiamos la distribución de los PIs en células epiteliales, cuya interacción con PDZ se había señalado como importante para la regulación de la polaridad. En particular, decidimos analizar la distribución de PI(4,5)P2 el cual es el más abundante de los PIs. Además, es un importante integrador de señales durante la proliferación y polaridad celular, para lo cual debe adquirir una localización subcelular determinada en la zona apical de células polarizadas (Bunney and Katan, 2010). Para el análisis de la localización subcelular de PI(4,5)P2 entonces, decidimos utilizar biosensores que poseen dominios de interacción con dichos lípidos. En la Figura 4.34 pudimos observar que la expresión de E6 18 alteraba la distribución en membrana de los PI(4,5)P2. Específicamente, observamos una distribución difusa del biosensor desde membrana a citoplasma, con la formación de vesículas. Este efecto parecería ser dependiente del PBM, ya que no observamos

dichos cambios en aquellas células que expresaban E6 18mut (Figura 4.34C), indicando que esta función dependería de la capacidad de E6 de interactuar con proteínas PDZ. Es importante destacar que por cuestiones técnicas, no pudimos llevar a cabo este experimento en el sistema de cultivos histotípicos (véase sección 4.1.5), y, por lo tanto, no fue posible analizar el cambio de localización de los PIs a lo largo del eje Z. Esto último resultaba muy interesante ya que la distribución de lípidos es mucho más relevante de analizar en sistemas en donde se induce la polarización de la célula, como el sistema de Matrigel que desarrollamos (secciones 1.4.2 y 4.1.5). Dicho inconveniente se basó en que la transfección de las líneas E6-positivas no fue efectiva en células cultivadas sobre Matrigel, ya que las células transfectadas eran escasas, y estaban deterioradas a nivel morfológico.

Es importante destacar que los biosensores que detectan los distintos PIs han sido utilizados y avalados por otros autores en análisis de distribución de PIs; sin embargo, ha sido demostrado que presentan algunas limitaciones (Varnai et al., 2007; Wu et al., 2007; Ivarsson et al., 2013). Entre ellas, se vio que la expresión de los biosensores tiene numerosos efectos sobre la biología de las células, ya que el biosensor secuestraría un *pool* de PIs. Por lo tanto, los PIs unidos al biosensor no podrían interactuar con sus efectores naturales, ni serían capaces de ser interconvertidos en otras especies, ya que no estarían accesibles a las fosfatasas/quinasas correspondientes (Varnai and Balla, 2006; Varnai et al., 2007). Otros autores señalan que la mejor manera de llevar a cabo el análisis de la localización y los cambios dinámicos de los PIs sería por microscopía en tiempo real en células vivas (Varnai et al., 2007). También, hay evidencias que indican que el dominio PH en su forma no plegada, podría interactuar con proteínas de membrana, lo que dependería de sus niveles de expresión (Lemmon, 2004; Varnai et al., 2007). Por ello, en los análisis llevados a cabo en esta Tesis transfectamos con la mínima cantidad posible del vector expresando tal dominio, para evitar este inconveniente.

Como perspectiva de este punto, y para poder analizar y cuantificar de manera más precisa los cambios observados en los niveles y distribución de los PIs, sería conveniente llevar a cabo ensayos de FRET (del inglés *Fluorescence resonante energía transfer*). Dichos ensayos permitirían cuantificar los cambios en la localización de PI(4,5)P2 relacionándolos con la distribución de algún marcador conocido de membrana (Varnai et al., 2007).

Por otra parte, los niveles y distribución de los PIs dependen de la actividad de fosfatasas y quinasas (Shewan et al., 2011). La distribución espacial y niveles de PI(4,5)P2 dependen, entre otras enzimas, de la actividad de PTEN, cuya localización y estabilización está mediada por PAR 3 y MAGI (Wu et al., 2000; Wu et al., 2007; Shewan et al., 2011) (Figura 1.12). Es importante

destacar que MAGI y PAR 3 son blancos de E6, y por lo tanto, cambios en la expresión de estas proteínas, podrían resultar en defectos en la segregación y niveles de los PIs como observado en la Figura 4.34 C.

En este sentido, distintos autores han reportado una reducción de los niveles de PTEN en biopsias derivadas de lesiones asociadas a infecciones por VPH. Sin embargo, dicha disminución estaría vinculada con mecanismos epigenéticos de metilación de su promotor (Cheung et al., 2004; Lee et al., 2006; Lu et al., 2012). Por otro lado, numerosos trabajos han demostrado un aumento en la actividad de PI3K en células derivadas de cáncer cervical, en asociación con la amplificación génica de la región 3q24–29, donde se localiza su gen codificante (Ma et al., 2000; Bertelsen et al., 2006). Sin embargo, hasta el momento existen discordancias acerca de las vías que modulan la activación de PI3K en un modelo de infección por VPH. Algunos reportes sugieren que se debe a la acción de E7 (Pim et al., 2005), mientras que otros se refieren a una activación de PI3K mediada por E6 (Contreras-Paredes et al., 2009). Así, la desregulación de la vía PTEN/PI3K podría contribuir a explicar los cambios encontrados en la distribución de PIs en células HeLa (Figura 4.34 B). No obstante, más estudios son necesarios para esclarecer precisamente los mecanismos moleculares involucrados.

A *posteriori*, analizamos si E6 puede interferir en la interacción específica PIs-PAR 3, importante para la asociación de PAR 3 a la membrana. Para poder investigar esto utilizamos lípidos inmovilizados en membranas (Echelon, EE.UU), las cuales se incubaron con distintos blancos de E6 conteniendo dominios PDZ (Figura 4.35). Una vez optimizado el sistema de estudio de interacción PDZ-PIP *in vitro*, analizamos si la presencia de E6 de alto riesgo interfería en la interacción entre PIs y PAR 3. Los resultados obtenidos (Figura 4.36 y 4.37), son los primeros en demostrar que, tanto la presencia de un péptido conteniendo la secuencia PBM de E6 18 como la expresión de la proteína, interfieren con los patrones de interacción PIs-PAR 3. Ha sido demostrado que PAR 3 es capaz de interactuar con distintas especies de PIs, las cuales varían en su estado de fosforilación y cumplen con funciones específicas en los mecanismos de traducción de señales (Figura 1.10) (Wu et al., 2007). Demostramos, que la presencia de E6 produce una interferencia en la interacción de PAR 3 con PI(3,4,5)P3 y con PIs difosfatos en general (Figuras 4.36 y 4.37). De manera sorprendente, en cambio, la proteína viral estimularía una mayor interacción PAR 3-Pis monofosfato. Por lo tanto, la presencia del PBM o de E6 18, podría alterar la afinidad de PAR 3 por los distintos PIs. Si bien la bibliografía reporta que la unión de PAR 3 con PIs mono, di o trifosfatos tiene afinidades comparables (Wu et al., 2007), se podría especular que E6 en algunos casos facilitaría la interacción (como para los monofosfato) y en otros competiría por la unión a PAR 3 (para los PIs difosfato y trifosfato). Esto último teniendo

en cuenta que los ligandos peptídicos pueden competir con PIs por la unión a PDZ, lo que parecería ser el caso para los PIs di- y trifosfato (Ivarsson et al., 2013). En otros casos, sin embargo, los péptidos podrían favorecer la interacción PDZ-PIs, lo que explicaría lo observado para los PIs monofosfato (Ivarsson et al., 2013). Por lo tanto, la presencia del PBM o de E6 18, alteraría la afinidad diferencial de PAR 3 por las distintas especies de PIs.

Sin embargo, estos experimentos *in vitro* presentan la limitante de que los PIs empleados no se encuentran en las membranas celulares complejas que representan su ambiente natural, lo que podría alterar las afinidades de las diferentes interacciones. Esta limitación se podría solucionar llevando a cabo los ensayos utilizando liposomas conteniendo los PIs de interés, en combinación con los ensayos *in vivo* utilizando los biosensores descritos previamente en esta Tesis (Wawrzyniak et al., 2013). No obstante, los resultados obtenidos en esta Tesis, aunque preliminares, son importantes en el análisis de la interferencia de E6 en la interacción PDZ-PIs, lo que podría tener consecuencias dramáticas sobre las distintas funciones que los diferentes PIs desarrollan en la célula.

En conjunto, los resultados discutidos hasta el momento, sugieren que los cambios en la distribución de PI(4,5)P₂, y de los patrones de interacción PIs-PAR 3, en el contexto de una infección por VPH podrían tener consecuencias en el rol de los PIs en la vías de transducción de señales. Esto último considerando que, como fuera descrito en la sección 1.4.2, la unión de PAR 3 a PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃ es esencial para el reclutamiento de PTEN y su correcta actividad oncosupresora. Por lo tanto, una deficiencia en dichas interacciones debido a la presencia de E6 18 conllevaría a la desregulación de la vía PTEN/PI3K, y a una pérdida del control de la proliferación celular. Por otro lado, los PIs monofosfatos, en especial PI3P y PI4P, están involucrados en las vías de tráfico vesicular (Ivarsson et al., 2013; Shah et al., 2013). En este caso, el aumento de la intensidad de interacción de dichos PIs con PAR 3 en presencia de E6, podría indicar una función de PAR 3 no reportada hasta el momento en cuanto al tráfico vesicular, durante la infección por VPH. A partir de este resultado, se desprende la necesidad de profundizar las actividades de E6 respecto a la distribución y función de los PIs, y de la expresión de las enzimas involucradas en la regulación de sus niveles, como aquellas de la vía PTEN/PI3K.

Siguiendo con la línea de pensamiento planteada al inicio de esta sección, analizamos si cambios en la expresión de otros blancos de polaridad de E6 indirectamente podrían contribuir a la deslocalización de PAR 3. Así, investigamos si el silenciamiento de DLG1 y Scribble, pertenecientes al complejo SCRIB (Pieczynski and Margolis, 2011), ejercía alguna influencia sobre la localización de PAR 3. Esto último teniendo en cuenta que los complejos de polaridad

celular están interconectados entre sí, y que Scribble y DLG 1 son degradadas por E6. Mediante técnicas de IF (Figuras 4.38, 4.39 y 4.40), pudimos comprobar que efectivamente el silenciamiento de la expresión de DLG1 o de Scribble tiene un efecto sobre la expresión de PAR 3. Sin embargo, al silenciar a PAR 3 no observamos alteraciones en la distribución de DLG1 o de Scribble (Figura 4.38). Por lo tanto, si bien las proteínas que forman parte del complejo de polaridad celular SCRIB están involucradas en la regulación de las UA, también tienen una influencia en la formación de las UT, al regular la localización de PAR 3, elemento fundamental de dichas uniones. Es importante destacar que este resultado concuerda con los de otros autores en otros modelos, ya que existen reportes que indican que Scribble estaría involucrado en la regulación de las UT, tanto en epitelio intestinal (Ivanov et al., 2010), como en células MCF10A (Elsum et al., 2013). Además, se ha reportado que DLG1 es importante en la formación de las UT en células CaCo2 (Stucke et al., 2007). Sin embargo, en dichos estudios la distribución de PAR 3 no había sido analizada. De los datos anteriores se puede especular que en el contexto de la infección viral, la degradación de Scribble o de DLG1 por parte de E6 podrían explicar, en parte, las alteraciones en la localización de PAR 3 observadas. Para completar estos análisis, sería necesario estudiar si estas proteínas interactúan entre sí, directamente o a través de la formación de complejos multiproteicos, lo que hasta el momento no fue reportado. Es importante destacar que nuestros estudios fueron los primeros que reportaron la influencia del silenciamiento de Scribble o DLG1 sobre la deslocalización de PAR 3.

En los experimentos en donde utilizamos la línea celular estable HaCaT-siDLG1 (Figura 4.40) pudimos observar un cambio en la localización de PAR 3, con una disminución del marcador en los bordes celulares al igual que en los silenciamientos individuales. No obstante, y sorprendentemente, en esta línea, observamos expresión de PAR 3 en el núcleo, lo que no habíamos notado en los experimentos en la línea celular HaCaT-siScribble. Demostrándose que la localización nuclear de PAR 3 observada en células que expresan E6 18 y E6 16 puede ser un efecto secundario de la degradación de DLG 1 mediada por E6 de alto riesgo oncogénico aunque los mecanismos que median la translocación de PAR 3 sean desconocidos. Es importante destacar, además, que la línea celular HaCaT-siDLG1 es la que más se asemeja a HeLa, donde los niveles de DLG1 son bajos por efecto de la expresión de E6 18. Como se mencionó anteriormente, DLG1 es un blanco preferencial de E6 18 y, por ello, sus niveles se encuentran altamente disminuidos ante la expresión de dicha oncoproteína viral.

A partir de lo mencionado anteriormente, surge la necesidad de evaluar si existe interacción de PAR 3 con Scribble o con DLG1 en ausencia de E6, lo que podría de alguna manera esclarecer los resultados.

En las Figuras 4.39 y 4.40, además, pudimos observar que el silenciamiento de Scribble tenía un efecto sobre el patrón de expresión de DLG1, y en menor medida, DLG1 influenciaría la expresión de Scribble. Esto indicaría que existe una dependencia entre los dos componentes de complejo SCRIB en lo que respecta a la localización de cada una de las proteínas. De hecho, estudios llevados a cabo en *Drosophila* demostraron que existía una interdependencia entre los tres componentes del complejo SCRIB en lo que respecta a la localización subcelular de sus miembros (Bilder et al., 2000). Sólo un trabajo ha analizado la interdependencia de las proteínas que constituyen el complejo de polaridad celular SCRIB en mamíferos. En dicho reporte, se observó que el silenciamiento de la expresión de Scribble o de DLG1 tiene como consecuencia cambios en la localización del otro componente (Massimi et al., 2008), en concordancia con las observaciones realizadas en las Figuras 4.39 y 4.40 de la presente Tesis. En el trabajo de Massimi y colaboradores, la ablación de Scribble resultaba en una disminución en los niveles de DLG1 asociado a membrana, mientras que la ablación de DLG1 afectaba la localización de Scribble, aunque con un efecto menos marcado, lo que concuerda con nuestros resultados (Figuras 4.39 y 4.40)(Massimi et al., 2008).

Por último, uno de los pasos críticos para el establecimiento de la asimetría celular que caracteriza a las células polarizadas es la formación de las UT, por lo tanto defectos en la formación de las mismas tendrá como consecuencia defectos en el establecimiento de la polaridad celular (Aono and Hirai, 2008). Ha sido demostrado que la proteína PAR 3 y otras proteínas conteniendo dominios PDZ blancos de E6, como MAGI y PATJ, son componentes importantes para las UT. Entonces en este trabajo de Tesis decidimos evaluar, también, el rescate de la polarización celular, mediante ensayos clásicos de cambio en la concentración de calcio, utilizando para este objetivo células que expresaban E6 18. Dicha técnica ha sido utilizada por numerosos autores para evaluar la repolarización celular, luego de la sustracción de calcio extracelular que media las interacciones celulares (Iden et al., 2012; Twiss et al., 2012). En principio, pusimos a punto la técnica en nuestro laboratorio, y evaluamos el restablecimiento de las uniones celulares utilizando como marcador a la proteína de UT ZO1. Los resultados demostraron que las células que expresaban E6 18 presentaban un retraso en la restauración de las uniones celulares, comparando con células control (Figuras 4.31 y 4.32). En contraste, la expresión de ZO1 fue similar en células que expresaban o no E6 18 a partir de 3 horas posteriores al agregado del calcio extracelular, indicando que E6 18 interferiría sobre factores requeridos para la repolarización durante las etapas iniciales de la formación de las UT. Se ha descrito recientemente que PAR 3 es una de las proteínas que participaría en la formación temprana de tales uniones, por lo tanto, la alteración en su localización podría considerarse un mecanismo

probable que explique lo observado en los ensayos de cambios de la concentración de calcio (Iden et al., 2012). Además, nuestros resultados concuerdan con los de otros autores que han reportado que las UT se disrumpan en células VPH-positivas, coincidiendo en todos los casos que el efecto esta mediado por E6, si bien en dichos estudios no se había analizado la formación de las mismas en el tiempo (Nakagawa and Huibregtse, 2000; Kranjec and Banks, 2011). Sin embargo, los distintos trabajos señalaban como responsables a distintos blancos de E6. Entonces, para conocer con certeza cuál de sus blancos es el responsable del retardo en la repolarización celular sería necesario realizar ensayos de cambio en la concentración de calcio en células silenciadas para cada una de las proteínas en particular.

Es importante destacar que otra forma de evaluar la influencia de E6 18 sobre la formación de las UT es mediante experimentos de resistencia transepitelial. Estos experimentos miden la capacidad de células epiteliales cultivadas en monocapa de formar un sello impermeable, a través del ensamblado de las UT. Esta metodología sería complementaria a la que hemos descrito anteriormente, y nos permitiría cotejar de manera cuantitativa si E6 perturba funcionalmente las UT y la polaridad. Además, a pesar de que mediante los análisis de cambios en la concentración de calcio pudimos detectar un retraso en el restablecimiento de las UT, todavía no podemos afirmar si este efecto depende específicamente de su interacción con proteínas PDZ, o si hay otros factores involucrados. Esto se debió a la imposibilidad de desarrollar la línea celular que expresara establemente la mutante en el sitio de interacción con PDZ (E6 18mut), y que nos permitiera técnicamente completar los ensayos de cambios en la concentración de calcio.

En este estudio entonces contribuimos al análisis general de las consecuencias de la expresión de E6 18 sobre la repolarización celular y el restablecimiento de las UT. Es importante destacar que en los últimos años han sido reportados una serie de trabajos que señalan el rol de las proteínas que conforman las UT en la proliferación celular, diferenciación, transformación y metástasis, relacionando a las UT con los procesos carcinogénicos (Runkle and Mu, 2013). Entonces, debido a la participación de las UT en el control de la proliferación y diferenciación celular, se podría especular que la interferencia de E6 sobre los componentes de las UT, podría ser requerido para la replicación viral y la transformación celular.

En conjunto, hemos demostrado que la proteína E6 derivada de VPH de alto riesgo es capaz de interferir con factores importantes para la polaridad celular, como la proteína PAR 3 y la distribución de los PIs, entre otros. Nuestros análisis aportan significativamente al conocimiento de los mecanismos relacionados a las transformaciones malignas asociadas a las

infecciones con VPH. Los cambios observados en la localización de PAR 3, principalmente su ausencia en los bordes celulares, pueden tener un efecto dramático en sus funciones durante la polarización celular. Lo que aún falta dilucidar es el impacto individual de cada uno de los mecanismos que contribuyen a la deslocalización de PAR 3 analizados en la presente Tesis, y resumidos en la Figura 5.2, para lo cual deberían realizarse algunos de los estudios planteados como perspectivas. Teniendo en cuenta que en los últimos años ha sido descripta la actividad de PAR 3 como inhibidor de metástasis en cáncer de mama y en cáncer de piel (Iden et al., 2012; McCaffrey et al., 2012; Xue et al., 2013), sería relevante analizar el escenario que se presenta en el análisis de su expresión en biopsias derivadas de lesiones cervicales asociadas a VPH, y evaluar su participación durante los procesos de progresión maligna (Pegtel et al., 2007; Schmoranzner et al., 2009).

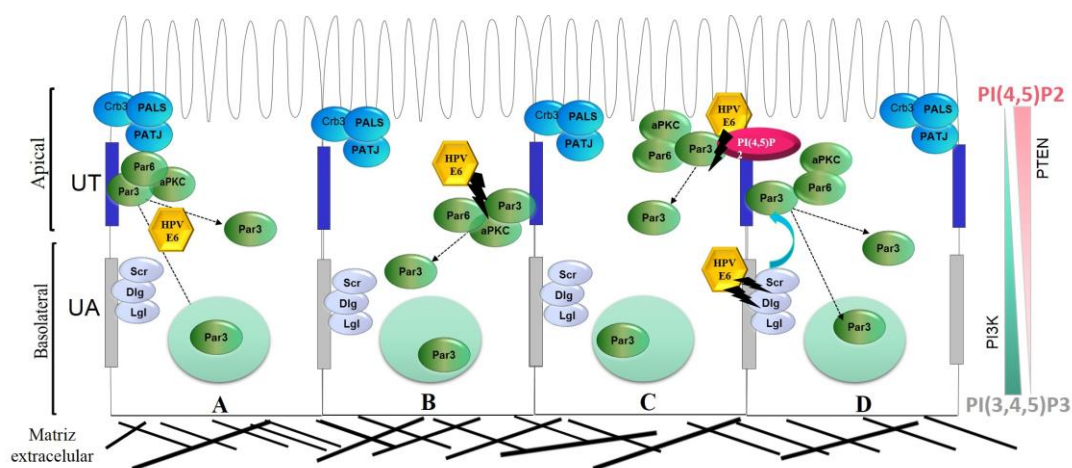
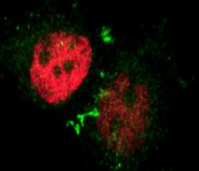


Figura 5.2: Representación esquemática de los distintos mecanismos que pueden explicar los cambios en la localización de PAR 3 mediados por la oncoproteína E6. A) Interacción PAR 3-E6 que pueda mediar la relocalización de PAR 3 a núcleo y/o citoplasma. B) Alteraciones mediadas por E6 sobre la expresión de otros componentes del complejo PAR. C) Interferencia de E6 sobre la unión PI(4,5)P2-PAR 3, fundamental para la localización de PAR 3 en membrana plasmática. D) Mecanismo indirecto mediado por la alteración de E6 sobre componentes del complejo SCRIB.

En resumen, este trabajo de Tesis Doctoral contribuye al conocimiento integral de los procesos de progresión maligna asociados a VPH, y, específicamente, al entendimiento de los mecanismos a través de los cuales la oncoproteína viral E6, mediante la interacción con proteínas con dominios PDZ, estimula la pérdida de polaridad celular asociada a procesos carcinogénicos.

Conclusiones



En el primer Capítulo de este trabajo de Tesis, analizamos la interferencia de la expresión de la oncoproteína E6 sobre el complejo de polaridad celular PAR, lo cual constituía uno de los principales objetivos planteados. En particular, decidimos analizar en primera instancia la interferencia de la oncoproteína E6 sobre la proteína PAR 3, la cual presenta tres dominios PDZ con los cuales E6 podría interactuar, y es una proteína clave para el mantenimiento de la polaridad celular. Los resultados indicaron que en aquellas células expresando E6 16 o E6 18 la proteína PAR 3 se encontraba deslocalizada. En dichas células la expresión de PAR 3 en los bordes celulares estaba disminuida con una redistribución a lo largo del citoplasma y núcleo.

Comprobamos que dichos cambios dependen del sitio PBM presente en el extremo carboxilo terminal de E6 18, ya que las mutantes no perturbaron la localización de PAR 3. Esto indicaría que esta nueva actividad de E6 es PDZ-dependiente.

Optimizamos en nuestro laboratorio cultivos histotípicos para poder estudiar la interferencia de E6 sobre la localización de PAR 3, y llevar a cabo análisis de polaridad celular. Una vez optimizado el sistema de cultivos histotípicos, pudimos utilizar dicha herramienta para evaluar el cambio en la localización de PAR 3 en el eje *apicobasal*. Los resultados indicaron que la expresión de E6 16 o E6 18 alteró la localización apical de PAR 3.

Establecimos la importancia del desarrollo de cultivos histotípicos para estudios de disfunciones de las células epiteliales, lo que nos permitió adquirir experiencia en el análisis de la distribución de proteínas mediante el uso de microscopio confocal.

Comprobamos la interacción entre PAR 3 y E6 18, de manera PDZ-dependiente. Demostramos que dicha interacción no tiene como consecuencia la estimulación de la degradación de PAR 3, como ocurre en el caso de otros blancos de E6.

Por análisis de fraccionamiento celular constatamos los cambios en la localización de PAR 3 en células que expresan E6 18, los cuales habían sido observados por técnicas de IF, verificándose la redistribución de PAR 3 hacia el núcleo y citoplasma en aquellas células que expresan la oncoproteína viral.

De acuerdo a los resultados de la primera parte de este trabajo de Tesis, postulamos que los cambios en la localización de PAR 3, y su ausencia en los contactos célula-célula podrían alterar sus actividades funcionales.

Este trabajo de Tesis ha permitido identificar un nuevo blanco de la proteína E6 de VPH, una proteína celular con dominios PDZ con importantes roles en el mantenimiento de la polaridad y mecanismos de traducción de señales.

Teniendo en cuenta que PAR 3 es crítico para el establecimiento de las UT, la polaridad *apicobasal*, y, además, actuaría como un oncosupresor en una amplia variedad de procesos tumorales, esta nueva función de E6 podría contribuir con la transformación maligna y los procesos carcinogénicos asociados a VPH.

La incorrecta localización de esta proteína podría contribuir a explicar muchas de las características de las células malignas tales como la ausencia de polaridad, alteraciones en las uniones intercelulares y la capacidad de migración.

Analizamos la interferencia de E6 sobre las otras proteínas que componen el complejo PAR. Demostramos por primera vez para un modelo de oncogénesis asociado a VPH, que en células derivadas de carcinoma cervical se produce una activación de aPKC, con un aumento de su fosforilación en el residuo Thr 410. Sin embargo, observamos también que dicha activación no depende de la presencia de E6, por lo que otros mecanismos presentes en la célula transformada por VPH estarían implicados en este proceso.

En el Capítulo 2, observamos, que la presencia de E6 18 ocasiona un retardo de la repolarización celular, lo que determinamos por ensayos de cambio en la concentración de calcio, optimizados por primera vez en nuestro laboratorio. Además, demostramos que la alteración mediada por E6 en la restauración de las UT, se produce en las fases iniciales de dicho proceso. A partir de este hallazgo, y teniendo en cuenta las funciones de PAR 3, proponemos que la interferencia de E6 sobre PAR 3 modularía dicho evento.

Ha sido descrito que PAR 3 es capaz de interactuar con PIs mediante sus dominios PDZ, lo que contribuye a la localización de PAR 3 en membranas celulares. Por lo tanto decidimos analizar si E6 podría interferir en dicha interacción. Utilizando biosensores fluorescentes que permiten analizar la distribución celular de PI(4,5)P2, comprobamos que aquellas células que expresaban E6 18 presentan un cambio en el patrón de distribución de dicho PIs, de una manera PDZ-dependiente. Por lo tanto, si bien los resultados son preliminares, se podría especular que E6 18 también estaría alterando los mecanismos que regulan la localización y los niveles de dichos lípidos. Los PIs, además de ser importantes en los procesos de polaridad celular, están involucrados en mecanismos de traducción de señales, tráfico vesicular y control de la

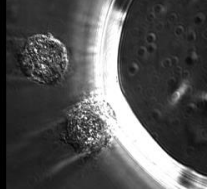
proliferación celular por lo que la alteración de su distribución mediada por E6 podría tener efectos dramáticos en sus funciones.

Determinamos, a partir de ensayos de interacción *in vitro*, que la presencia del sitio PBM de E6 18 o de la proteína E6 18 completa, provocan un cambio en el patrón de interacción PAR 3-PIs, lo que podría traer como consecuencia la alteración de la localización de PAR 3 y/o de los PIs o bien de sus actividades específicas.

Por último, analizamos si la ablación de DLG 1 o Scribble, blancos de E6, tienen consecuencias sobre la localización de PAR 3. Esto último considerando que los complejos de polaridad celular son complejos dinámicos interconectados entre sí. Por lo tanto, si se producen cambios en la localización o niveles de alguno de los componentes esto podría tener consecuencias sobre los demás. Demostramos entonces que, la ablación de DLG1 o Scribble provocan cambios en la expresión de PAR 3, con una disminución en los bordes celulares. Así, describimos por primera vez en este estudio, la influencia de las proteínas del complejo de polaridad SCRIB sobre la localización de PAR 3. Este resultado fue interesante a la luz de que DLG1 y Scribble son blancos de E6, y su degradación en el contexto de la infección por VPH, podría ocasionar la redistribución de PAR 3.

Como conclusión general de este trabajo podemos indicar que hemos caracterizado a PAR 3 como un nuevo blanco de E6. Además, contribuimos a la profundización del conocimiento integral de las causas que conllevan a la pérdida de la polaridad celular durante los procesos de progresión maligna asociados a VPH y observada, en general, en diferentes tumores.

Resumen



Los VPH de alto riesgo, como VPH 16 y 18, se asocian con el desarrollo de carcinomas de cuello de útero y de las lesiones neoplásicas precursoras. Dado que el cáncer cervical representa, después del de mama, el segundo cáncer más frecuente entre mujeres de todo el mundo, VPH es considerado un importante agente carcinogénico (<http://www.msal.gov.ar>). Las funciones oncogénicas de VPH residen en las proteínas virales E6 y E7 que interfieren con proteínas celulares regulatorias. Entre los blancos celulares de E6 se encuentran proteínas con dominios proteicos específicos denominados PDZ (PSD-95, DLG1, ZO-1) (Thomas et al., 2008b). Los dominios PDZ son motivos conservados y específicos de reconocimiento proteína-proteína que permiten el reclutamiento de péptidos y la formación de complejos multiproteicos en sitios especializados de la membrana, con función en la transmisión de señales (Javier and Rice, 2011). Muchas de estas proteínas son componentes de las uniones intercelulares y participan del mantenimiento de la polaridad celular. La interacción entre E6 y proteínas PDZ involucra la región C-terminal (T/SXV/L) altamente conservada de E6, que constituye un sitio de unión consenso a dominios PDZ (PBM), y se ha demostrado que en algunos casos esta interacción resulta en la degradación de las proteínas PDZ (Gardiol et al., 1999; Thomas et al., 2002). Por otro lado, la pérdida de polaridad celular es un evento clave en el desarrollo de carcinogénesis y su regulación depende, en parte, de la integridad de las UT (Aranda et al., 2008).

Basados en esta información y con el objetivo de analizar la interferencia de la proteína E6 de VPH sobre con la estructura de las UT, en el Capítulo 1 analizamos la expresión de uno de los componentes del complejo de polaridad celular PAR, la proteína PAR 3. Dicha proteína contiene tres dominios PDZ con las cuales potencialmente las proteínas E6 de VPH de alto riesgo podrían interactuar; además, otros autores señalaron una interacción débil en ensayos *in vitro* de PAR 3 con E6 18 (Tomaic et al., 2008). PAR 3 es un elemento clave para la conformación de las UT, por lo tanto el estudio de la interferencia de E6 sobre ella podría explicar la pérdida de la arquitectura celular observada en carcinomas asociados a VPH. Mediante ensayos de IF observamos que la expresión de E6 16 o de E6 18 altera la localización de PAR 3, tanto utilizando cultivos convencionales como en cultivos histotípicos, los cuales fueron optimizados por primera vez en el Laboratorio. Asimismo, pudimos comprobar que el PBM de E6 18 es fundamental para dicha función, ya que la expresión de una mutante en el PBM de E6 18 no altera la localización de PAR 3.

Por otro lado, pudimos comprobar interacción *in vivo* entre PAR 3 y E6 18, de una manera PDZ-dependiente. Comprobamos que dicha interacción no tiene como consecuencia la degradación proteica de PAR 3, como ocurre con otras proteínas blanco de E6 conteniendo

dominios PDZ, como Scribble y DLG1 (Gardioli et al., 1999; Nakagawa and Huibregtse, 2000). Por ensayos de fraccionamiento celular, demostramos la relocalización citoplasmática y nuclear de PAR 3 en aquellas células que expresan E6 18.

Estos datos sugieren que los cambios en la ubicación subcelular de PAR 3, y su ausencia en el contacto célula-célula podrían contribuir con la transformación maligna y los procesos carcinogénicos en general, ya que para llevar a cabo sus funciones regulatorias, PAR 3 necesita adquirir una localización asociada a membrana en la región apical (Pieczynski and Margolis, 2011). Para explicar las diferencias de localización de PAR 3 observadas, investigamos los probables mecanismos celulares que puedan mediar dicho cambio. Para lo cual analizamos en primera instancia, la interferencia que pudiera tener E6 sobre otros componentes del complejo PAR, como aPKC (Joberty et al., 2000). Los resultados indicaron que la proteína aPKC se encuentra activada en líneas celulares derivadas de carcinoma cervical, como HeLa o CaSki, lo que podría tener consecuencias sobre las proteínas que aPKC fosforila. Sin embargo, E6 no contribuye a dicha activación siendo desconocidos los mecanismos implicados.

Asimismo, la polaridad celular también requiere la correcta distribución de lípidos de membrana de tipo PIs, que a su vez están involucrados en los mecanismos de traducción de señales importantes para el control de la proliferación celular (Martin-Belmonte and Mostov, 2007). Las proteínas celulares PDZ presentes en las UT interactúan con este tipo de lípidos y esta interacción es relevante para la correcta distribución de PIs (Ivarsson et al., 2013). Por ello, investigamos si la unión PDZ-E6 podría interferir con la localización y función de tales lípidos. Con este propósito, analizamos las diferencias en la distribución de PIs en presencia o ausencia de las proteínas E6 usando un biosensor fluorescente de PI(4,5)P2, el dominio *pleckstrina* de la fosfolipasa C conjugado a GFP (Varnai and Balla, 2006). Demostramos que la expresión de la proteína E6 induce una redistribución de PI(4,5)P2, reduciendo su presencia en los bordes celulares. Más aún, esta alteración no se observó para el caso de la proteína E6 derivada de un tipo de VPH no oncogénico el cual carece de la capacidad de interactuar con dominios PDZ. Además, células derivadas de carcinomas asociados a VPH mostraron un patrón totalmente alterado respecto a la localización de PI(4,5)P2, con una distribución tipo puntillado en el citoplasma. Para analizar si E6 interfiere en la interacción PDZ-PIs optimizamos análisis de interacción lípidos-proteínas *in vitro* utilizando tiras comerciales conteniendo PIs (Echelon, EE.UU.). Luego de poner a punto la técnica, pudimos demostrar que la presencia del PBM de E6 18, o de la proteína completa, interfiere en el patrón de unión PIs-PAR 3. Esto último podría implicar cambios en la localización en membrana de dicha proteína, así como también podría

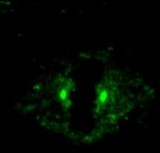
explicar los cambios en la localización subcelular de distintas proteínas PDZ en células VPH-positivas, que dependen de la interacción con PIs para su correcta distribución.

También es importante destacar que es posible que dichos cambios en la localización de PAR 3 se deban a interferencias de E6 sobre otros blancos celulares que forman parte de otros complejos de polaridad. Esto último considerando que existe una interdependencia entre los distintos elementos que conforman el *network* de proteínas que regulan la polaridad en células epiteliales (Coradini et al., 2011). Es por ese motivo que en el presente trabajo de Tesis analizamos la intercomunicación que existe entre los componentes del complejo de polaridad SCRIB [proteínas Scribble y DLG1, blancos PDZ de E6 (Pim et al., 2012)] y PAR-3. Por técnicas de silenciamiento pudimos corroborar que la ablación de DLG1 o de Scribble afecta de manera significativa la distribución subcelular de PAR 3 en la línea celular HaCaT. Por lo tanto, los cambios observados en la localización en células que expresan E6 derivado de VPH de alto riesgo podrían deberse, en parte, a la interferencia de E6 sobre componentes del complejo SCRIB. Es importante destacar también, que es la primera vez que se describe una dependencia en la localización de PAR 3 mediada por DLG1 y/o Scribble.

Por último, teniendo en cuenta que mucho de los blancos de E6 son proteínas que pertenecen a complejos de polaridad y a las uniones intercelulares, decidimos analizar la interferencia de E6 sobre la formación de las UT y la polarización. Para tal fin utilizamos ensayos de cambio en la concentración de calcio (McNeil et al., 2006). En primer lugar, optimizamos por primera vez la técnica en el laboratorio, y analizamos la relocalización celular de ZO1 en células que expresaban o no E6 18. Los resultados indicaron que la presencia de E6 produce un retardo en la localización de ZO1, proteína clave para las UT. Por lo tanto, un retardo en la reformación de las uniones intercelulares indicaría una disfunción de los mecanismos que regulan la polaridad celular en células que expresan E6 18. El retardo observado en la repolarización celular puede deberse a la interacción de E6 con algunos de los blancos que regulan la polaridad celular, los cuales fueron descritos anteriormente. Es importante mencionar que el retardo en la repolarización se observa en estadios tempranos de la formación de las uniones celulares. Se ha descrito recientemente que PAR 3 es una de las proteínas que participa en la formación temprana de tales uniones (Iden et al., 2012); por lo tanto, la alteración en su localización podría considerarse un mecanismo probable que explique lo observado en los ensayos de cambios de la concentración de calcio. Los datos obtenidos sugieren que los VPH oncogénicos tienen la capacidad de interferir con elementos claves de las UT, con probables implicancias en el mantenimiento de la polaridad celular.

En resumen hemos demostrado que E6 es capaz de alterar la localización subcelular de PAR 3, sin producir cambios en los niveles de dicha proteína. Los cambios de localización pueden tener efectos dramáticos en la polaridad *apicobasal* que es regulada por PAR 3, entre otras proteínas. Es importante destacar que la expresión de PAR 3 se encuentra alterada en una amplia variedad de tumores (Facciuto et al., 2012) y que se ha demostrado su función como un inhibidor de metástasis en modelos de cáncer de mama (Iden et al., 2012; McCaffrey et al., 2012). De esto se desprende que los hallazgos presentados aportan significativamente al conocimiento de los mecanismos relacionados a las transformaciones malignas asociadas a las infecciones con VPH, ya que alteraciones en los patrones de expresión de PAR 3, como los descritos en esta Tesis podrían contribuir a la progresión maligna de las lesiones cervicales.

Bibliografía



- Akimoto, K., Mizuno, K., Osada, S., Hirai, S., Tanuma, S., Suzuki, K., and Ohno, S. (1994). A new member of the third class in the protein kinase C family, PKC lambda, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *The Journal of biological chemistry* *269*, 12677-12683.
- 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 research* *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.
- Aono, S., and Hirai, Y. (2008). Phosphorylation of claudin-4 is required for tight junction formation in a human keratinocyte cell line. *Exp Cell Res* *314*, 3326-3339.
- Aranda, V., Haire, T., Nolan, M.E., Calarco, J.P., Rosenberg, A.Z., Fawcett, J.P., Pawson, T., and Muthuswamy, S.K. (2006). Par6-aPKC uncouples ErbB2 induced disruption of polarized epithelial organization from proliferation control. *Nature cell biology* *8*, 1235-1245.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 2930-2935.
- Arvanitakis, L., Geras-Raaka, E., Varma, A., Gershengorn, M.C., and Cesarman, E. (1997). Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature* *385*, 347-350.
- Arvanitakis, L., Yaseen, N., and Sharma, S. (1995). Latent membrane protein-1 induces cyclin D2 expression, pRb hyperphosphorylation, and loss of TGF-beta 1-mediated growth inhibition in EBV-positive B cells. *Journal of immunology* *155*, 1047-1056.
- Assemat, E., Bazellieres, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A., and Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. *Biochimica et biophysica acta* *1778*, 614-630.
- Awad, A., Sar, S., Barre, R., Cariven, C., Marin, M., Salles, J.P., Erneux, C., Samuel, D., and Gassama-Diagne, A. (2013). SHIP2 regulates epithelial cell polarity through its lipid product, which binds to Dlg1, a pathway subverted by hepatitis C virus core protein. *Molecular biology of the cell* *24*, 2171-2185.
- Bais, C., Santomasso, B., Coso, O., Arvanitakis, L., Raaka, E.G., Gutkind, J.S., Asch, A.S., Cesarman, E., Gershengorn, M.C., and Mesri, E.A. (1998). G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature* *391*, 86-89.
- Banks, L., Pim, D., and Thomas, M. (2012). Human tumour viruses and the deregulation of cell polarity in cancer. *Nature reviews Cancer* *12*, 877-886.
- Barbosa, M.S., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *Journal of virology* *63*, 1404-1407.
- Beaudenon, S., Kremsdorf, D., Croissant, O., Jablonska, S., Wain-Hobson, S., and Orth, G. (1986). A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* *321*, 246-249.
- Benton, R., and St Johnston, D. (2003a). A conserved oligomerization domain in drosophila Bazooka/PAR-3 is important for apical localization and epithelial polarity. *Current biology : CB* *13*, 1330-1334.

- Benton, R., and St Johnston, D. (2003b). *Drosophila* PAR-1 and 14-3-3 inhibit Bazooka/PAR-3 to establish complementary cortical domains in polarized cells. *Cell* *115*, 691-704.
- Bernard, H.U. (2013). Regulatory elements in the viral genome. *Virology* *445*, 197-204.
- Bertelsen, B.I., Steine, S.J., Sandvei, R., Molven, A., and Laerum, O.D. (2006). Molecular analysis of the PI3K-AKT pathway in uterine cervical neoplasia: frequent PIK3CA amplification and AKT phosphorylation. *International journal of cancer Journal international du cancer* *118*, 1877-1883.
- Bilder, D., Li, M., and Perrimon, N. (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* *289*, 113-116.
- 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.
- Bosch, X., and Harper, D. (2006). Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era. *Gynecologic oncology* *103*, 21-24.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology* *106*, 761-771.
- Boyer, S.N., Wazer, D.E., and Band, V. (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer research* *56*, 4620-4624.
- Brehm, A., Nielsen, S.J., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (1999). The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *The EMBO journal* *18*, 2449-2458.
- Brown, K.D., Hostager, B.S., and Bishop, G.A. (2001). Differential signaling and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) degradation mediated by CD40 and the Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 (LMP1). *The Journal of experimental medicine* *193*, 943-954.
- Bryant, D.M., and Mostov, K.E. (2008). From cells to organs: building polarized tissue. *Nature reviews Molecular cell biology* *9*, 887-901.
- Bunney, T.D., and Katan, M. (2010). Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN. *Nature reviews Cancer* *10*, 342-352.
- 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.
- 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.
- Cereijido, M., Contreras, R.G., Shoshani, L., Flores-Benitez, D., and Larre, I. (2008). Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype. *Biochimica et biophysica acta* *1778*, 770-793.
- Cesarman, E., Chang, Y., Moore, P.S., Said, J.W., and Knowles, D.M. (1995). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *The New England journal of medicine* *332*, 1186-1191.
- Cline, E.G., and Nelson, W.J. (2007). Characterization of mammalian Par 6 as a dual-location protein. *Molecular and cellular biology* *27*, 4431-4443.

- Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24, 2796-2809.
- Cohen, E.E., Lingen, M.W., Zhu, B., Zhu, H., Straza, M.W., Pierce, C., Martin, L.E., and Rosner, M.R. (2006). Protein kinase C zeta mediates epidermal growth factor-induced growth of head and neck tumor cells by regulating mitogen-activated protein kinase. *Cancer research* 66, 6296-6303.
- Colombo, M., Kuo, G., Choo, Q.L., Donato, M.F., Del Ninno, E., Tommasini, M.A., Dioguardi, N., and Houghton, M. (1989). Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2, 1006-1008.
- Contreras-Paredes, A., De la Cruz-Hernandez, E., Martinez-Ramirez, I., Duenas-Gonzalez, A., and Lizano, M. (2009). E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway. *Virology* 383, 78-85.
- Coradini, D., Casarsa, C., and Oriana, S. (2011). Epithelial cell polarity and tumorigenesis: new perspectives for cancer detection and treatment. *Acta pharmacologica Sinica* 32, 552-564.
- 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.
- Cubie, H.A. (2013). Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology* 445, 21-34.
- Chan, J.R., Jolicoeur, C., Yamauchi, J., Elliott, J., Fawcett, J.P., Ng, B.K., and Cayouette, M. (2006). The polarity protein Par-3 directly interacts with p75NTR to regulate myelination. *Science* 314, 832-836.
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M., and Moore, P.S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266, 1865-1869.
- Chen, C.L., Hsieh, F.C., Lieblein, J.C., Brown, J., Chan, C., Wallace, J.A., Cheng, G., Hall, B.M., and Lin, J. (2007). Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers. *British journal of cancer* 96, 591-599.
- Chen, J., and Zhang, M. (2013). The Par3/Par6/aPKC complex and epithelial cell polarity. *Experimental cell research* 319, 1357-1364.
- Chen, S., Chen, J., Shi, H., Wei, M., Castaneda-Castellanos, D.R., Bultje, R.S., Pei, X., Kriegstein, A.R., Zhang, M., and Shi, S.H. (2013). Regulation of microtubule stability and organization by mammalian Par3 in specifying neuronal polarity. *Developmental cell* 24, 26-40.
- Cheung, T.H., Lo, K.W., Yim, S.F., Chan, L.K., Heung, M.S., Chan, C.S., Cheung, A.Y., Chung, T.K., and Wong, Y.F. (2004). Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecologic oncology* 93, 621-627.
- de Freitas, A.C., Coimbra, E.C., and Leitao, M.D. (2014). Molecular targets of HPV oncoproteins: Potential biomarkers for cervical carcinogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1845, 91-103.
- Debnath, J., and Brugge, J.S. (2005). Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nature reviews Cancer* 5, 675-688.
- Debnath, J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. (2003). Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* 30, 256-268.

- Demers, G.W., Halbert, C.L., and Galloway, D.A. (1994). Elevated wild-type p53 protein levels in human epithelial cell lines immortalized by the human papillomavirus type 16 E7 gene. *Virology* 198, 169-174.
- 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.
- Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651-657.
- Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 32 Suppl 1, S7-15.
- 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.
- Doyle, D.A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., and MacKinnon, R. (1996). Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85, 1067-1076.
- Duensing, S., and Munger, K. (2003). Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins. *Progress in cell cycle research* 5, 383-391.
- Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K., and Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243, 934-937.
- Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Kuhn, A., Kiefer, F., Butz, S., Zander, K., Meyer zu Brickwedde, M.K., Suzuki, A., Imhof, B.A., and Vestweber, D. (2003). The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *Journal of cell science* 116, 3879-3891.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Horikoshi, Y., Hirose, T., Meyer Zu Brickwedde, M.K., Ohno, S., and Vestweber, D. (2001). The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *The EMBO journal* 20, 3738-3748.
- Eder, A.M., Sui, X., Rosen, D.G., Nolden, L.K., Cheng, K.W., Lahad, J.P., Kango-Singh, M., Lu, K.H., Warneke, C.L., Atkinson, E.N., *et al.* (2005). Atypical PKC α contributes to poor prognosis through loss of apical-basal polarity and cyclin E overexpression in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 12519-12524.
- Elsam, I.A., Martin, C., and Humbert, P.O. (2013). Scribble regulates an EMT polarity pathway through modulation of MAPK-ERK signaling to mediate junction formation. *Journal of cell science* 126, 3990-3999.
- Ellenbroek, S.I., Iden, S., and Collard, J.G. (2012). Cell polarity proteins and cancer. *Seminars in cancer biology* 22, 208-215.
- Epstein, M.A., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1, 702-703.
- 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., 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.

- Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., and Moore, P.S. (2008a). Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319, 1096-1100.
- Feng, W., Wu, H., Chan, L.N., and Zhang, M. (2007). The Par-3 NTD adopts a PB1-like structure required for Par-3 oligomerization and membrane localization. *The EMBO journal* 26, 2786-2796.
- Feng, W., Wu, H., Chan, L.N., and Zhang, M. (2008b). Par-3-mediated junctional localization of the lipid phosphatase PTEN is required for cell polarity establishment. *The Journal of biological chemistry* 283, 23440-23449.
- Filippova, M., Parkhurst, L., and Duerksen-Hughes, P.J. (2004). The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 279, 25729-25744.
- Filippova, M., Song, H., Connolly, J.L., Dermody, T.S., and Duerksen-Hughes, P.J. (2002). The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 277, 21730-21739.
- Francis, D.A., Schmid, S.I., and Howley, P.M. (2000). Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *Journal of virology* 74, 2679-2686.
- 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.
- Ganem, D. (2006). KSHV infection and the pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Annual review of pathology* 1, 273-296.
- Ganem, D., and Prince, A.M. (2004). Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *The New England journal of medicine* 350, 1118-1129.
- 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.
- Gardioli, 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. *The Journal of general virology* 83, 283-289.
- Gardioli, 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.
- Garnett, T.O., and Duerksen-Hughes, P.J. (2006). Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Archives of virology* 151, 2321-2335.
- Garnett, T.O., Filippova, M., and Duerksen-Hughes, P.J. (2006). Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell death and differentiation* 13, 1915-1926.
- 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.
- Ghosh, S., Marquardt, T., Thaler, J.P., Carter, N., Andrews, S.E., Pfaff, S.L., and Hunter, T. (2008). Instructive role of aPKCzeta subcellular localization in the assembly of adherens junctions in neural progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 335-340.

- Glaunsinger, B.A., Lee, S.S., Thomas, M., Banks, L., and Javier, R. (2000). Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene* 19, 5270-5280.
- Goldstein, B., and Macara, I.G. (2007). The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Developmental cell* 13, 609-622.
- Gopalakrishnan, S., Hallett, M.A., Atkinson, S.J., and Marrs, J.A. (2007). aPKC-PAR complex dysfunction and tight junction disassembly in renal epithelial cells during ATP depletion. *American journal of physiology Cell physiology* 292, C1094-1102.
- Guccione, E., Pim, D., and Banks, L. (2004). HPV-18 E6*1 modulates HPV-18 full-length E6 functions in a cell cycle dependent manner. *Int J Cancer* 110, 928-933.
- Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2006). Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annual review of pathology* 1, 23-61.
- 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.
- 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.
- 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.
- Horikoshi, Y., Suzuki, A., Yamanaka, T., Sasaki, K., Mizuno, K., Sawada, H., Yonemura, S., and Ohno, S. (2009). Interaction between PAR-3 and the aPKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells. *Journal of cell science* 122, 1595-1606.
- Howie, H.L., Katzenellenbogen, R.A., and Galloway, D.A. (2009). Papillomavirus E6 proteins. *Virology* 384, 324-334.
- 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.
- 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.
- Hung, T.J., and Kemphues, K.J. (1999). PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* 126, 127-135.
- Hurd, T.W., Gao, L., Roh, M.H., Macara, I.G., and Margolis, B. (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nature cell biology* 5, 137-142.
- 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.
- Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T., and Tsukita, S. (2001). Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *The Journal of cell biology* 154, 491-497.

- Itoh, N., Nakayama, M., Nishimura, T., Fujisue, S., Nishioka, T., Watanabe, T., and Kaibuchi, K. (2010). Identification of focal adhesion kinase (FAK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) as Par3 partners by proteomic analysis. *Cytoskeleton* 67, 297-308.
- Ivanov, A.I., Young, C., Den Beste, K., Capaldo, C.T., Humbert, P.O., Brennwald, P., Parkos, C.A., and Nusrat, A. (2010). Tumor suppressor scribble regulates assembly of tight junctions in the intestinal epithelium. *The American journal of pathology* 176, 134-145.
- Ivarsson, Y., Wawrzyniak, A.M., Kashyap, R., Polanowska, J., Betzi, S., Lembo, F., Vermeiren, E., Chiheb, D., Lenfant, N., Morelli, X., *et al.* (2013). Prevalence, specificity and determinants of lipid-interacting PDZ domains from an in-cell screen and in vitro binding experiments. *PLoS one* 8, e54581.
- Izumi, Y., Hirose, T., Tamai, Y., Hirai, S., Nagashima, Y., Fujimoto, T., Tabuse, Y., Kempfues, K.J., and Ohno, S. (1998). An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *The Journal of cell biology* 143, 95-106.
- Jackson, D., Hossain, M.J., Hickman, D., Perez, D.R., and Lamb, R.A. (2008). A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 4381-4386.
- Jagu, S., Kwak, K., Karanam, B., Huh, W.K., Damotharan, V., Chivukula, S.V., and Roden, R.B. (2013). Optimization of multimeric human papillomavirus L2 vaccines. *PLoS one* 8, e55538.
- Janetopoulos, C., and Devreotes, P. (2006). Phosphoinositide signaling plays a key role in cytokinesis. *The Journal of cell biology* 174, 485-490.
- Javier, R.T., and Rice, A.P. (2011). Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses. *Journal of virology* 85, 11544-11556.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., and Thun, M.J. (2008). Cancer statistics, 2008. *CA: a cancer journal for clinicians* 58, 71-96.
- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., and Macara, I.G. (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nature cell biology* 2, 531-539.
- Jones, D.L., Thompson, D.A., and Munger, K. (1997). Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology* 239, 97-107.
- Kao, J.H., and Chen, D.S. (2002). Global control of hepatitis B virus infection. *The Lancet infectious diseases* 2, 395-403.
- Karanam, B., Jagu, S., Huh, W.K., and Roden, R.B. (2009). Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. *Immunology and cell biology* 87, 287-299.
- 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. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 22, 1570-1576.
- Kiyono, T. (1998). [Roles of HPV genes in carcinogenesis]. *Uirusu* 48, 125-135.
- Kiyono, T., Foster, S.A., Koop, J.I., McDougall, J.K., Galloway, D.A., and Klingelutz, A.J. (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396, 84-88.

- Kranjec, C., and Banks, L. (2011). A systematic analysis of human papillomavirus (HPV) E6 PDZ substrates identifies MAGI-1 as a major target of HPV type 16 (HPV-16) and HPV-18 whose loss accompanies disruption of tight junctions. *Journal of virology* *85*, 1757-1764.
- Kumar, A., Zhao, Y., Meng, G., Zeng, M., Srinivasan, S., Delmolino, L.M., Gao, Q., Dimri, G., Weber, G.F., Wazer, D.E., *et al.* (2002). Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Molecular and cellular biology* *22*, 5801-5812.
- 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. *J Virol* *83*, 11784-11794.
- Laimins LA (1998). Regulation of Transcription and Replication by Human Papillomaviruses. . Human Tumor Viruses, Washington, DC: ASM press, 201-223.
- Latorre, I.J., Roh, M.H., Frese, K.K., Weiss, R.S., Margolis, B., and Javier, R.T. (2005). Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells. *Journal of cell science* *118*, 4283-4293.
- Lawrence, D.W., Comerford, K.M., and Colgan, S.P. (2002). Role of VASP in reestablishment of epithelial tight junction assembly after Ca²⁺ switch. *American journal of physiology Cell physiology* *282*, C1235-1245.
- Le Bras, G.F., Taubenslag, K.J., and Andl, C.D. (2012). The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell adhesion & migration* *6*, 365-373.
- Lechner, M.S., and Laimins, L.A. (1994). Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *Journal of virology* *68*, 4262-4273.
- Lee, C., Wooldridge, T.R., and Laimins, L.A. (2007). Analysis of the roles of E6 binding to E6TP1 and nuclear localization in the human papillomavirus type 31 life cycle. *Virology* *358*, 201-210.
- Lee, J.S., Choi, Y.D., Lee, J.H., Nam, J.H., Choi, C., Lee, M.C., Park, C.S., Kim, H.S., and Min, K.W. (2006). Expression of PTEN in the progression of cervical neoplasia and its relation to tumor behavior and angiogenesis in invasive squamous cell carcinoma. *Journal of surgical oncology* *93*, 233-240.
- 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. *Journal of virology* *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.
- Lemmon, M.A. (2004). Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochemical Society transactions* *32*, 707-711.
- Leslie, N.R., Batty, I.H., Maccario, H., Davidson, L., and Downes, C.P. (2008). Understanding PTEN regulation: PIP2, polarity and protein stability. *Oncogene* *27*, 5464-5476.
- Li, X., and Coffino, P. (1996). High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *Journal of virology* *70*, 4509-4516.
- Liu, X., Dakic, A., Zhang, Y., Dai, Y., Chen, R., and Schlegel, R. (2009a). HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 18780-18785.

- Liu, Y., Chen, J.J., Gao, Q., Dalal, S., Hong, Y., Mansur, C.P., Band, V., and Androphy, E.J. (1999). Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *Journal of virology* 73, 7297-7307.
- Liu, Y., Cherry, J.J., Dineen, J.V., Androphy, E.J., and Baleja, J.D. (2009b). Determinants of stability for the E6 protein of papillomavirus type 16. *Journal of molecular biology* 386, 1123-1137.
- Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2012). Reducing HPV-associated cancer globally. *Cancer prevention research* 5, 18-23.
- Lu, D., Qian, J., Yin, X., Xiao, Q., Wang, C., and Zeng, Y. (2012). Expression of PTEN and survivin in cervical cancer: promising biological markers for early diagnosis and prognostic evaluation. *British journal of biomedical science* 69, 143-146.
- Ma, Y.Y., Wei, S.J., Lin, Y.C., Lung, J.C., Chang, T.C., Whang-Peng, J., Liu, J.M., Yang, D.M., Yang, W.K., and Shen, C.Y. (2000). PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene* 19, 2739-2744.
- Macara, I.G. (2004a). Par proteins: partners in polarization. *Current biology* : CB 14, R160-162.
- Macara, I.G. (2004b). Parsing the polarity code. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 220-231.
- Martin-Belmonte, F., and Mostov, K. (2007). Phosphoinositides control epithelial development. *Cell cycle* 6, 1957-1961.
- Martin-Belmonte, F., and Perez-Moreno, M. (2012). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nature reviews Cancer* 12, 23-38.
- 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.
- Mason, D., Mallo, G.V., Terebiznik, M.R., Payrastre, B., Finlay, B.B., Brumell, J.H., Rameh, L., and Grinstein, S. (2007). Alteration of epithelial structure and function associated with PtdIns(4,5)P2 degradation by a bacterial phosphatase. *The Journal of general physiology* 129, 267-283.
- Massimi, P., Narayan, N., Thomas, M., Gammoh, N., Strand, S., Strand, D., and Banks, L. (2008). Regulation of the hDlg/hScrib/Hugl-1 tumour suppressor complex. *Experimental cell research* 314, 3306-3317.
- Massimi, P., Zori, P., Roberts, S., and Banks, L. (2012). Differential regulation of cell-cell contact, invasion and anoikis by hScrib and hDlg in keratinocytes. *PLoS one* 7, e40279.
- Matsuoka, M., and Jeang, K.T. (2007). Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nature reviews Cancer* 7, 270-280.
- 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.
- McGrath, M., de Villiers, G.K., Shephard, E., Hitzeroth, II, and Rybicki, E.P. (2013). Development of human papillomavirus chimaeric L1/L2 candidate vaccines. *Archives of virology* 158, 2079-2088.
- McLaughlin-Drubin, M.E., and Munger, K. (2008). Viruses associated with human cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1782, 127-150.
- McNeil, E., Capaldo, C.T., and Macara, I.G. (2006). Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Molecular biology of the cell* 17, 1922-1932.

- 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.
- Mesplede, T., Gagnon, D., Bergeron-Labrecque, F., Azar, I., Senechal, H., Coutlee, F., and Archambault, J. (2012). p53 degradation activity, expression, and subcellular localization of E6 proteins from 29 human papillomavirus genotypes. *Journal of virology* 86, 94-107.
- Meyers, C., and Laimins, L.A. (1994). In vitro systems for the study and propagation of human papillomaviruses. *Current topics in microbiology and immunology* 186, 199-215.
- Mizuno, K., Suzuki, A., Hirose, T., Kitamura, K., Kutsuzawa, K., Futaki, M., Amano, Y., and Ohno, S. (2003). Self-association of PAR-3-mediated by the conserved N-terminal domain contributes to the development of epithelial tight junctions. *The Journal of biological chemistry* 278, 31240-31250.
- Montaner, S., Sodhi, A., Molinolo, A., Bugge, T.H., Sawai, E.T., He, Y., Li, Y., Ray, P.E., and Gutkind, J.S. (2003). Endothelial infection with KSHV genes in vivo reveals that vGPCR initiates Kaposi's sarcomagenesis and can promote the tumorigenic potential of viral latent genes. *Cancer cell* 3, 23-36.
- Moody, C.A., and Laimins, L.A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews Cancer* 10, 550-560.
- Morais-de-Sa, E., Mirouse, V., and St Johnston, D. (2010). aPKC phosphorylation of Bazooka defines the apical/lateral border in Drosophila epithelial cells. *Cell* 141, 509-523.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80, 389-399.
- Mostov, K., Su, T., and ter Beest, M. (2003). Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nature cell biology* 5, 287-293.
- 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.
- Murray, N.R., Kalari, K.R., and Fields, A.P. (2011). Protein kinase Ciota expression and oncogenic signaling mechanisms in cancer. *Journal of cellular physiology* 226, 879-887.
- Nagai-Tamai, Y., Mizuno, K., Hirose, T., Suzuki, A., and Ohno, S. (2002). Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 7, 1161-1171.
- 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.

- Nakagawa, S., Yano, T., Nakagawa, K., Takizawa, S., Suzuki, Y., Yasugi, T., Huibregtse, J.M., and Taketani, Y. (2004). Analysis of the expression and localisation of a LAP protein, human scribble, in the normal and neoplastic epithelium of uterine cervix. *Br J Cancer* *90*, 194-199.
- Naranatt, P.P., Akula, S.M., Zien, C.A., Krishnan, H.H., and Chandran, B. (2003). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces the phosphatidylinositol 3-kinase-PKC-zeta-MEK-ERK signaling pathway in target cells early during infection: implications for infectivity. *Journal of virology* *77*, 1524-1539.
- Nead M. A., M. (1998). Activities of the Transforming Proteins of Human Papillomaviruses. . Human Tumor Viruses McCance D DJ ed ASM press, Washington, DC, 225-251.
- Nguyen, M.L., Nguyen, M.M., Lee, D., Griep, A.E., and Lambert, P.F. (2003). The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *Journal of virology* *77*, 6957-6964.
- Nicolaides, L., Davy, C., Raj, K., Kranjec, C., Banks, L., and Doorbar, J. (2011). Stabilization of HPV16 E6 protein by PDZ proteins, and potential implications for genome maintenance. *Virology* *414*, 137-145.
- Niessen, C.M., and Gottardi, C.J. (2008). Molecular components of the adherens junction. *Biochimica et biophysica acta* *1778*, 562-571.
- Nishimura, T., and Kaibuchi, K. (2007). Numb controls integrin endocytosis for directional cell migration with aPKC and PAR-3. *Developmental cell* *13*, 15-28.
- Nolan, M.E., Aranda, V., Lee, S., Lakshmi, B., Basu, S., Allred, D.C., and Muthuswamy, S.K. (2008). The polarity protein Par6 induces cell proliferation and is overexpressed in breast cancer. *Cancer research* *68*, 8201-8209.
- 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.
- O'Brien, L.E., Zegers, M.M., and Mostov, K.E. (2002). Opinion: Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nature reviews Molecular cell biology* *3*, 531-537.
- 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.
- 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.
- Patel, D., Huang, S.M., Baglia, L.A., and McCance, D.J. (1999). The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *The EMBO journal* *18*, 5061-5072.
- Pegtel, D.M., Ellenbroek, S.I., Mertens, A.E., van der Kammen, R.A., de Rooij, J., and Collard, J.G. (2007). The Par-Tiam1 complex controls persistent migration by stabilizing microtubule-dependent front-rear polarity. *Current biology : CB* *17*, 1623-1634.
- Pett, M., and Coleman, N. (2007). Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *The Journal of pathology* *212*, 356-367.
- Pieczynski, J., and Margolis, B. (2011). Protein complexes that control renal epithelial polarity. *American journal of physiology Renal physiology* *300*, F589-601.

- 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., Massimi, P., Dilworth, S.M., and Banks, L. (2005). Activation of the protein kinase B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A. *Oncogene* 24, 7830-7838.
- Plant, P.J., Fawcett, J.P., Lin, D.C., Holdorf, A.D., Binns, K., Kulkarni, S., and Pawson, T. (2003). A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nature cell biology* 5, 301-308.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., and Gallo, R.C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 7415-7419.
- 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 research* 65, 7691-7698.
- Regala, R.P., Weems, C., Jamieson, L., Khor, A., Edell, E.S., Lohse, C.M., and Fields, A.P. (2005). Atypical protein kinase C iota is an oncogene in human non-small cell lung cancer. *Cancer research* 65, 8905-8911.
- Riley, R.R., Duensing, S., Brake, T., Munger, K., Lambert, P.F., and Arbeit, J.M. (2003). Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer research* 63, 4862-4871.
- Rodriguez-Fraticelli, F.M.-B.a.A. (2009). Chapter three: Acquisition of Membrane Polarity in Epithelial Tube Formation: Patterns, Signaling Pathways, Molecular Mechanisms, and Disease. *International Review of Cell and Molecular Biology* 274, 129-182.
- Roh, M.H., Fan, S., Liu, C.J., and Margolis, B. (2003). The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *Journal of cell science* 116, 2895-2906.
- 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.
- 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 research* 70, 2158-2164.
- Runkle, E.A., and Mu, D. (2013). Tight junction proteins: from barrier to tumorigenesis. *Cancer letters* 337, 41-48.
- Saarikangas, J., Zhao, H., and Lappalainen, P. (2010). Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiological reviews* 90, 259-289.
- Sambrook, J., Fritsch, E. E., Maniatis, R. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (NY: Cold Spring Harbor Laboratory).

- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., and Howley, P.M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.
- 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.
- Schmoranzner, J., Fawcett, J.P., Segura, M., Tan, S., Vallee, R.B., Pawson, T., and Gundersen, G.G. (2009). Par3 and dynein associate to regulate local microtubule dynamics and centrosome orientation during migration. *Current biology : CB* 19, 1065-1074.
- 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).
- Schroer, N., Pahne, J., Walch, B., Wickenhauser, C., and Smola, S. (2011). Molecular pathobiology of human cervical high-grade lesions: paracrine STAT3 activation in tumor-instructed myeloid cells drives local MMP-9 expression. *Cancer research* 71, 87-97.
- 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, Z.H., Jones, D.R., Sommer, L., Foulger, R., Bultsma, Y., D'Santos, C., and Divecha, N. (2013). Nuclear phosphoinositides and their impact on nuclear functions. *The FEBS journal* 280, 6295-6310.
- Shewan, A., Eastburn, D.J., and Mostov, K. (2011). Phosphoinositides in cell architecture. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, a004796.
- Shi, S.H., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2003). Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112, 63-75.
- Shin, K., Straight, S., and Margolis, B. (2005). PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *The Journal of cell biology* 168, 705-711.
- Shukla, S., Mahata, S., Shishodia, G., Pandey, A., Tyagi, A., Vishnoi, K., Basir, S.F., Das, B.C., and Bharti, A.C. (2013). Functional regulatory role of STAT3 in HPV16-mediated cervical carcinogenesis. *PloS one* 8, e67849.
- Songyang, Z., Fanning, A.S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S.M., Chishti, A.H., Crompton, A., Chan, A.C., Anderson, J.M., and Cantley, L.C. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275, 73-77.
- Stanley, M.A. (2012). Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clinical microbiology reviews* 25, 215-222.
- 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. *Journal of virology* 81, 4080-4090.
- Stucke, V.M., Timmerman, E., Vandekerckhove, J., Gevaert, K., and Hall, A. (2007). The MAGUK protein MPP7 binds to the polarity protein hDlg1 and facilitates epithelial tight junction formation. *Molecular biology of the cell* 18, 1744-1755.
- Subauste, M.C., Nalbant, P., Adamson, E.D., and Hahn, K.M. (2005). Vinculin controls PTEN protein level by maintaining the interaction of the adherens junction protein beta-catenin with the scaffolding protein MAGI-2. *The Journal of biological chemistry* 280, 5676-5681.

- Suzuki, A., Ishiyama, C., Hashiba, K., Shimizu, M., Ebnet, K., and Ohno, S. (2002). aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization. *Journal of cell science* *115*, 3565-3573.
- Syrjanen, S.M., and Syrjanen, K.J. (1999). New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Annals of medicine* *31*, 175-187.
- Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kemphues, 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.
- Takekuni, K., Ikeda, W., Fujito, T., Morimoto, K., Takeuchi, M., Monden, M., and Takai, Y. (2003). Direct binding of cell polarity protein PAR-3 to cell-cell adhesion molecule nectin at neuroepithelial cells of developing mouse. *The Journal of biological chemistry* *278*, 5497-5500.
- Tepass, U. (2012). The apical polarity protein network in *Drosophila* epithelial cells: regulation of polarity, junctions, morphogenesis, cell growth, and survival. *Annual review of cell and developmental biology* *28*, 655-685.
- Thomas, D.L., Astemborski, J., Rai, R.M., Anania, F.A., Schaeffer, M., Galai, N., Nolt, K., Nelson, K.E., Strathdee, S.A., Johnson, L., *et al.* (2000). The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA : the journal of the American Medical Association* *284*, 450-456.
- Thomas, M., and Banks, L. (2005). In vitro assays of substrate degradation induced by high-risk HPV E6 oncoproteins. *Methods Mol Med* *119*, 411-417.
- Thomas, M., Dasgupta, J., Zhang, Y., Chen, X., and Banks, L. (2008a). Analysis of specificity determinants in the interactions of different HPV E6 proteins with their PDZ domain-containing substrates. *Virology* *376*, 371-378.
- Thomas, M., Glaunsinger, B., Pim, D., Javier, R., and Banks, L. (2001). HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific protein recognition and degradation. *Oncogene* *20*, 5431-5439.
- Thomas, M., Laura, R., Hepner, K., Guccione, E., Sawyers, C., Lasky, L., and Banks, L. (2002). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene* *21*, 5088-5096.
- Thomas, M., Massimi, P., Navarro, C., Borg, J.P., and Banks, L. (2005). The hScrib/Dlg apico-basal control complex is differentially targeted by HPV-16 and HPV-18 E6 proteins. *Oncogene* *24*, 6222-6230.
- Thomas, M., Narayan, N., Pim, D., Tomaic, V., Massimi, P., Nagasaka, K., Kranjec, C., Gammoh, N., and Banks, L. (2008b). Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene* *27*, 7018-7030.
- Thomas, M., Pim, D., and Banks, L. (1999). The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* *18*, 7690-7700.
- Tomaic, V., Gardiol, D., Massimi, P., Ozbun, M., Myers, M., and Banks, L. (2008). Human and primate tumour viruses use PDZ binding as an evolutionarily conserved mechanism of targeting cell polarity regulators. *Oncogene*.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 10402-10407.
- Tsukita, S., Yamazaki, Y., Katsuno, T., Tamura, A., and Tsukita, S. (2008). Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* *27*, 6930-6938.
- Twiss, F., Le Duc, Q., Van Der Horst, S., Tabdili, H., Van Der Krogt, G., Wang, N., Rehmann, H., Huvneers, S., Leckband, D.E., and De Rooij, J. (2012). Vinculin-dependent Cadherin mechanosensing regulates efficient epithelial barrier formation. *Biology open* *1*, 1128-1140.
- Varnai, P., and Balla, T. (2006). Live cell imaging of phosphoinositide dynamics with fluorescent protein domains. *Biochimica et biophysica acta* *1761*, 957-967.
- Varnai, P., Toth, B., Toth, D.J., Hunyady, L., and Balla, T. (2007). Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1 Complex. *The Journal of biological chemistry* *282*, 29678-29690.
- Viloria-Petit, A.M., David, L., Jia, J.Y., Erdemir, T., Bane, A.L., Pinnaduwa, D., Roncari, L., Narimatsu, M., Bose, R., Moffat, J., *et al.* (2009). A role for the TGFbeta-Par6 polarity pathway in breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 14028-14033.
- 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 research* *68*, 307-313.
- von Knebel Doeberitz, M. (2002). New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *European journal of cancer* *38*, 2229-2242.
- von Stein, W., Ramrath, A., Grimm, A., Muller-Borg, M., and Wodarz, A. (2005). Direct association of Bazooka/PAR-3 with the lipid phosphatase PTEN reveals a link between the PAR/aPKC complex and phosphoinositide signaling. *Development* *132*, 1675-1686.
- 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.
- 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.
- Wawrzyniak, A.M., Kashyap, R., and Zimmermann, P. (2013). Phosphoinositides and PDZ domain scaffolds. *Advances in experimental medicine and biology* *991*, 41-57.
- Wentzensen, N., Vinokurova, S., and von Knebel Doeberitz, M. (2004). Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer research* *64*, 3878-3884.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U., and Knust, E. (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in Drosophila neuroblasts. *Nature* *402*, 544-547.
- Woodman, C.B., Collins, S.I., and Young, L.S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews Cancer* *7*, 11-22.
- 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. *Molecular cell* *28*, 886-898.

- Wu, X., Hepner, K., Castelino-Prabhu, S., Do, D., Kaye, M.B., Yuan, X.J., Wood, J., Ross, C., Sawyers, C.L., and Whang, Y.E. (2000). Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 4233-4238.
- 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.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Kitamura, K., Maniwa, R., Nagai, Y., Yamashita, A., Hirose, T., Ishikawa, H., *et al.* (2001). PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* *6*, 721-731.
- 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.
- 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, 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.
- 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.
- Zhou, Y., Fang, L., Du, D., Zhou, W., Feng, X., Chen, J., Zhang, Z., and Chen, Z. (2008). Proteome identification of binding-partners interacting with cell polarity protein Par3 in Jurkat cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica* *40*, 729-739.
- Zimmermann, H., Degenkolbe, R., Bernard, H.U., and O'Connor, M.J. (1999). The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *Journal of virology* *73*, 6209-6219.
- Zimmermann, P. (2006). PDZ domain-phosphoinositide interactions in cell-signaling. *Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België* *68*, 271-286.
- zur Hausen, H. (1976). Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer research* *36*, 794.
- zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochimica et biophysica acta* *1288*, F55-78.
- zur Hausen, H. (1999). Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians* *111*, 581-587.