



Revista CENIC. Ciencias Biológicas

ISSN: 0253-5688

editorial.cenic@cnic.edu.cu

Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Cuba

Beltrán Lissabet, Jorge Félix

Aspectos generales sobre la estructura y función de las proteínas codificadas por el virus del Papiloma
Humano

Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 45, núm. 2, enero-agosto, 2014, pp. 108-118

Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Ciudad de La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181231236005>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Aspectos generales sobre la estructura y función de las proteínas codificadas por el virus del Papiloma Humano

Jorge Félix Beltrán-Lissabet.

Departamento de Bioquímica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas. La Habana, Cuba.
jorge.beltran@cnic.edu.cu

Recibido: 22 de julio de 2013. Aceptado: 31 de octubre de 2013.

Palabras clave: Gardasil, Cervarix, VPH, VLP, vacuna.
Key words: Gardasil, Cervarix, HPV, VLP, vaccine.

RESUMEN. El virus del Papiloma Humano (VPH) es el agente causal de una de las infecciones de transmisión sexual más propagadas en todo el mundo que afecta principalmente a la población femenina. Los mecanismos moleculares por los que el VPH establece las infecciones son muy complejos y las vías por las que lleva a cabo su ciclo infectivo, están sujetas a una regulación compleja del genoma viral, el cual contiene ocho marcos abiertos de lectura (MAL) que codifican una serie de proteínas clave (E6, E7, E1, E4, E2, E5, L2, L1) en el mantenimiento del ciclo viral en la célula hospedera, incluyendo E2^E8, resultado de la fusión de los productos de los MAL E2 y E8. La capacidad de la proteína L1 de autoensamblarse en partículas semejantes a virus ha permitido el desarrollo de las vacunas profilácticas Gardasil® y Cervarix®, las que han demostrado ser eficaces en la prevención de las infecciones provocadas por el VPH. A pesar de los avances en el desarrollo de inmunógenos, se hace necesario seguir avanzando en el diseño de futuras vacunas contra las infecciones producidas por el VPH, teniendo en cuenta la amplia variedad de tipos virales y el elevado costo de las vacunas actuales.

ABSTRACT. Human papillomavirus is the causative agent of one of the most widespread transmitted infections worldwide that mainly affect the population of females. The molecular mechanisms of how HPV establishes the infection are complex and the pathways by means of HPV performs the viral cycle are subject to a complex regulation of its genome, which contains eight open reading frames (MAL) that encode a series of key proteins (E6, E7, E1, E4, E2, E5, L2, L1) for maintaining the viral cycle in host cells, including E8 ^ E2. This results from fusion of the products E2 and E8 MAL. The ability of L1 protein to self-assemble into virus-like particles has allowed the development of the prophylactic vaccines Gardasil and Cervarix, which have proven effective in preventing infections caused by HPV. Despite of the advances in the development of immunogens, it is necessary to move forward in the design of future vaccines against HPV infections, taking into account the wide variety of viral types and the high cost of current vaccines.

INTRODUCCIÓN

El VPH pertenece a la familia Papillomaviridae, según el octavo reporte realizado por el Comité Internacional de Taxonomía Viral¹ En la actualidad, más de 120 tipos diferentes del VPH han sido catalogados y alrededor de 40 pueden infectar el revestimiento epitelial del tracto anogenital y otras áreas mucosales del cuerpo humano.²

La infección provocada por el VPH es una de las causas más comunes de enfermedades de transmisión sexual con niveles de prevalencia que varían con los estudios de población y localización geográfica.³ A pesar de los esfuerzos mundiales dirigidos a la prevención y erradicación de las enfermedades provocadas por este agente etiológico, los virus del papiloma humano, se mantienen ocasionando una de las infecciones sexuales más comunes transmitidas en todo el mundo; al menos 14 tipos de ellos están clasificados como de elevado riesgo oncocáncerico (VPH AR), entre los

cuales VPH16 y VPH18 causan alrededor del 70 % de todos los cánceres cervicales y afectan aproximadamente a 500 000 mujeres cada año.⁴ Dado el creciente interés que cada día despierta en la comunidad científica las infecciones provocadas por el VPH, el presente trabajo se propuso como objetivo abordar de manera general la estructura y las principales funciones de las proteínas codificadas por el VPH, así como destacar el papel de la proteína L1 en el diseño de vacunas profilácticas.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VPH

El VPH es un virus relativamente pequeño compuesto por un genoma de ADN de doble cadena circular de aproximadamente 8000 pares de bases, que contiene un promedio de ocho MAL, divididos en tres regiones. La primera es una larga región de control (LCR, de sus siglas en inglés Long Control Region), la cual tiene la función reguladora de la transcripción de los genes virales E6 y E7. La segunda es una región temprana (E, de su sigla en inglés *Early*), que consiste en seis MAL (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), los que codifican para proteínas no estructurales implicadas en la replicación y oncogénesis, la tercera es la región tardía (L, de su sigla en inglés *Late*) la cual codifica las proteínas estructurales L1 y L2⁵ (Fig.1).

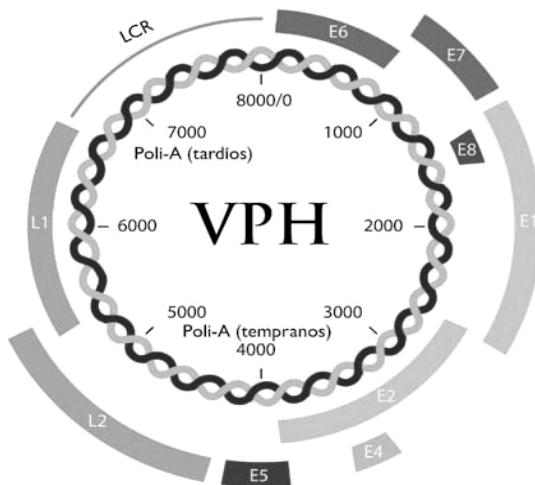


Fig.1. El genoma del VPH es una molécula de ADN circular. Dicho genoma se divide en tres regiones: LCR, E y L. Esta última codifica las proteínas L1 y L2 de la cápside viral.⁶

Dicho genoma está asociado a proteínas semejantes a histonas y protegido por una cápsida de simetría icosaédrica sin envoltura, formada por dos tipos de proteínas, L1 y L2,⁷ en la que L1 representa el 80 % de la cápside.⁸ El diámetro de la cápside es de aproximadamente 60 nm y está constituida por 72 capsómeros pentaméricos, cada uno constituido por cinco monómeros de L1. De los 72 capsómeros, 60 interactúan en simetría hexagonal, mientras que los 12 restantes lo hacen en simetría pentagonal.^{9,10} Los pentámeros de L1 están distribuidos formando una red de interacciones disulfuro intra e interpentaméricas, las cuales contribuyen con la estabilización de la cápside.⁷

ASPECTOS GENERALES DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN VIRAL DEL VPH

La regulación de la expresión de los genes virales es compleja y está controlada por factores de transcripción celulares y virales.¹¹ Solo una hebra de la doble cadena de ADN sirve como molde para la expresión de los genes virales, que codifican un número de transcriptos de ARNm policistrónicos.¹² Los promotores tempranos del VPH, los promotores tardíos y la señal de poliadenilación definen tres grupos virales de genes que son coordinadamente regulados durante la diferenciación de la célula hospedera. Los genes E6 y E7 mantienen la replicación; E1, E2, E3, E4, E5 y E8 están implicados en el control transcripcional y la replicación del ADN viral, además de otras funciones, mientras que los genes L1 y L2 codifican las proteínas encargadas del ensamblaje de las partículas virales.¹³ Se ha demostrado que el segundo promotor o promotor tardío, es iniciado de una forma independiente y de este modo, es activado solo cuando las células están creciendo en el tejido estratificado del hospedero. Una vez activado, el promotor tardío dirige la transcripción de un grupo heterogéneo de sitios de inicio que servirán para producir un grupo de transcriptos que facilitan la traducción de las proteínas L1 y L2.¹⁴ La activación de los promotores tardíos está acompañada por la aceleración de la replicación viral y por los altos niveles de expresión de proteínas virales. Cuando el promotor tardío es activado; la expresión de los genes tiene lugar con lo que se codifican las proteínas estructurales L1 y L2 las que se unen para ensamblar la cápsida y formar el virión.¹²

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL VPH

PROTEÍNA E6

El gen E6, de aproximadamente 450 a 500 pb, codifica una proteína de alrededor de 150 aminoácidos, con un peso molecular de 16 a 18 kDa.^{15,16} Todos los virus del papiloma (VP) codifican un MAL E6 cadena abajo. La proteína E6 tiene aproximadamente 150 aminoácidos,¹⁷ y que contiene cuatro motivos CXXC que presumiblemente forman dos regiones de unión al zinc. Se ha demostrado que un número de proteínas E6 de los VP enlazan el zinc a través de la coordinación de residuos de cisteínas.¹⁸ Cada dominio de la proteína E6 consiste en tres láminas beta (S1, S2, S3) y dos hélices cortas (H1, H2). E6 puede dimerizarse a elevadas concentraciones de sal y proteínas y se piensa que es monomérica en condiciones fisiológicas.¹⁹

El estudio de la expresión endógena de la proteína E6 se ha dificultado, debido a que es expresada en muy bajos niveles y a su poca sensibilidad a los anticuerpos, no obstante, se piensa que puede ser en gran parte nuclear, aunque algunas fracciones de E6 pueden ser encontradas en el citoplasma.⁸ No se han reportado actividades enzimáticas para E6, y aunque se ha demostrado que la proteína E6 de los VPH de gran riesgo (AR E6) puede enlazarse específicamente de cuatro formas al ADN. Se cree que la mayoría de las actividades de E6 están mediadas por interacciones proteína-proteína,²⁰ (Tabla 1).

La primera proteína en la que se demostró la interacción con E6, fue una asociada a E6 (PA E6), la ubiquitina ligasa E3.²¹ La función de las cascadas de ubiquitininas es orientar a las proteínas a la degradación proteasomal por medio de la adición de múltiples monómeros de ubiquitina a la proteína destinada a ser degradada.²²

Las PA E6 forman un complejo con ambas, las proteínas dianas y la proteína E6, que conduce a la ubiquitinación de la proteína blanco y subsecuentemente, a la degradación mediada por el proteosoma.²³ El blanco del complejo E6/E6 AP más estudiado es el supresor de tumor p53.²⁴

Tabla 1. Vías celulares que resultan alteradas por la interacción de la proteína E6 con otras proteínas²⁵

Vías	Inactivación de p53	Modulación de la proteína G	Polaridad de adhesión	Bloqueo de la apoptosis	Estabilidad cromosomal	Evasión inmune
Proteínas de unión a E6	P53,E6A, p30, hADA,Gps2	E6TP, Tiberina, Gps2	hDIg, hScrib, MAGIs, MUPP1, ERC55, pacilina/cicina, PTPN3	P53, Bak, TNFR, FADD	NFX1, p53, hMCM7, XRCC1, MGMT	NFX1, p53, hMCM7, XRCC1, MGMT

Inactivación de p53

El supresor de tumor p53 es un factor de transcripción sitio-específico del ADN y uno de los coordinadores de la señalización celular, la cual es un factor clave en la célula, tras un estrés genotóxico o citotóxico.²⁶ Normalmente p53 se encuentra en bajos niveles y transcripcionalmente inactivo, el daño celular desencadena un incremento en las concentraciones de la proteína p53 y la activación de la vía post-traduccional. Una vez activado, p53 inicia las vías para la reparación del ADN, el ciclo celular se detiene y toma la vía de apoptosis basado en el grado del daño sobre ADN. La importancia de p53 en la respuesta celular a agentes citotóxicos es ejemplificada por la observación de que, aproximadamente la mitad de los tumores malignos humanos albergan mutaciones en el gen p53. Estas mutaciones dificultan la capacidad de p53 para desencadenar las vías apropiadas de señalización para reparar el daño o desencadenar la muerte celular cuando la reparación del ADN es casi imposible. Además de los daños genotóxicos y citotóxicos, p53 es también activada por la síntesis incorrecta del ADN, como la inducida durante la infección por el VPH.²⁷

El principio del mecanismo por el cual los VPH AR inactivan a p53 es mediante la inducción de su degradación a través de la vía proteosoma-ubiquitina.²⁸ La proteína E6 de los VPH AR inducen la degradación de p53 por la formación de un complejo con otra ubiquitina ligasa E3.²³

En algunos ensayos, se ha demostrado que la expresión de la proteína E6 de los VPHs AR y VPH BR puede abolir la actividad transcripcional mediada por p53. También se ha demostrado que E6 puede mediar estos efectos a través de un número de mecanismos, incluida la inhibición de la unión de p53 al ADN, la localización anormal de p53 y sus modificaciones post-traduccionales.²⁵

PROTEÍNA E7

La proteína E7 tiene un peso de aproximadamente 10 kDa,²⁹ su secuencia de aminoácidos primaria presenta semejanzas con las proteínas E1A de los adenovirus y los antígenos-T del virus SV40. La proteína E7 está dividida en tres regiones conservadas, denotadas de una manera análoga a las E1A de los adenovirus como: CR1, CR2 y CR3.³⁰

Las regiones CR2 y CR3 de E7 comparten secuencias homólogas con las regiones de la proteína E1A de los adenovirus y el antígeno-T SV40, incluido un motivo LXCXE estrictamente conservado con una gran afinidad de unión a pRb.³¹

La región CR3 de E7 contiene dos motivos CXXC que están separados por 29 o 30 residuos y que forman un dominio de unión a zinc,³² el cual también está presente en dos copias en la secuencia primaria de E6.³³ El principal blanco para E7 y otras oncoproteínas en la transformación celular es el supresor de tumor pRb. La proteína pRb representa una familia de proteínas estrechamente relacionada, que se unen a los factores de transcripción E2F y bloquean su función de activación transcripcional.³⁴ La fosforilación de pRb por la quinasa dependiente de ciclina/ciclina resulta en la disociación del complejo pRb-E2F y la activación transcripcional de los genes de la fase S, regulados por E2F.⁴ El ciclo viral del VPH está asociado con los procesos de diferenciación de la célula epitelial. La interacción entre E7 y pRb determina la degradación proteosomal y fosforilación de pRb con la liberación de E2F y la activación de los genes promotores de la proliferación celular. La acción de E7 induce a las células a entrar en la fase S del ciclo celular (incluyendo a las células del epitelio suprabasal) la cual asegura todos los factores necesarios para la replicación viral. La proteína E7 puede unirse directamente a E2F y mejorar la transcripción mediada por este.³⁵ E7 inhibe las funciones de p21 por la unión directa y contribuye de este modo, a la actividad de las quinasas dependientes de ciclina (CDK). Las quinasas dependientes de ciclina son las más importantes en el ciclo de división celular. La expresión de las ciclinas E y A y el regulador de subunidades de cdk2, conducen la progresión y entrada a la fase S, las cuales están bajo control de E2F y ambos son expresados en elevadas concentraciones en células que expresan a E7.³⁶

Una célula infectada por un virus, usualmente responderá con la producción de interferones (IFN) que tienen un efecto antitumoral y antiviral. Se ha demostrado que la proteína E7 del VPH 16 bloquea la actividad del IFN- α y el promotor del IFN- β .³⁷

Además de su papel en la proliferación celular, E7 también regula la apoptosis.³⁸ Algunos estudios han subrayado que las acciones de E7 parecen ser anti-apoptóticas. Por otra parte, la sobreexpresión de E7 en los queratinocitos genitales induce la muerte celular espontánea. La proteína E7 de los VPH AR incrementa la inestabilidad genómica en las células humanas primarias,³⁸ genera defectos mitóticos y aneuploidía como una consecuencia de ganancia o pérdida de cromosomas enteros durante la mitosis, o por inducción de centrosomas supernumerarios y mitosis multipolar.^{39,40} La E7 AR es capaz de dirigir la interacción con modificadores de cromatinas, tales como las diacetilas (HDAC) 1, 2, 3 y 8. Las HDAC están implicadas en la regulación de la transcripción de diferentes genes, incluidos todos aquellos que presentan promotores activados por el factor transcripcional E2F.⁴¹ Esta interacción adicionalmente afecta la expresión de los genes de la fase S. Estudios experimentales han demostrado que la mutación L67 de la proteína E7 del VPH, determina la imposibilidad para unirse a las HDAC y de afectar la habilidad del virus para permanecer en un estado episomal o completar los estados tardíos del ciclo viral.⁴² Al igual que la proteína E6, E7 interactúa con una gran cantidad de proteínas celulares.⁶

PROTEÍNA E5

El gen E5 de aproximadamente 230 a 250 pb, codifica para una proteína de 90 aminoácidos con un peso molecular de 14 kDa.⁴³ La proteína E5 del VPH 16 es hidrofóbica y está localizada en las membranas intracelulares (membrana plasmática, retículo endoplasmático, envoltura nuclear y complejo de Golgi).⁴⁴ La función principal de la proteína E5 es acomplejarse y regular la actividad de los receptores de los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o el derivado de las plaquetas (PDGFR).⁴⁵

Basado en las interacciones con otras proteínas, E5 parece ser una débil proteína transformadora; estas interacciones conducen a alteraciones en la actividad biológica normal y evasión de la respuesta inmune. El gen E5 codifica cortos péptidos hidrofóbicos, los cuales tienen actividad mitogénica y sinérgica con el EGFR.⁴⁶ En las infecciones con VPH AR, como por ejemplo, el VPH 16, el EGFR se incrementa de 2 a 5 veces en los queratinocitos humanos que expresan E5, lo que conduce a la proliferación celular; esto sugiere que la proteína E5 del VPH 16 desempeña un mayor papel en la expansión de las poblaciones de queratinocitos infectados con el VPH 16 *in vivo* mediante el aumento de las señales de crecimiento celular en células infectadas.

La oncoproteína E5 se une e inhibe la actividad de la subunidad de 16 kDa de la ATPasa vacuolar (ATPasa-V), con lo que altera la acidificación endosomal y la degradación de EGFR.⁴⁷ E5 puede también interactuar para alterar o mejorar la señalización con otros factores de crecimiento como:

- El receptor de endotelina (ET) acoplado a proteína G.⁴⁴ Esta interacción induce la actividad mitógena de ET-1 y conduce a la estimulación crónica de la correspondiente a los queratinocitos;
- El receptor del factor de crecimiento de queratinocitos/receptor del factor de crecimiento de fibroblasto 2b. La modulación de estos receptores es disminuida por E5, a través de la reducción de transcriptos y proteínas.⁴⁸

La conexina 43 interfiere con E5, con el objetivo de inhibir las comunicaciones mediadas por la unión entre células epiteliales en la monocapa⁴⁹ en el cultivo;⁵⁰ esto hace a las células transformadas más insensibles a las señales de control de crecimiento homeostático desde las células normales adyacentes. Además, E5 parece estar involucrada

en la inducción de la fusión celular,⁵¹ un crítico evento en el estado temprano de los VPH asociados a cáncer cervical. Resultados experimentales corroboran el papel de E5 en el cáncer cervical. Al parecer esta proteína viral incrementa la eficiencia de la inmortalización de los queratinocitos inducida por los oncogenes E6 y E7.⁵² Durante la infección temprana, E5 inhibe la muerte celular programada,⁵³ mediante diferentes mecanismos.⁵⁴ La proteína E5 del VPH 16 sensibiliza los queratinocitos humanos a la apoptosis inducida por estrés osmótico, tal vez debido a las modificaciones de la membrana celular, causadas por estas fuertes moléculas hidrofóbicas.⁵⁴ El papel de E5 en la transformación del VPH podría ser debido a la alteración de las respuestas inmunes, innata y adaptativa. La proteína E5 parece disminuir la regulación del MHC clase I (MHC-1), mediante la alcalinización de los compartimentos de la endomembrana⁵⁵ y la interacción directa de E5 con la cadena del MHC-1.⁵⁶

PROTEÍNA E2

El gen E2 de aproximadamente 1100 pb, codifica una proteína nuclear de 45 kDa, la que se divide en tres dominios funcionales; el primero, en el extremo amino terminal, es el dominio de activación E2TAD, responsable de regular la transcripción y la replicación del ADN viral,^{57,58} el segundo dominio es el de bisagra o dominio central, de longitud y secuencia más variable entre los VPs. En el VPH 11, el dominio central es importante para regular la función de E2 durante la transcripción del ARNm y la replicación viral, además de proporcionar estabilidad al complejo E2-ADN. El tercer dominio, en el extremo carboxilo terminal, es de dimerización y de unión al ADN, de aproximadamente 100 aminoácidos. La proteína E2 de todas las cepas virales tienen en común el hecho unirse a una secuencia de ADN palindrómica (ACCgNNNNcGGT, las letras pequeñas indican los nucleótidos preferidos; la región NNNN es llamada espaciador), referida como el sitio de unión a E2. No obstante, existen diferencias específicas en cepas virales en cuanto a la habilidad de la proteína E2 para discriminar entre los sitios de unión.⁵⁹

La proteína E2 del VPH exhibe funciones complejas independientes de la transcripción y puede modular las células hospederas con respecto al ciclo replicativo viral. Existen resultados que señalan que esta proteína podría estar involucrada en la carcinogénesis temprana.⁶⁰ La proteína E2 actúa como un represor de la transcripción de los genes E6 y E7, además está involucrada en la transcripción y replicación viral,⁶¹ formando conjuntamente con E1 un complejo con origen viral de replicación y reclutamiento de la maquinaria replicativa del ADN celular, para facilitar la replicación del ADN viral.⁶² Se ha demostrado que E2 es expresada en concentraciones relativamente elevadas, en células diferenciadas de las capas intermedias de las lesiones neoplásicas intraepiteliales cervicales. Por otra parte, su expresión es disminuida con la progresión de lesiones y está ausente en la mayoría de los tumores *in situ*, siendo inversamente correlacionada con la expresión de E7.⁶⁰ E2 es una proteína inestable expresada tanto en núcleo como en el citoplasma de la célula infectada, y es degradada a través de los proteosomas.⁶³

PROTEÍNA E1

El gen E1 es el más grande y uno de los más conservados de los PVs, de aproximadamente 2 Kb, el cual codifica una proteína E1 con un peso molecular de alrededor de 67,5 kDa para el VPH 47 y 76.2 kDa para VPH 10. La proteína se divide en tres regiones: un dominio amino terminal, que se sospecha regula las actividades de E1 residentes en la región C-terminal, una región espaciadora de longitud variable y una región carboxilo terminal más grande, relacionada con la función de las ATPasas y helicasas. E1 es una helicasa hexamérica dependiente de ATP, que participa en la replicación del ADN viral. Estas funciones de ATPasa y de helicasa hacen de esta proteína viral la única con actividad enzimática y se hallan codificadas en el dominio carboxilo terminal.^{64,65} No obstante se han reportado otras interacciones de la proteína E1 con otras proteínas celulares como: la ADN polimerasa- α , Histona H1, RPA, In1/hSNF5, chaperonas Hsp40 y Hsp70.⁶

Interacción E1-E2

La interacción entre E1 y E2 es un componente esencial de la capacidad de E1 para estimular la replicación. Esta interacción parece involucrar por lo menos dos regiones de E1, la cual puede unirse independientemente al dominio de activación N-terminal de la proteína E2.⁶⁶ Las mutaciones en cualquiera de las dos regiones de E1, interrumpen sus respectivas interacciones con E2, causando un mal funcionamiento durante la replicación *in vivo*.⁶⁷

E1 se une al origen de replicación, a una secuencia palindrómica de 18 pb rica en A y T que se halla en la región LCR, formando hexámeros y dobles hexámeros. El hexámero rodea al ADN de modo que el sustrato pasa a través del centro del anillo hexámerico.^{64,65} La unión de E1 al sitio de origen causa una curvatura, crítica para el correcto ensamblaje del complejo de iniciación y para las primeras etapas del desenrollamiento de la doble hélice.⁶⁸ E1 interacciona directamente con la ADN polimerasa α , mientras que esta necesita las proteínas de replicación A, que estabilizan la cadena sencilla del dúplex abierto y las topoisomerasas I y II y los cofactores PCNA y RFC (factor de replicación C) para que se lleve a cabo la replicación.

La unión de E1 a su sitio en la region LCR depende a su vez, de su acomplejamiento con la proteína viral E2, la cual aumenta la especificidad de E1 por su secuencia, así como su capacidad para desenrollar la doble hélice. Las

interacciones E2-E1 hacen que E2 atraiga otras moléculas de E1 a un complejo inicial E2-E1-ADN. Conforme se ensamblan oligómeros más grandes de E1 y E2 este es finalmente desplazado mediante una reacción dependiente de ATP.^{57,58} E2 también actúa como un complejo represor de la transcripción que inhibe la expresión de la oncoproteína viral E6⁶⁹ en los queratinocitos,⁷⁰ la cual a su vez, regula la transcripción de los genes diana de p53.⁶⁹ La proteína E2 desempeña también un papel importante en la segregación del genoma viral durante la división celular al fusionar el genoma viral al cromosoma mitótico.⁷¹

PROTEÍNA E4

La secuencia que codifica para la proteína E4, es de aproximadamente 260 pb, la cual está contenida dentro del marco de lectura de E2. La proteína E4 tiene un peso molecular de alrededor de 10 a 44 kDa; es expresa a partir de un ARNm procesado (E1[^]E4) de manera abundante durante las etapas tardías del ciclo viral y la replicación vegetativa del ADN viral.^{72,73} La expresión de E4 precede la síntesis de las proteínas estructurales del virus y el ensamblaje de las partículas virales. La proteína E4 se localiza asociada con los filamentos intermedios de queratina, los cuales afectan la estabilidad mecánica de la red de queratina, lo que puede facilitar la liberación de los viriones.⁷⁴

La expresión de E4 está en gran medida restringida al citoplasma de la célula del epitelio suprabasal,⁷⁵ pero también se ha encontrado de manera difusa en regiones perinucleares. E1[^]E4 de VPH 16 causa arresto en la fase G2 del ciclo celular cuando se expresa en células HeLa y SiHa. Esto sugiere un papel antagonista con la proliferación celular inducida por E7 durante la etapa productiva de la infección, así como el requerimiento de E1[^]E4 y E2 para inhibir la división celular durante el ciclo viral.⁷⁶

E4 puede expresarse conjuntamente con E1 y E2 durante la infección. El hecho de que ambas proteínas, E2 y E4, pueden inhibir el ciclo celular, sugiere que cooperan durante el ciclo viral. La expresión elevada de E2 y E4 en un cultivo de células epiteliales provoca la acumulación de E2 en el citoplasma y la co-localización de esta con E4. El incremento de E4 afecta la transcripción mediada por E2, dependiendo de las concentraciones relativas de ambas proteínas. Se ha demostrado que E4 regula los niveles de la proteína nuclear E2 para facilitar la amplificación del genoma viral y la expresión de proteínas tempranas.⁷⁷

PROTEÍNA E8[^]E2

El marco abierto de lectura de E2 da lugar a múltiples productos génicos mediante la alternativa del empalme de ARN. Las células infectadas con los VPH 1, VPH 11, VPH 16, VPH 31 y VPH 33 expresan un transcripto E8[^]E2C de aproximadamente 20 kDa,⁷⁸ en el cual un pequeño dominio de E8 es fusionado al dominio C-terminal de E2 (E2C).⁷⁹ La inactivación de E2 en el genoma del VPH 16 incrementa la transcripción de los genes E6 y E7.⁸⁰ La mutación del gen E8[^]E2C en los genomas virales de VPH 31 y VPH 16 incrementan el número de copias de los transcriptos E6 y E7, lo que sugiere que la represión transcripcional por E8[^]E2C desempeña un papel importante en la replicación viral.⁸¹ El dominio E2C de E8[^]E2C compartido con E2 es el responsable del reconocimiento de la secuencia específica de los sitios ACCNNNNNNGGT del ADN, así como la homo y heterodimerización de la proteína E2.⁸²

PROTEÍNA L2

La proteína L2 es el componente secundario de la cápsida con un peso molecular aproximado de 75 kDa.¹⁴ Estudios de reconstrucción en tres dimensiones muestran una estequiometría 30:1 en la composición de L1:L2, ubicando las unidades L2 en el espacio cónico central de los capsómeros pentavalentes.^{83,84} Estudios realizados con el genotipo del VPH 11 muestran que la interacción entre L1 y L2 es de tipo hidrofóbico y que en ella participan las prolinas de las posiciones 413 y 419 de L2. La proteína L2 tiene dos funciones importantes en la infectividad del virus. Por un lado, participa en el proceso de encapsidación,⁸⁵ mediante el reclutamiento de pentámeros de L1 y del genoma viral.⁸⁶ Específicamente, L2 se une al ADN viral a través de aminoácidos cargados positivamente en los extremos amino y carboxilo.⁹ Dicha biomolécula está ubicada en la región más interna de la cápside, sin embargo, un pequeño segmento de esta proteína, se encuentra expuesto en la superficie, el cual puede inducir la neutralización de anticuerpos anti-L2. Estos anticuerpos son menos potentes que los anti-L1,⁸⁷ pero parecen mostrar alguna reactividad cruzada para los tipos heterólogos del VPH.⁸⁸ Por otra parte, se ha demostrado en condiciones *in vitro* que los anticuerpos dirigidos contra los epítopes de la proteína L2 son capaces de bloquear la infectividad del virus, aunque estos anticuerpos no necesariamente reconocen aminoácidos implicados en la entrada del virus a la célula huésped, lo que permite concluir que la proteína L2 participa en el proceso de adhesión celular como un ligando secundario. En este sentido, los residuos de los aminoácidos del 13 al 31 y del 108 al 126 en L2 desempeñan un papel importante en la interacción ligando-receptor.⁸⁴

PROTEÍNA L1

L1 es la principal proteína estructural de la cápside debido a su participación en la entrada del virus a la célula hospedera^{5,86} y además, induce una respuesta inmune protectora. En la estructura tridimensional de esta proteína se distinguen tres regiones bien definidas: el núcleo y los extremos amino y carboxilo.⁹ La proteína L1 tiene un peso

molecular apróximo de 57 kDa y está compuesta por 504 aminoácidos. El extremo amino lo componen los primeros 19 aminoácidos que están marcadamente conservados entre los diferentes genotipos, lo que sugiere que cumplen un papel fundamental en el ensamblaje de la partícula viral.⁸⁷

En la región central o el núcleo de la proteína se encuentran ubicados los aminoácidos del 20 al 382 cuya estructura tiene forma de barril compuesto por 11 láminas β plegadas (β -B1, β -B2, β -C, β -D, β -E, β -F, β -G1, β -G2, β -H1, β -H2, β -I) las cuales están conectadas entre sí por los lazos o bucles B-C, C-D, D-E, E-F, F-G, H-I que están expuestos en la superficie del capsómero. Entre los lazos F-G y H-I y las láminas β -F y β -G1 respectivamente, se establecen puentes de hidrógeno que mantienen los monómeros de L1 juntos y confieren estabilidad a la estructura terciaria del barril.⁹

Los aminoácidos del 383 al 504 están en el extremo carboxilo y en él se ubican 4 de las cinco hélices α (h2, h3, h4 y h5) que tiene esta proteína. La hélice α h1 interacciona con las láminas β -E y β -F en la parte central o núcleo de la proteína. Las hélices α h4 y α h5, albergan la lámina β -J y esta ancla el brazo C-terminal a la región terminal central o núcleo de la proteína. El brazo C-terminal es muy flexible gracias a que las posiciones de la 403 a la 413 son ricas en glicinas y prolinas. Se ha postulado que este segmento actúa como una bisagra que facilita los reordenamientos espaciales que debe hacer el extremo carboxilo para asegurar la estabilidad de la cápside viral.⁹ El extremo carboxilo, también es importante para mantener la integridad de L1, ya que cuando se introducen mutaciones en este extremo, la cápside es más susceptible a la digestión proteolítica por tripsina.⁸⁷

El conocimiento acerca de la estructura de la proteína L1 es importante porque permite determinar las regiones expuestas en la superficie de esta proteína, lo cual tiene implicaciones en la ubicación de epitopes neutralizantes que pueden ser determinantes importantes para la protección inmune mediada por anticuerpos, lo que constituye una información esencial para el desarrollo e implementación de futuras vacunas profilácticas. Mucho del conocimiento acumulado acerca de la cápside del VPH 16, se logró mediante el uso de anticuerpos monoclonales y la construcción de partículas semejantes a virus (VLP, del inglés virus-like particles) híbridas (intercambio de aminoácidos de la proteína L1 provenientes del VPH 16 y de otros genotipos en el esqueleto de la proteína L1, tales como VPH 52, VPH 31, los virus del papiloma bovino y de conejo).⁸⁸ La creación de estas quimeras o híbridos ha sido posible gracias a que las cápsides del VPH de estos PVs muestran una gran similitud estructural, aunque la semejanza de sus secuencias de aminoácidos es solo del 50 %.⁸⁷ La secuencia de aminoácidos de la proteína L1 presenta regiones conservadas e hipervariables. Estas últimas están preferentemente ubicadas en zonas expuestas en la superficie del capsómero. Estas regiones variables son las que conforman los bucles o asas B-C, D-E, F-G y H-I.^{9,89,90}

De manera general, las características estructurales y funcionales de las proteínas codificadas por el VPH son aprovechadas en el diseño de vacunas profilácticas y terapéuticas.^{91,92} No obstante, solo dos de las vacunas profilácticas, actualmente en el mercado (Gardasil® y Cervarix®) han podido ser aprobadas para su uso en humanos.⁹³⁻⁹⁵

PARTÍCULAS SEMEJANTES A VIRUS Y DESARROLLO DE VACUNAS

El punto de partida de las metodologías en el desarrollo de vacunas profilácticas para el VPH, lo constituyó el descubrimiento de que la proteína L1 de los PV podía autoensamblarse en una VLP, la cual es estructuralmente y antigenicamente muy similar a los viriones auténticos. Este hallazgo fue primeramente demostrado en el virus del papiloma bovino tipo 1, y más tarde, fue confirmado para las VLP de los VPH. Las VLPs han sido generadas en una variedad de cultivos celulares, que incluyen a los mamíferos, insectos, levaduras e incluso a las bacterias.⁹⁶

El uso de las VLP obtenidas por vía recombinante, como inmunógenos o vacunas se ha incrementado exitosamente en los recientes años. La mayoría de las vacunas contra las enfermedades virales se han basado en cepas de virus atenuados y en la inactivación de virus infecciosos. El autoensamblaje de las proteínas recombinantes de cápside viral y los correspondientes capsómeros en cápsides vacías, es una estrategia prometedora para la producción y diseño de vacunas contemporáneas. Las VLP pueden provocar una respuesta inmune protectora que imita la respuesta auténtica inducida por los epitopes de los viriones.⁹⁷

En la actualidad, existen dos vacunas profilácticas contra el VPH en el mercado; producidas y comercializadas de forma independiente por dos compañías: Cervarix®, de GlaxoSmithKline (GSK), y Gardasil®, de Merck, Sharp and Dohme (MSD) a través de su asociación con Sanofi Pasteur. Ambas están basadas en VLP preparadas a partir de la proteína L1 obtenida mediante sistemas de expresión *in vitro*. MSD ha optado por la utilización de un vector de expresión basado en *Saccharomyces pombe* mientras que GSK utiliza baculovirus/*Tricoplusia ni*. La vacuna Cervarix® incluye VLP de las proteínas L1 de VPH 16 y VPH18, mientras que Gardasil® utiliza, además de VLP de las L1 de los tipos mencionados, VLP de los tipos de bajo riesgo más frecuentemente asociados a verrugas genitales: VPH 6 y VPH 11. La vacuna Gardasil® incluye un adyuvante tradicional basado en el aluminio que proporciona un resultado adecuado entre tolerancia y eficacia.⁹³ Por el contrario, Cervarix® utiliza un adyuvante relativamente novedoso (AS04) con el objetivo de potenciar una protección sostenida mediante títulos elevados de anticuerpos a la vez que se induce la inmunidad celular. En ambos casos, se obtiene protección contra las neoplasias cervicales y, en el caso de la vacuna tetravalente, también contra los condilomas.⁹⁸

No obstante, estas vacunas basadas en VLP tienen un costo económico elevado, e incluyen solo dos de los 15 tipos virales oncocéntricos. Los retos para el diseño de futuras vacunas contra los VPH deberán estar centrados en: ampliar

la cobertura de las vacunas de manera que no solo sean efectivas contra los VPH 16 y VPH 18, sino que también incluyan otros inmunógenos que permitan combatir otros tipos virales oncogénicos; deben ser capaces de inducir una protección a largo plazo (décadas) así como mantener el casi 100 % de la eficacia de las vacunas actuales; deben ser baratas; termoestables y preferiblemente suministradas por métodos no inyectables.⁹⁹

CONCLUSIONES

La biología molecular del VPH es interesante y compleja. Aunque se ha dificultado el estudio de las interacciones de las proteínas del VPH con las proteínas de la célula hospedera, existen algunos avances en la comprensión de la interacción virus-célula, así como en la transcripción, replicación y ensamblaje viral. Durante la infección por el VPH; las proteínas virales desempeñan múltiples roles mediante disímiles interacciones con una gran cantidad de proteínas celulares, donde estas proteínas virales median fundamentalmente la interferencia de algunas vías de señalización celular con el fin de crear un ambiente favorable para la replicación viral y la neutralización de algunos mecanismos clave del control celular, que son activados para forzar a la célula a recomenzar su ciclo de síntesis de ADN celular. Las vacunas profilácticas, Cervarix® y Gardasil® constituyen actualmente dos de las alternativas más seguras para la prevención del desarrollo de enfermedades oncogénicas, producidas por el VPH. No obstante, estas dos vacunas presentan un elevado costo, además de que solo incluyen en su formulación dos de los tipos virales oncogénicos, lo cual pudiera contribuir con la invariabilidad de los índices promedios de muertes humanas por año en todo el mundo, provocadas por las enfermedades producidas por el VPH.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bernard H, Burk D, Chen Z, Doorslaer K, Hausen V, Villiers M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010; 401: 70-79.
2. Fernandes V, Araújo J, Fernandes M. Biology and natural history of human papillomavirus infection. *Open Access J Clin Trials*. 2013; 5:1-12.
3. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006; 124:S1-S15.
4. Yue Y, Yang H, Wu K, Yang L, Che J, Huang X, et al. Genetic Variability in L1 and L2 Genes of HPV-16 and HPV-58 in Southwest China. *Plos One*. 2013; 8:e55204.
5. Prabhu S, Wilson D. Human papillomavirus and oral disease – emerging evidence: a review. *Aust Dental J*. 2013; 58:2-10.
6. The health professional's HPV HANDBOOK. 1: Human papillomavirus and cervical cancer. 2004. The European Consortium for Cervical Cancer education. Taylor & Francis Group.
7. Sapp M, Volpers C, Müller M, Streeck R. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J Gen Virol*. 1995; 9: 2407-2412.
8. Lowy D, Howley M. Papillomaviruses. In *Fields Virology*. 3rd Howley PM, Knipe D.M. (ed). Philadelphia: 2001: p.2197-31.
9. Chen S, Garcea L., Goldberg I, Casini G, Harrison C. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell*. 2000; 5: 557-567.
10. Casini L, Graham D, Heine D, Garcea L, Wu T. in vitro papillomavirus capsid assembly analyzed by light scattering. *Virology*. 2004; 325: 320-327.
11. Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 2:55-78.
12. Stanley M, Pett M, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans*. 2007; 53: 1456-1460.
13. Bodily J, Laimins L. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol*. 2011; 19:33-39.
14. Conway J, Meyers C. Replication and assembly of human papillomaviruses. *J Dent Res*. 2009; 88: 307-317.
15. Hengstermann A, Linares L, Ciechanover A. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 1218-23.
16. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. 2001; 20: 7874-87.
17. Cole S, Danos O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol*. 1987; 193: 599-608.
18. Grossman R, Laimins A. E6 protein of human papillomavirus type binds zinc. *Oncogene*. 1989; 4:1089-1093.
19. Lipari F, McGibbon A, Wardrop E, Cordingley G. Purification and biophysical characterization of a minimal functional domain and of an N-terminal Zn²⁺-binds fragment from the human papillomavirus type 16 E6 proteins. *Biochemistry*. 2001; 40: 1196-1204.

20. Ristriani T, Nomine Y, Masson M, Weiss E, Trave G. Specific recognition of fourway DNA junctions by the C-terminal zinc-binding domain of HPV oncoprotein E6. *J Mol Biol.* 2001; 305: 729-739.
21. Scheffner M, Huibregtse J, Vierstra R, Howley P. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 1993; 75: 495-505.
22. Ronchi V, Klein J, Haas A. E6AP/UBE3A Ubiquitin Ligase Harbors Two E2-ubiquitin Binding Sites. *Journal Bio Chemistry.* 2013; 288: 10349-10360.
23. Scheffner M, Huibregtse M, Vierstra D, Howley M. The HPV-16 E6 and E6- AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 1993; 75: 495-505.
24. Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway A. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev.* 2004; 18: 2269-2282.
25. Heather L, Katzenellenbogen A, Galloway A. Papillomavirus E6 proteins. *Virology.* 2009; 384: 324-334.
26. Murray-Zmijewski F, Elizabeth A, Lu X A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev .Molecular Cell Biology.* 2008; 9: 702-712.
27. Liang Y, Liu J, Feng Z. The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. *Cell & Bioscience.* 2013; 3: 9.
28. Yi W, Jang M, Kim J, Kim S, Rhee E. Degradation of p53 by natural variants of the E6 protein of human papillomavirus type 16. *Oncol.Reports.* 2013; 29: 1617-1622.
29. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *V Genes.* 2010; 40: 1-13.
30. Phelps C, Yee L, Munger K, Howley M. *Cell.* 1988; 53: 539-547.
31. Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisseljov F, Einenkel J, Hoeckel M, von Knebel Doeberitz M. A Comprehensive Analysis of HPV Integration Loci in Anogenital Lesions Combining Transcript and Genome-Based Amplification Techniques. *Oncogene.* 2003; 22: 3977-3984.
32. Bosch X, Lorincz A, Munoz N, Meijer J, Shah V. The Causal Relation between Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *J Clin. Pat.* 2002; 55: 244- 65.
33. Yu T, Ferber J, Cheung H, Chung K, Wong F, Smith I. The Role of Viral Integration in the Development of Cervical Cancer. *Canc G Cyt.* 2005; 158: 27-34.
34. Evans W, Filippova M, Swensen R, Duerksen-Hughes P. Modern Molecular and Clinical Approaches to Eradicate HPV-Mediated Cervical Cancer *Intech.* 2013; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5772/55810>. [Consultado: 25 de abril del 2013.]
35. Hwang G, Lee D, Kim J, Seo T, Choe J. Human Papillomavirus Type 16 E7 Binds to E2F1 and Activates E2F1-Driven Transcription in a Retinoblastoma Protein Independent Manner. *J Biological Chem.* 2002; 277:2923-2930.
36. Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Durr P. Sequential Activation of Cyclin E and Cyclin A Gene Expression by Human Papillomavirus Type 16 E7 Through Sequences Necessary for Transformation. *J Virol.* 1995; 69:6389-6399.
37. Park S, Kim J, Kwon J, Hwang S, Namkoong E, Um J. Inactivation of Interferon Regulatory Factor-1 Tumor Suppressor Protein by HPV E7 Oncoprotein. Implication for the E7-Mediated Immune Evasion Mechanism in Cervical Carcinogenesis. *J Biological Chem.* 2000; 275: 6764-6769.
38. White A, Livanos M, Tlsty D. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes & Dev.* 1994; 8: 666-677.
39. Duensing S, Munger K. The Human Papillomavirus type 16 E6 and E7 Oncoproteins Independently Induce Numerical and Structural Chromosome Instability. *Cancer Res.* 2002; 62: 7075-7082.
40. Duensing S, Münger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: Insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. 2004; 109: 157-162.
41. De Ruijter J, van Gennip H, Caron N, Kemp S, van Kuilenburg B. Histone Deacetylases (HDACs): Characterization of the Classical HDAC Family. *Bioch J.* 2003; 370: 737-749.
42. Longworth S, Laimins A. The Binding of Histone Deacetylases and the Integrity of Zinc Finger-Like Motifs of the E7 Protein are Essential for the Life Cycle of Human Papillomavirus Type 31. *J Virol.* 2004; 78: 3533-3541.
43. Sparkowski J, Anders J, Schlegel R. E5 oncoprotein retained in the endoplasmic reticulum/cis Golgi still induces PDGF receptor autophosphorylation but does not transform cells. *EMBO J.* 1995; 14: 3055-3063.
44. Venuti A, Salani D, Poggiali F, Manni V, Bagnato A. The E5 Oncoprotein of Human Papillomavirus Type 16 Enhances Endothelin-1-Induced Keratinocyte Growth. *Virology.* 1998; 248: 1-5.
45. Hwang S, Nottoli T, DiMaio D. The HPV 16 E5 protein; expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology.* 1995; 211: 227-233.
46. Bouvard V, Matlashewski G, Gu M, Storey A, Banks L. The Human Papillomavirus Type 16 Gene Cooperates with the E7 Gene to Stimulate Proliferation of Primary Cells and Increases Viral Gene Expression. *Virology.* 1994; 203: 73-80.

47. DiMaio D, Mattoon D. Mechanisms of Cell Transformation by Papillomavirus E5 Proteins. *Oncogene*. 2001; 20: 7866-7873.
48. Belleudi F, Leone L, Purpura V, Cannella F, Scrofani C, Torrisi R. HPV16 E5 Affects the KGFR/FGFR2b-Mediated Epithelial Growth Through Alteration of the Receptor Expression, Signalling and Endocytic Traffic. *Oncogene*. 2011; 30:4963-4976.
49. Oelze I, Kartenbeck J, Crusius K, Alonso A. Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein Affects Cell-Cell Communication in an Epithelial Cell Line. *J Virol*. 1995; 69: 4489-4494.
50. Tomakidi P, Cheng H, Kohl A, Komposch G, Alonso A. Connexin 43 Expression is Downregulated in Raft Cultures of Human Keratinocytes Expressing the Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein. *Cell and Tissue Research*. 2000; 301: 323-327.
51. Hu L, Potapova A, Li S, Rankin S, Gorbsky J, Angeletti C, Ceresa P. Expression of HPV16 E5 Produces Enlarged Nuclei and Polyploidy through Endoreplication. *Virology*. 2010; 405: 342-351.
52. Stoppler MC, StraightSW, Tsao G, Schlegel R, McCance DJ. The E5 Gene of HPV-16 Enhances Keratinocyte Immortalization by Full-Length DNA. *Virology*. 1996; 223: 251-254.
53. Zhang B, Spandau F, Roman A. E5 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Protects Human Foreskin Keratinocytes from UV B-Irradiation-Induced Apoptosis. *J Virology*. 2002; 76: 220-231.
54. Kabsch K, Alonso A. The Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) E5 Protein Sensitizes Human Keratinocytes to Apoptosis Induced by Osmotic Stress. *Oncogene*. 2002; 21: 947-953.
55. Schapiro F, Sparkowski J, Adduci A, Schlegel R, Grinstein S. Golgi Alkalinization by the Papillomavirus E5 Oncoprotein. *J Cell Biol*. 2000; 148: 305-315.
56. Cortese S, Ashrafi H, Campo S. All Four Di-Leucine Motifs in the First Hydrophobic Domain of the E5 Oncoprotein of Human Papillomavirus Type 16 are Essential for Surface MHC Class I Downregulation Activity and E5 Endomembrane Localization. *Int J Canc*. 2010; 126: 1675-1682.
57. McBride A, Myers G: The E2 proteins. Human papillomavirus. Los Alamos National Laboratory. 1997: 54-72.
58. Hegde S. The papillomavirus E2 proteins: Structure, function, and biology. *Annu. Rev Biomol Struct*. 2002; 31: 343-60.
59. Hines S, Meghoo C, Shetty S, Biburger M, Brenowitz M, Hegde, S. *J Mol Biol*. 1998; 276: 809-81.
60. Bellanger S, Tan L, Xue Z, Teissier S, Thierry F. Tumor Suppressor or Oncogene? A Critical Role of the Human Papillomavirus (HPV) E2 Protein in Cervical Cancer Progression. *Ame J Cancer Res*. 2011; 1: 373-389.
61. Thierry F. Transcriptional Regulation of the Papillomavirus Oncogenes by Cellular and Viral Transcription Factors in Cervical Carcinoma. *Viroogy*. 2009; 384: 375-379.
62. Cai Q, Liang L, Shao Q, Li X, Dian A. Human papillomavirus early proteins and apoptosis. *Arch Gyn Obstetrics*. 2013; 287: 541-548.
63. Blachon S, Bellanger S, Demeret C, Thierry F. Nucleo-Cytoplasmic Shuttling of High Risk Human Papillomavirus E2 Proteins Induces Apoptosis. *J Biol Chem*. 2005; 280: 36088-36098.
64. Fouts T, Yu X, Egelman H. Biochemical and electron microscopic image analysis of the hexameric E1 helicase. *J Biol Chem*. 1999; 274: 4447-4458.
65. Liu S, Kuo R, Makhov M. Human Hsp 70 and Hsp 40 proteins facilitate human papillomavirus type 11 E1 protein to binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. *J Biol Chem*. 1998; 273: 30704-30712.
66. Leng, X, Ludes-Meyers J, Wilson G. Isolation of an amino-terminal region of bovine papillomavirus type 1 E1 protein that retains origin binding and E2 interaction capacity. *J Virol*. 1997; 71: 848-852.
67. Hibma H, Raj K, Ely J, Stanely M, Crawford L. The interaction between human papillomavirus type 16 E1 and E2 proteins is blocked by an antibody to the N-terminal region of E2. *Eur J Biochem*. 1995; 229: 517-525.
68. Gillitzer E, Chen G, Stendlund A. Separate domains in E1 and E2 proteins serve architectural and productive roles for cooperative DNA binding. *EMBO J*. 2000; 19: 3069-3079.
69. Wu Y, Lee Y, Hou Y, KemperK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Chiang M. Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing. *Genes Dev*. 2006; 20: 2383-2396.
70. Demeret C, Desaintes C, Yaniv M, Thierry F. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J Virol*. 1997; 71: 9343-9349.
71. Skiadopoulos H, McBride A. Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J Virol*. 1998; 72: 2079-2088.
72. Doorbar A, Parton K, Hartley L, Banks T. Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology*. 1990; 178: 254-262.

73. Nasser M, Hirochika R, Broker R, Chow L. A human papillomavirus type 11 transcript encoding an E1^E4 protein. *Virology*. 1987; 159: 433-439.
74. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nat*. 1991; 352: 824-827.
75. Brown R, Bryan T, Pratt L, Handy V, Fife H, Stoler H. Human papillomavirus type 11 E1-E4 and L1 proteins colocalize in the mouse xenograft system at multiple time points. *Virology*. 1995; 214: 259-263.
76. Deborah E, Jackson J, Doorbar J. Identification of a G2 Arrest Domain in the E1^E4 Protein of Human Papillomavirus Type 16. *J Virol*. 2002; 76: 9806-9818.
77. Saavedra L, Soberón L. Cancer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*. 2006; 31-55.
78. Stubenrauch F, Zobel T. The E8 domain confers a novel long distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high risk human papillomavirus type 31. *J Virol*. 2001; 75: 4139-49.
79. Jeckel S, Loetzsche E, Huber E, Stubenrauch F, Iftner T. Identification of the E9/E2C cDNA and functional characterization of the gene product reveal a new repressor of transcription and replication in cottontail rabbit papillomavirus. *J Virol*. 2003; 77: 8736-8744.
80. Soeda E, Ferran C, Baker C, McBride A. Repression of HPV16 early region transcription by the E2 protein. *Virology*. 2006; 351: 29-41.
81. Flanagan F, Blus J, Kim D, Clines L, Rastinejad F, Khorasanizadeh S. Molecular implications of evolutionary differences in CHD double chromodomains. *J Mol Biol*. 2007; 369: 334-342.
82. Fertey J, Ammermann I, Winkler M, Stoger R, Iftner T, Stubenrauch F. Interaction of the Papillomavirus E8^E2C Protein with the Cellular CHD6 Protein Contributes to Transcriptional Repression. *J Virol*. 2010; 84:9505-9515.
83. Ishii Y, Ozaki S, Tanaka K, Kanda T. Human papillomavirus 16 minor capsid protein L2 helps capsomeres assemble independently of intercapsomeric disulfide bonding. *Vir Genes*. 2005; 31: 321-8.
84. Yang R, Day M, Yutzy H, Lin Y, Hung F, Roden B. Cell surfacebinding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection. *J Virol*. 2003; 77: 3531-41.
85. Finnen L, Erickson D, Chen S, Garcea L. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*. 2003; 77: 4818-26.
86. Florin L, Sapp C, Streeck E, Sapp M. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol*. 2002; 76:10009-14.
87. Roden B, Yutzy H, Fallon R, Inglis S, Lowy R, Schiller T. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology*. 2000; 270: 254-257.
88. Modis Y, Trus L, Harrison C. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J*. 2002; 21: 4754-62.
89. Carter J, Wipf C, Benki F, Christensen D, Galloway A. Identification of a human papillomavirus type 16-specific epitope on the C-terminal arm of the major capsid protein L1. *J Virol*. 2003; 77: 11625-32.
90. Schiller J, Lowy D. Papillomavirus-like particles and HPV vaccine development. *Semin Cancer Biol*. 1996; 7: 373-82.
91. Hung C, Barbara Ma, Monie A, Tsen S, Wu T. Therapeutic human papillomavirus vaccines: current clinical trials and future directions. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8: 421-439.
92. Schiller TJ, Castellsagué X, Villa LL, H Allan. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine*. 2008;10: K53-61.
93. Marlow LA, Zimet GD, McCaffery KJ, Ostini R, Waller J. Knowledge of human papillomavirus (HPV) and HPV vaccination: An international comparison. *Vaccine*. 2013; 31(5): 763-769.
94. Rowhani-Rahbar A, Alvarez FB, Bryan JT, Hughes JP, Hawes SE, Weiss NS, Koutsky LA. Evidence of immune memory 8.5 years following administration of a prophylactic human papillomavirus type 16 vaccine. *Lancet*. 2012; 53: 239-243.
95. Joura EA, Garland SM, Paavonen J, Ferris DG, Perez G, Ault KA. Effect of the human papillomavirus (HPV) quadrivalent vaccine in a subgroup of women with cervical and vulvar disease: retrospective pooled analysis of trial data. *BMJ*. 2012; 344:e1401.
96. Zhao Q, Modis Y, High K, Towne V, Yuan M, Wang Y, et al. Disassembly and reassembly of human papillomavirus virus-like particles produces more virion-like antibody reactivity. *J Virol*. 2012; 9: 52.
97. Ruiz W, McClements L, Jansen U, Esser T. Kinetics and isotype profile of antibody responses in rhesus macaques induced following vaccination with HPV 6, 11, 16 and 18 L1-virus-like particles formulated with or without Merck aluminum adjuvant. *J Immune Based The Vaccines*. 2005; 3: 2.
98. Harper M, et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *HPV Vaccine Study group. Lancet*. 2006; 367: 1247-1255.
99. Stanley A. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol*. 2010; 117: S5-S1.