



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

ANALISIS DE INTERACCIONES ADN-PROTEINAS
EN LA REGION LARGA DE CONTROL DEL
PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO-18

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

CESAR BRAVO BOLAÑOS

LOS REYES IZTACALA, MEXICO.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Alejandro García Carrancá, en el laboratorio del Dr. Patricio Gariglio Vidal en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN) Ciudad de México y fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

DEDICATORIA

A mis padres Celia y Alejo por haberme dado la vida y guiarme através de ella hacia la superación, dándome la libertad de buscar un destino.

A mis hermanos Ivonne, Rocío, Alejandro, Napoleón, Antonio, Oscar, Jorge y Bernabé, esperando que sea un estímulo para que continuen desarrollando sus proyectos, como para mí lo es el compartir esta existencia con ellos.

A todos mis incontables amigos con los cuales he tenido la oportunidad de disfrutar ese gran tesoro que es la amistad.

" Me fui al bosque porque deseaba vivir deliberadamente, afrontar solo los hechos esenciales de la vida, y ver si podía aprender lo que ella podía enseñarme, y así no descubrir en el instante de mi muerte, que no había vivido ".

Henry Thoreau

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alejandro García Carrancá el haberme ofrecido su enseñanza y amistad lo cual ha sido muy valioso e instructivo para mí; al Dr. Patricio Gariglio su apoyo en la discusión del proyecto y el permitirme realizar el presente trabajo en su laboratorio; al Biól. Luis Marat Alvarez su gran ayuda y compañerismo, a Biól. Laura B. Avilés, P. de B. Rocío Zamorano, P. de Ing. Amb. Luz Ma. Rangel, Q. F. B. Consuelo Rodríguez, P. de B. Pedro Chávez, Biól. Enrique Miranda, Q. B. P. Mauricio Salcedo, Q. B. P. Raúl Melendez y Tec. Mario García por su apoyo y amistad que siempre fueron un gran aliciente para mí.

A todas las muchas personas con las cuales compartí momentos muy agradables en el laboratorio. Y un especial agradecimiento al Biól. Efraín Garrido Guerrero por su amistad incondicional que siempre tendré presente.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	2
INTRODUCCION.....	3
Cáncer cérvico-uterino.....	5
Papilomavirus humanos y CaCU.....	6
Biología molecular de los PVH.....	7
Mecanismos de transformación.....	11
Especificidad tisular de los PVH.....	13
OBJETIVOS.....	18
MATERIAL Y METODOS.....	19
Ensayos de retardamiento en gel.....	22
Aislamiento de núcleos y preparación de extractos.....	23
Cultivos celulares.....	24
Preparación de bacterias competentes.....	25
Transformación de bacterias.....	26
Maxipreparación de plásmidos.....	26
Cuantificación de ADN.....	29
Digestión de plásmidos con enzimas de restricción.....	30
Migración electroferetica de plásmidos en geles de agarosa.....	30
Cepas y medios.....	31
Oligonucleótidos y fragmentos de ADN.....	31
Marcaje radiactivo de sondas de ADN.....	35

RESULTADOS.....	37
DISCUSION.....	54
CONCLUSIONES.....	60
GLOSARIO.....	61
REFERENCIAS.....	65

RESUMEN

Los Papilomavirus Humanos (PVH) presentan una alta especificidad tisular, ya que solo infectan epitelios estratificados planos, en donde pueden desarrollar tumores benignos o malignos. Dentro del genoma de ADN estos virus, existe un fragmento llamado Región Larga de Control (RLC), que contiene sitios de unión para factores transreguladores celulares y virales. El estudio de la interacción de factores celulares con la RLC del PVH-18 (implicado en cáncer cérvico-uterino), mediante ensayos de retardamiento en gel, mostró la unión específica de dos factores nucleares. El factor K se encuentra enriquecido en células HeLa (de origen epitelial estratificado) con respecto a líneas celulares no epiteliales, células de epitelios simples y glandulares y leucocitos humanos circulantes que no son blancos naturales de los PVH. La región reconocida por este factor es homóloga a una secuencia conservada en regiones promotoras de genes de citoqueratinas e involucrina humanos, que se expresan solo en epitelios estratificados, esto sugiere que un factor nuclear de queratinocitos está involucrado en la regulación de la transcripción temprana del PVH-18. Un segundo factor, la proteína celular AP-1 interacciona con una secuencia de ADN repetida dos veces en la RLC del PVH-18 y es la transdutora final de una serie de eventos que se inician en el exterior de la célula y terminan en el núcleo con la activación transcripcional de algunos genes.

ABREVIATURAS

- ADN.- Acido 2' desoxirribonucleico.
- APS.- Persulfato de amonio.
- ARN.- Acido ribonucleico.
- CaCU.- Cáncer cérvico-uterino.
- CIP.- Coctel de inhibidores de proteasas.
- cpm.- Cuentas por minuto.
- dNTP.- 2' deoxinucleotido 5' trifosfato.
- DTT.- Dithiothreitol.
- EDTA.- Acido etileno-diaminotetraacético.
- HeLa.- Células derivadas de carcinoma cervical humano con PVH-18 integrado.
- Hepes.- N-2 hidroxietil-piperazina-N'-2-ácido etano sulfónico.
- MLA.- Marco de lectura abierta.
- NIC.- Neoplasia intraepitelial cervical.
- NP-40.- Nonidet-P-40.
- pb.- Pares de bases.
- PMSF.- Fluoruro de fenilmetil sulfonilo.
- PVH.- Papilomavirus humano.
- PVH-18.- Papilomavirus humano tipo 18.
- RLC.- Región larga de control.
- TBE.- Tris-Boratos-EDTA.
- TE.- Tris-EDTA.
- Tris.- Hidroximetil-aminometano.

INTRODUCCION

El cáncer es uno de los problemas más grandes planteados para la medicina moderna y uno de los más fascinantes para la biología molecular.

En términos biológicos el cáncer es la manifestación de alteraciones en los mecanismos básicos de control de la regulación metabólica, división y diferenciación celular de los organismos superiores.

Estos cambios pueden definirse como alteraciones heredables en una célula caracterizados por una mayor velocidad de división, una diferenciación parcial o imperfecta, presencia de metástasis, pérdida de la inhibición por contacto, poca cohesión, cambios en la morfología, estructura antigénica, bioquímica y por lo regular cariotípica, unión por contacto con células de otro tejido, aumento de los movimientos celulares en cultivos, elaboración de toxinas para otras células y sobrevivencia en transplantes (Robbins, 1974; Alvarez, 1988; Aviles, 1989).

La denominación cáncer se ha utilizado para designar a los tumores malignos, los cuales se diferencian de los benignos por tener un crecimiento acelerado, ser metastásicos y no estar bien diferenciados (no se parecen al tejido de origen).

La proliferación anormal de una célula da lugar a una neoplasia, que significa crecimiento nuevo y la masa que esta

compuesta por el nuevo crecimiento, se denomina neoplasma (Willis, 1952, citado en Robbins, 1974).

Es claro que el desarrollo de un proceso carcinogénico encierra una serie de eventos consecutivos o simultáneos, donde debe de existir un inicio que involucra estímulos exógenos y/o endógenos y se debe rebasar un umbral para que se implante el estado carcinogénico; la iniciación es seguida por un periodo de latencia donde muy posiblemente se lleven a cabo los cambios a nivel molecular para que se adquiera e implante el fenotipo transformado. [Los estímulos endógenos pueden ser genéticos, hormonales o inmunitarios; los exógenos involucran una amplia variedad de elementos ambientales tales como estímulos químicos (iniciadores y promotores de tumores), físicos (luz U.V.) y biológicos (virus).

Los procesos tumorales pueden presentar diversas manifestaciones clínicas, pero se considera que todos ellos tienen causas comunes que los desencadenan. A nivel molecular dos de los factores más importantes que intervienen en la carcinogénesis son los oncogenes y los virus.

Los recientes progresos en el conocimiento de la biología molecular de los virus tumorales, así como las técnicas de ingeniería genética, han conducido a la identificación de genes del cáncer en células de mamífero, conocidos como oncogenes, cuyo funcionamiento inadecuado parece ser un factor responsable de la transformación neoplásica (Bishop, 1983; Dulbecco, 1984).

CANCER CERVICO-UTERINO

Actualmente, el cáncer ocupa uno de los cinco primeros lugares como causa de defunción en muchos países del mundo, afectando a personas de entre 30 y 60 años principalmente (Díaz y Zaragoza, 1974; Fernández, 1983). Cada año, mas de 80 000 mexicanos mueren por esta enfermedad. Las estadísticas reportan que la mortalidad por neoplasias es de un 11%, donde el cáncer cérico-uterino ocupa el primer lugar entre las mujeres (Barroso, 1986).

El cáncer cérico-uterino (CaCU) es la enfermedad neoplásica más frecuente en la población femenina de los países subdesarrollados (En Peto, 1986). A nivel mundial el CaCU ocupa el segundo lugar como causa de muerte por neoplasias, superado solo por el carcinoma mamario (Shodell, 1986; Broker y Botchan, 1986).

Según la Organización Mundial para la Salud, cada año se registran al menos 450 000 casos; de los cuales cerca del 45% fallece.

La aplicación de campañas masivas de detección temprana del CaCU, junto a los avances terapéuticos, han permitido en las dos últimas décadas una disminución notable en la incidencia y mortalidad de este padecimiento en los países desarrollados (Nelson y cols., 1984; Hakama, 1989). Actualmente en estos países se ha incrementado la frecuencia de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) que se considera la lesión precursora del CaCU --

(Nelson y cols., 1984; Raymond, 1987).

La epidemiología del cáncer genital humano, muestra una clara correlación entre esta enfermedad y la actividad sexual, por lo que se han considerado como factores de riesgo : las experiencias sexuales a edad temprana, contacto sexual con varios individuos, contacto sexual con un individuo cuya pareja ha estado previamente afectada por cáncer cérvico-uterino, compañero sexual con experiencia con varias mujeres, también correlacionados con enfermedades venéreas y compañero sexual con cáncer de pene.

PAPILOMAVIRUS HUMANOS Y CaCU

Numerosas observaciones clínicas, así como estudios epidemiológicos, sugieren que un factor viral transmitido sexualmente, está involucrado en el desarrollo del CaCU.

Actualmente se tienen varias evidencias de la participación de los Papilomavirus en la producción de tumores de tipo benigno y maligno en los humanos (zur Hausen, 1986; zur Hausen, 1987a).

Los humanos son afectados por una amplia variedad de PVH; a la fecha se han caracterizado más de 50 tipos diferentes (Cole y Danos, 1987). Estos colonizan epitelios estratificados planos e inducen la formación de tumores benignos (verrugas y condilomas) y malignos, principalmente cáncer cérvico-uterino.

Recientemente se han obtenido más fundamentos sobre el papel

oncogénico de estos virus (Durst y cols., 1983), mediante técnicas de Biología Molecular, con las que se han detectado secuencias de ADN de PVH en tumores. La asociación de PVH tipo 16, 18, 31, 33 y 35 con cáncer genital, neoplasias intraepiteliales vulvares, cervicales y carcinomas de pene, está ahora bien documentada (Durst, 1987; zur Hausen, 1987b).

De todos los tipos de PVH, sólo algunos de ellos (6, 11, 16, 18, 31, 33 y 35) se han encontrado frecuentemente en tumores de la región genital. Los tipos 6 y 11 se han encontrado en 90-100% de lesiones benignas, en 25% de lesiones precancerosas y muy raramente (2%) en las cancerosas (Gissmann y cols., 1983; Lorincz y cols., 1987). Por el contrario en 90% de carcinomas "in situ" o invasores se han encontrado los tipos 16, 18, 31, 33 y 35 (Durst y cols., 1983; Boshart y cols., 1984; Beaudenon y cols., 1986); de estos casos, el 50-90% corresponden los tipos 16 y 18 (en general el tipo 16 es 3 veces más frecuente que el tipo 18).

En México, aproximadamente el 31% de los cánceres cervicales estudiados en estadio de malignidad I y II se asocia al PVH-16 (Gariglio y cols., 1987), y un 7% en diferentes estadios de malignidad al PVH-18 (Aviles, 1989).

BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS PVH

Los PVH, son un grupo de virus pequeños que pertenecen a la familia PAPOVAVIRIDAE, al igual que Polioma y SV40.

Las partículas virales contienen sólo ADN y proteínas, el genoma se encuentra compactado con histonas, formando nucleosomas y encapsidado en viriones icosaédricos con 72 capsómeros (Matthews, 1982).

El Papilomavirus Humano tipo 18 (PVH-18), es uno de los tipos virales asociado a cáncer genital (Neoplasias del cervix) que se ha comenzado a estudiar recientemente a nivel molecular en nuestro país.

Su genoma de ADN de doble cadena, es circular y esta formado por 7857 pares de bases (Cole y Danos, 1987). La información codificada esta localizada sobre una sola cadena y todos los marcos de lectura abierta (MLA) tienen la misma orientación transcripcional. Los MLA corresponden a 7 regiones de expresión temprana (E) y 2 regiones de expresión tardia (L), cada uno de los cuales realiza funciones específicas dentro del ciclo de vida de estos virus (Seedorf y cols., 1985).

Las regiones E1 a E7, a excepción de E4, probablemente codifiquen para proteínas asociadas con las funciones de replicación viral, transformación y mantenimiento de la forma circular plasmídica (Doobar, 1986).

El gen E1 parece regular la replicación extracromosomal, mientras que el producto E2 es un factor transregulador, el cual modula positiva o negativamente la expresión del genoma viral a partir de promotores de la región temprana (E6 y E7).

E2 se une al ADN reconociendo específicamente la secuencia

palindrómica (blanco de E2) ACCG-NNNN-CGGT; dicha secuencia se encuentra repetida varias veces en la RLC de todos los PVH secuenciados hasta ahora, esta proteína se une al ADN en forma de dímero (Thierry y cols., 1987; Dostatni y cols., 1988).

Los productos de los MLA E6 y E7 son responsables de la capacidad oncogénica del virus (ver más adelante).

L1 y L2 son genes que codifican para las proteínas estructurales del virus; que sólo se expresan en tejidos productivamente infectados (Lazo, 1988; Baker y cols., 1987).

Entre el inicio de la región temprana y el fin de la región tardía hay un segmento de ADN que no tiene capacidad codificante para proteínas; esta contiene elementos regulatorios de la transcripción de la región temprana del virus. Esta secuencia es conocida como Región Larga de Control (RLC) ó Región no Codificadora (RNC), posee 828 pares de bases (Cole y Danos, 1987). En esta secuencia se encuentra el origen de la replicación viral y varias secuencias que activan la transcripción, las cuales interactúan con factores transactivadores tanto celulares como virales (García-Carrancá y cols., 1988).

Se han caracterizado elementos con actividad enhancer en la RLC del PVH-18, dos de estos elementos son responsivos a factores transactivadores codificados por el virus y el tercero funciona como un enhancer constitutivo requiriendo factores celulares para su activación. El primer enhancer (IE2) está localizado cerca del sitio cap de E6 y es responsivo al factor transactivador E2; el

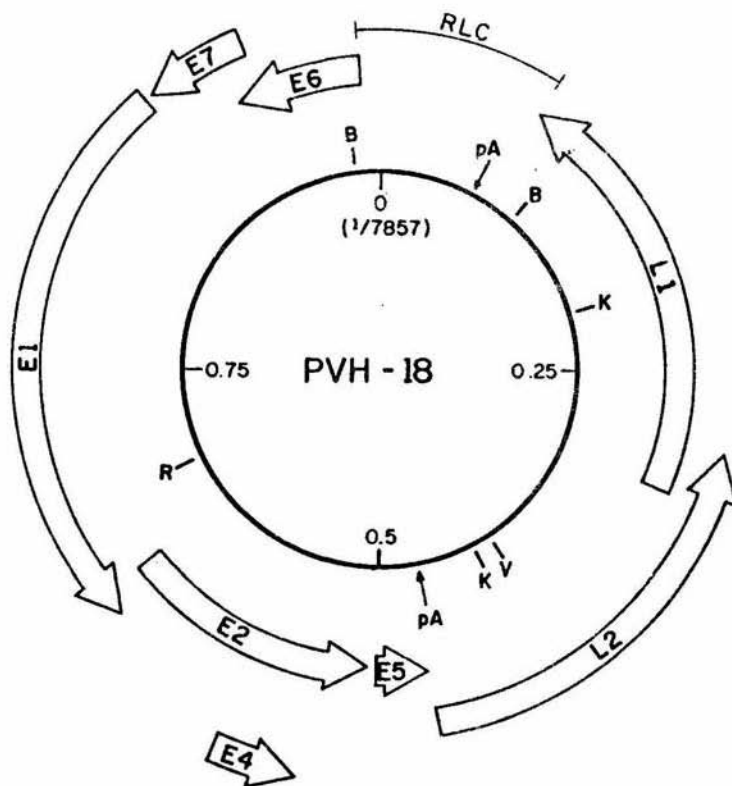


Fig. 1: Mapa genético del Papilomavirus Humano tipo 18 (PVH-18). el genoma de ADN es circular, de doble cadena y posee 7857 pb. Existen 7 regiones de expresión temprana (E) y dos de expresión tardía (L). La ubicación de las flechas hacia el exterior, indica el marco de lectura abierto al que corresponde cada transcrito. Entre el final de la región tardía y el inicio de la región temprana se encuentra la Región Larga de Control (RLC), la cual contiene los elementos regulatorios de la transcripción temprana y el origen de la replicación. Se indican los sitios de poliadenilación (pA), y algunos sitios de restricción: B = BamHI, K = KpnI, R = Eco RI y V = Eco RV.

segundo enhancer (IE6) esta localizado aproximadamente 500 pares de bases arriba del sitio cap de E6 y es dependiente del producto del gene viral E6 para su función; un tercer enhancer (C) esta localizado entre 200 y 400 pares de bases arriba del sitio cap de E6 y posee una actividad constitutiva y no requiere de factores codificados por el PVH-18 para su función. El elemento enhancer constitutivo exhibe preferencias por líneas celulares epiteliales para su función (Gius y cols. 1988).

MECANISMOS DE TRANSFORMACION

No se sabe como, ni en que momento el virus transforma a la célula (Broker y Botchan 1986; Koss, 1986). Se sabe que los PVH 6, 11, 16 y 18 se encuentran en estado episomal y en forma productiva en las lesiones benignas y precancerosas; los PVH 16 y 18 se encuentran en forma no productiva e integrados al genoma celular en las células cancerosas, y generalmente estan amplificadas en unas 50-200 copias por célula (Broker y Botchan, 1986; Durst y cols., 1985; Durst y cols., 1986). Esto parece indicar que la integración de los tipos 16 y 18 esta relacionada con el proceso de malignización de las celulas normales o la progresión tumoral.

El ADN viral se abre generalmente en la región E1-E2 durante la integración al ADN celular (Schneider-Maunoury y cols., 1987), los sitios de inserción, al parecer son muy variados y no hay un

patrón característico. En algunas líneas celulares derivadas de carcinomas genitales, el ADN del PVH se ha encontrado cerca de oncogenes celulares como myc, ras y src (Dürst, 1987; Ocadiz y cols., 1987; Alvarez, 1988).

La transcripción de los oncogenes virales E6 y E7 parece tener un papel muy importante en el mantenimiento del estado transformado en la célula; los elementos regulatorios de la expresión de estos genes se encuentran localizados en la RLC.

Se ha encontrado que en biopsias de cáncer cérvico-uterino, en líneas celulares derivadas de este y en células transformadas con PVH, los productos de los genes E6 y E7 son los que mayoritariamente se presentan; la persistencia de estos transcritos en células transformadas sugiere firmemente que estos productos juegan un papel importante en el proceso de transformación maligna (Smotkin y Wettstein, 1986; Baker y cols., 1987; Danos, 1986).

Contrario a lo que sucede con los genes E1 y E2, los genes E6 y E7 no se destruyen durante la integración del ADN viral al genoma celular; dichos genes se expresan selectivamente en tumores genitales y líneas celulares derivadas de tumores humanos (Schwarz y cols., 1985; Smotkin y Wettstein 1986).

Los genes E6 y E7 parecen ser necesarios para la inmortalización de queratinocitos humanos por los PVH tipo 16 y 18 (Schlegel y cols., 1988; Munger y cols., 1989).

ESPECIFICIDAD TISULAR DE LOS PVH

Los PVH presentan especificidad tisular absoluta ya que solo infectan epitelios estratificados planos (secos como la piel o húmedos como las mucosas orales y genitales), donde pueden llevar al desarrollo de tumores benignos (verrugas y condilomas) o malignos (CaCU).

Los epitelios estratificados de los mamíferos, están compuestos principalmente por queratinocitos, estas células están dispuestas en capas sucesivas en diferentes estadios de diferenciación (Ver figura 2). El estrato basal o germinativo posee la actividad mitótica del tejido, mientras que en las capas intermedias, donde se encuentra el estrato espinoso y el granuloso, las células cesan su división e inician un programa de diferenciación (Queratinización). Las capas externas que forman el estrato corneo, están constituidas por células muertas, totalmente queratinizadas, que son eliminadas por descamación. Los PVH son dependientes del ambiente provisto por la diferenciación terminal de los queratinocitos para desarrollar su ciclo lítico. La síntesis vegetativa del ADN viral puede ser detectada por técnicas de hibridización "in situ" en la capa de células en diferenciación del epitelio, pero no en la basal o en la subyacente de los fibroblastos. La producción de capsides virales y el ensamble de los viriones ocurre en las capas de diferenciación superior. Se piensa que los tumores surgen a partir de algún evento inicial en

el ciclo infeccioso, por el cual el virus aumenta la velocidad de división de la célula infectada en el epitelio de la capa basal, estas células son no permisivas para la función reproductiva de los papilomavirus, esta se encuentra sometida al programa de diferenciación de las células al migrar a través de la capa epidermal. De este modo la expresión de los genes de los papilomavirus esta controlada por el estado de diferenciación de los queratinocitos (Orth y Favre,1985).

Después de entrar a la célula, el curso de la infección viral es probablemente dependiente de su interacción con factores celulares trans-activadores, dependiendo de estos factores, la velocidad de transcripción y replicación de los virus puede ser muy baja, pero suficiente para permitir la persistencia viral, resultando en una infección subclínica latente; bajo la influencia de un estímulo apropiado, el incremento de la transcripción resultara en la mayor expresión de los genes virales (particularmente del gen E2), a un nivel al cual este es capaz de transmodular la actividad de la región temprana, la consecuencia de esto es la presencia de un elevado número de copias de ADN episomales en la célula y en el nivel clínico, una manifiesta infección de PVH (Broker y Botchan, 1986; Ostrow y Faras, 1987; Pirisi, 1987).

La diferencia entre una infección clínica latente o una infección clínica manifiesta es consecuencia de la concentración celular de factores transactivadores celulares y virales y su respectiva afinidad por sus blancos en la secuencia de ADN.

En suma, la formación de partículas virales requieren la expresión de los productos de la región tardía, la cual está ligada al proceso de queratinización de los epitelios, aumentando la complejidad de la expresión coordinada de los genes virales (Cripe y cols., 1987).

En vista de la amplia presencia de los PVH, al aparente incremento de los casos de CaCU entre la población mexicana, al potencial oncogénico de estos virus y al vacío de información existente en nuestro país, se hace necesario ampliar su estudio utilizando las herramientas de la ingeniería genética y la Biología Molecular, lo cual representa un estudio pionero en nuestro país.

Para comprender de qué forma se relaciona la expresión de los genes virales con la diferenciación de los epitelios, el papel que juegan los factores celulares en los mecanismos moleculares de regulación transcripcional viral y su posible implicación en la oncogénesis, se realizó un estudio molecular de la interacción de factores nucleares con fragmentos de la RLC del PVH-18.

Fig. 2: Representación de la organización de los epitelios estratificados planos. Las células se encuentran formando capas en varios estadios de diferenciación en el tejido normal, para desarrollar el proceso de queratinización. Se muestran las lesiones precursoras del cáncer: NIC grados I, II y III: displasia pequeña ó mediana, displasia moderada ó displasia severa (carcinoma "in situ" ó cáncer invasivo) respectivamente. Estos estadios se caracterizan por un incremento progresivo en el número de células indiferenciadas y malignas, con un decremento en la diferenciación celular superficial, paralela a el incremento de la severidad de la NIC.

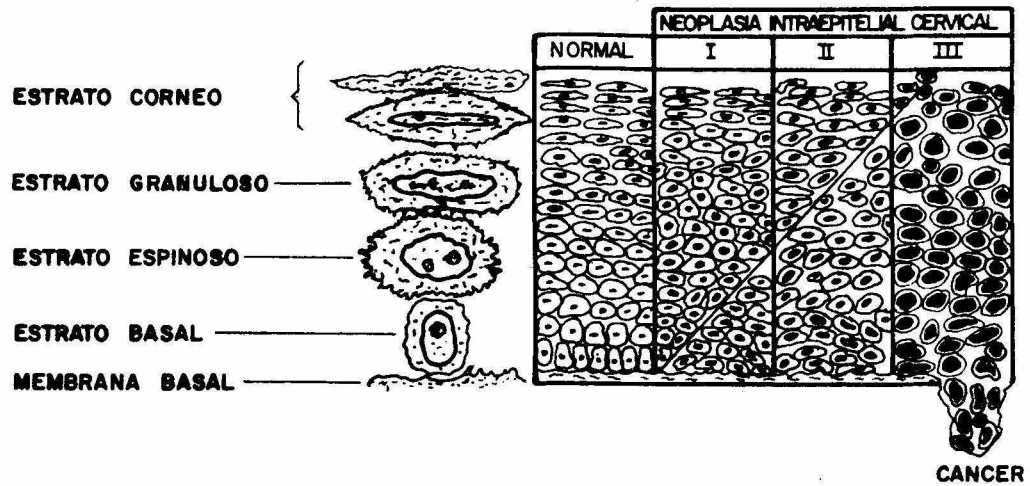


Figura 2

OBJETIVOS

Analizar a nivel molecular, la interacción de factores celulares y virales, con elementos del ADN que regulan la transcripción temprana del Papilomavirus Humano Tipo-18.

MATERIAL Y METODOS

El conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales los genes pueden ser expresados diferencialmente durante el desarrollo de un organismo, con una alta especificidad tisular, o por la acción de un inductor ambiental, se ha ido desarrollando con el descubrimiento de secuencias de ADN, mediadoras de la transcripción. Estas funcionan como sitios de reconocimiento para proteínas, por lo que la regulación de un gen esta controlada por interacciones ADN-Proteína.

A fin de caracterizar la actividad de unión de proteínas nucleares a sitios específicos de ADN, se realizaron ensayos de retardamiento en gel. Para esta técnica, se obtuvieron extractos nucleares de varias líneas celulares y de leucocitos humanos circulantes, los cuales se incubaron con diferentes sondas radiactivas de ADN, las mezclas se depositaron en geles nativos de poliacrilamida a baja fuerza iónica y se sometieron a electroforesis. Los resultados se visualizaron en placas de autoradiografía, en donde los complejos ADN-Proteína se detectaron debido al decremento de su movilidad electroforética, en relación al corrimiento del ADN libre de factores (Ver figura 3).

Fig. 3: Metodología empleada para el estudio de interacciones ADN-Proteína. Para caracterizar la actividad de reconocimiento y unión de factores nucleares proteicos a secuencias cortas de ADN, se realizaron ensayos de retardamiento en geles nativos de poliacrilamida, esta técnica permite separar complejos ADN-Proteína de fragmentos de ADN libre de factores, con base en las diferencias de su movilidad electroferética.

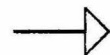
**LINEAS
CELULARES**



**EXTRACTO
NUCLEAR**



INCUBACION



**SONDA
RADIOACTIVA**



AUTORRADIOGRAFIA

RETARDAMIENTO EN GEL

RETARDADO

—



LIBRE

—

—



Figura 3

ENSAYOS DE RETARDAMIENTO EN GEL

Esta técnica es utilizada para separar moléculas de ADN libre, de complejos ADN-Proteína, basada en las diferencias de su movilidad electroforética (Garner y Revzin, 1981), a fin de caracterizar la actividad de reconocimiento de factores protéicos por secuencias funcionales específicas de ADN lineal, los cuales pueden estar involucrados en mecanismos de regulación transcripcional o de replicación (Garner y Revzin, 1988).

Las reacciones fueron realizadas en un volumen de 20 μ l en presencia de 10 mM Hepes, pH 7.9; 30 mM KCl; 10% (V/V) glicerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 a 2 μ g de Poli dI-dC como ADN competitivo no específico, 4 mM MgCl₂ y 4 mM de espermidina.

La mezcla se incubó con 5 a 25 μ g de extractos nucleares durante 10 minutos en hielo, posteriormente se añadieron 1 a 2 ng de oligonucleótidos de doble cadena marcados radiactivamente con ³²P (sondas de ADN) y se incubaron nuevamente durante 10 minutos en hielo; terminada la incubación, la mezcla se depositó en un gel nativo de poliacrilamida al 6% (Acrilamida-bisacrilamida 30 : 0.75, desionizada con resina de intercambio iónico [Amberlita MB-1]), conteniendo TBE 0.5X (Tris-Boratos: 44.5 mM Tris, 44.5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA); la mezcla se sometió a electroforesis a 70 Volts, durante 1:30 a 2:30 hrs dependiendo del tamaño de la sonda; los geles fueron secados y expuestos en película Kodak X-Omat.

AISLAMIENTO DE NUCLEOS Y PREPARACION DE EXTRACTOS

Los extractos de proteína fueron obtenidos a partir de núcleos de cultivos celulares en confluencia. Los núcleos fueron aislados por el método del detergente como se indica: las células fueron lavadas con tampon salino de fosfatos (137 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 0.7 mM Na₂ HPO₄ y 25 mM Tris y se resuspendieron en tampon A (10 mM Hepes [N-2-Hidroxietyl piperazina-N'- 2 ácido etanosulfónico] pH 7.9, 85 mM KCl, 5.5% sacarosa, 0.5 mM espermina, 0.15 mM espermina, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF); para el lisado de los núcleos se añadió 1 volumen de tampón A conteniendo 1% de NP-40. Los núcleos se obtuvieron por centrifugación durante 10 minutos a 4 °C y 2000 rpm en centrifuga clínica DAMON/IEC HN S-II y fueron lavados con tampón A (Dignam y cols., 1983; García-Carrancá y cols., 1988).

Los extractos nucleares fueron preparados como se describe : los núcleos fueron resuspendidos en tampon C (20 mM Hepes pH 7.9 25% glicerol, 420 mM NaCl, 1.3 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF). La suspensión fue puesta en agitación suave a 4 °C durante 45 minutos, posteriormente la cromatina fue sedimentada 33 minutos a 16 000 rpm, en rotor SW50.1 y ultracentrífuga Beckman L855. Las proteínas solubles fueron precipitadas por adición de 1.6 volúmenes de una solución conteniendo 3.8 M (NH₄)₂ SO₄ y 20 mM Hepes (pH 7.9); la mezcla fue agitada durante 45 minutos a 4 °C y centrifugada durante 20 minutos a 35 000 rpm, en rotor SW40.

Las proteínas fueron resuspendidas en 400 μ l de tampón D (20 mM Hepes [pH 7.9], 60 mM KCl, 20 % glicerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.2 mM EDTA) y dializadas durante 2-3 horas contra 500 volúmenes de tampón D (Wildeman y cols., 1984). Los extractos nucleares fueron alícuotados y almacenados en nitrógeno líquido (García-Carrancá y cols., 1988).

A algunos extractos se les adicionó CIP (Pepstatin A 0.2 pM/ml de solución, Antipaina 0.2 pM/ml, leupeptina 1nM/ml, Benzamidina 0.05 nM/ml, aprotinina 0.03 unidades inhibitorias de proteasas/ml, quimostanina A, B y C 0.02 μ g/ml) como agentes inhibidores de proteasas.

La concentración de proteínas fue determinada mediante la técnica descrita por Bradford (1976), usando albúmina sérica bovina como estándar (1 mg/ml).

CULTIVOS CELULARES

Todas las células se crecieron en medio Eagle modificado por Dulbecco, suplementado con 7% de suero fetal de ternera, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

PREPARACION DE BACTERIAS COMPETENTES

Para la obtención de bacterias competentes, las cuales fueron transformadas con los plásmidos usados en el trabajo, se utilizó la técnica descrita por Hanahan (1983). Las cepas se inocularon en medio SOB (Bactotripton 20 gr, NaCl 0.5 gr, [ajustar pH 7.5 con KOH] aforar a 1 litro), complementado con 10mM MgSO₄; se crecieron a 37 °C con agitación constante (200 rpm) toda la noche.

500 µl de este precultivo se inocularon en 50 ml de medio SOB complementado con 10 mM de MgSO₄ y se crecieron con agitación moderada (200 rpm) a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una D.O. 550nm = 0.5.

El cultivo se transfirió a tubos estériles tipo Falcon en condiciones de esterilidad y se enfrió 10 minutos en hielo, posteriormente se centrifugó 12 minutos a 4 °C y 2500 rpm.

El sobrenadante se eliminó cuidadosamente y la pastilla se resuspendió en 16 ml de tampón RF1 (30 mM KAc, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15 % Glicerol [ajustar pH 5.8 con 0.2 M CH₃COOH]).

La mezcla se centrifugó 12 minutos a 4 °C y 2500 rpm, el sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 4 ml de tampón RF2 (10 mM MOPS {3-[N-Morfolino] ácido propano sulfónico} ó PIPES {piperazina-N, N'-bis [2-ácido etanosulfónico]; 1,4-ácido piperazina dietanosulfónico}, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% Gli-

cerol (ajustar pH 6.5 con KOH), se incubó 15 minutos en hielo y se distribuyó en alícuotas de 200 µl, en tubos estériles pre-enfriados y se almacenaron a 80 °C bajo cero.

TRANSFORMACION DE BACTERIAS

A una alícuota de 200 µl de suspensión de bacterias competentes se agregó de 1 a 10 ng de ADN y se incubó por 20 minutos en hielo.

La mezcla se incubó en baño maría a 42 °C por 90 segundos y posteriormente en hielo por 2 minutos; se añadieron 800µl de medio SOC (medio SOB + 1/50 glucosa 20% + 1/100 MgSO4 1M), y se incubó en agitación a 200 rpm durante 45 minutos a 37 °C.

Se espatularon directamente 50 µl de este cultivo en cajas de medio agar-luria (más el antibiotico adecuado), el resto se centrifugó y la pastilla se sembró de igual forma; se crecieron a 37 °C por una noche, las cepas se almacenaron a 4 °C (Thierry y cols., 1988).

MAXIPREPARACION DE PLASMIDOS

Se sembró un pie de cultivo con la cepa portadora del plásmido de interés, en 5 ml de medio Luria estéril (10% Bacto-triptona, 5 % extracto de levadura y 10 % NaCl (ajustar pH 7.5 con NaOH) más el antibiótico adecuado (100 µg/ml ampicilina 15

$\mu\text{g/ml}$ cloranfenicol ó $12.5 \mu\text{g/ml}$ tetraciclina); se creció en agitación moderada a 200 rpm, toda la noche a 37°C .

Se inocularon 500 ml de medio Luria con 3 ml de precultivo y se añadió el antibiótico adecuado; se dejó crecer en agitación moderada (200 rpm) a 37°C , hasta que el cultivo alcanzó una D.O. $600 \text{ nm} = 0.6$ y se procedió a realizar la amplificación del plásmido (incremento del número de copias por célula) deteniendo la síntesis de proteínas bacterianas con $15 \mu\text{g/ml}$ de clorafenicol ó $12.5 \mu\text{g/ml}$ de tetraciclina (al cual sea sensible la cepa) y se dejó crecer en agitación a 200 rpm a 37°C toda la noche.

El cultivo se transfirió a botellas de polipropileno de 500 ml y se centrifugó durante 15 minutos a 5000 rpm en rotor Beckman JA-10, a 4°C .

El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 3.5 ml de solución Tris 50 mM pH 7.5, sacarosa 25 %), la mezcla se transfirió a tubos de polialómero de rotor 50 Ti ó SW40 de ultracentrífuga y se añadieron 3.5 ml de solución ELT (100 mM EDTA pH 8.0, 2 mg/ml lizozima, triton X 100 0.1 %).

La mezcla se agitó y posteriormente se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y 10 minutos a 70°C ; se centrifugó a 40 000 rpm en ultracentrífuga Beckman a 4°C durante 25 minutos en rotor 50 Ti ó 20 minutos en rotor SW40. Se recuperó el sobrenadante y se añadió un volumen igual de solución PEG-NaCl (20 % polietilenglicol, 1M NaCl) en tubos corex de 15 ml, se mezcló suavemente, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centri-

fugó 10 minutos a 4 °C y 3000 rpm, en rotor SS34.

El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 4 ml de solución TE 1X , se incubó un instante en baño maria a 90 °C se añadieron 4 ml de LiCl 5 M frío y se mezcló suavemente y se incubó 5 minutos en hielo.

La mezcla se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm en rotor SS34 a 4 °C para eliminar el ARN. El sobrenadante se pasó a tubos corex de 30 ml y se añadieron 20 ml de etanol absoluto frío (20 °C bajo cero), se mezcló suavemente y se centrifugó 30 minutos a 4 °C y 8000 rpm para precipitar el ADN. El sobrenadante se decantó y se agregaron 10 ml de etanol 80% , se centrifugó a 8000 rpm, 3 minutos a 4 °C y la pastilla se secó al vacío (5 a 10 minutos), se resuspendió en 400 µl de solución TE 1X y la mezcla se pasó a tubos eppendorf, se lavó el tubo corex con otros 100 µl de TE 1X y se añadieron al mismo eppendorf.

Se añadió RNasa (40 µg/ml) y se incubó 15 minutos a 37 °C; después se agregó 0.6 ml de solución 13% PEG-6000, 1.6 N NaCl, se mezcló por inversión, se centrifugo 15 minutos, 12000 rpm a 4 °C, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 150 µl de solución TE + 150 µl de solución 24 : 1, de cloroformo:alcohol isoamílico, se agitó y se centrifugó 5 minutos, 12 000 rpm a temperatura ambiente. A la fase acuosa se le añadió 150 µl de fenol saturado (0.1% Hidroxyquinoleina en 100 ml de fenol bides-tilado, agregar 1 volumen de Tris 1M pH 8.0 + 1 volumen Tris 0.1 M pH 8.0) en TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA [ajustar pH 8 con HCl]),

se agitó y se centrifugó 5 minutos a 12 000 rpm a temperatura ambiente.

A la fase acuosa, se le agregó un volumen de solución 4M de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, más 2 1/2 volúmenes de etanol absoluto frío (20 °C bajo cero) del anterior volumen final.

Esta mezcla se centrifugó durante 30 minutos a 14 000 rpm a 4 °C; el sobrenadante se decantó, la pastilla de ADN se lavó con etanol al 80%, se secó al vacío (5-10 minutos) y se resuspendió a la concentración deseada (Thierry y cols., 1988).

CUANTIFICACION DE ADN

Para la medición de ADN por espectrofotometría, se hacen diluciones de la muestra 1 : 500 y se realizan las mediciones en espectrofotómetro Beckman DU-7, se considera que un valor de densidad óptica a 260 nm = 1.00 corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN de doble cadena (Maniatis y cols., 1982) para calcular la concentración se utiliza la relación :

$$\text{Concentración de ADN} = A_{260} \frac{(\text{dilución}) (50\mu\text{g})}{1000 \mu\text{l}} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

DIGESTION DE PLASMIDOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción son endonucleasas que reconocen una secuencia específica, e hidrolizan el ADN dejando extremos simétricos (rasurados) o asimétricos (cohesivos).

Las digestiones se llevaron a cabo en las condiciones de reacción adecuadas (según el fabricante) y las mezclas se sometieron a electroforesis en geles de agarosa.

MIGRACION ELECTROFORETICA DE PLASMIDOS EN GELES DE AGAROSA

La electroforesis en geles de agarosa nos permite separar fácilmente moléculas de ADN de tamaño diferente, según su peso molecular.

Los geles se prepararon en concentraciones del 0.9% al 1.5% (Agarosa grado N.A. Biorad) en TBE 1X (Tris-boratos: 0.089 M Tris, 0.089 M ácido bórico, 0.002 M EDTA), calentando la solución hasta ebullición para disolver la agarosa, una vez que la temperatura bajó a aproximadamente 50 °C, se agregó Bromuro de Etidio (0.05 µg/ml, de una solución de 10 µg/ml) para tefir los ácidos nucleicos.

La solución de agarosa, aún caliente, se vertió en una cámara para geles colocando el peine formador de pozos en un extremo; una vez solidificada la agarosa, el peine se retiró y se añadió una solución de TBE 1X hasta cubrir totalmente el gel.

Las muestras de ADN se colocaron en los pozos añadiendo colorantes indicadores de corrida (Azul de bromofenol 0.02% Xilencianol 0.02%, Glicerol 50%).

El corrimiento electroforético se hace de cátodo a ánodo aplicando voltaje constante el cual depende de la concentración y tamaño del gel.

Los fragmentos de ADN de tamaño idéntico forman una estrecha banda horizontal, cuya posición se determinó exponiendo el gel bajo luz ultravioleta.

CEPAS Y MEDIOS

Los plásmidos fueron introducidos en las cepas DH5.1 y HB101 de Escherichia coli, usando la técnica de transformación descrita por Hanahan (1983); estas cepas se mantuvieron en medio agar-Luria (1.5% bactoagar, 1% NaCl, 1% bacto triptona, 0.5% extracto de levadura, ajustar pH 7.0 con NaOH y adicionar el antibiótico deseado cuando el medio tenga de 45 a 50 °C) ó en medio Stabs (1% Caldo nutritivo, 0.8 % NaCl, 0.6 % Bactoagar más el antibiótico deseado).

OLIGONUCLEOTIDOS Y FRAGMENTOS DE ADN

Como sondas de ADN se utilizaron oligonucleótidos con secuencias similares (E2+K y E2+AP1) ó no relacionadas con la RLC

del PVH-18, con diferentes sitios de unión para factores de transcripción conocidos (Ver tabla I). Uno de los fragmentos utilizados, se obtuvo por digestión EcoRI-Hind III del plásmido pAlu 15, esta sonda contiene subclonado el fragmento RsaI-RsaI de la parte central de la RLC del PVH-18, la cual contiene una secuencia "TTGGCTT" (nucleótidos 7730 a 7736 de la secuencia descrita por Cole y Danos, 1987). Otro fragmento se obtuvo por digestión EcoRI-Hind III del plásmido pKEM el cual contiene clonado el oligonucleótido (E2+K) en el sitio Xba I del polilinker (Ver figura 4).

E2+K	5'-CTAGTGCA <u>ACCGATTTCGGTTGCCTTTGGCTTATGT</u> -3' 3'-ACGTTGGCTAAAGCCAACGGAAACCGAATACAGATC-5'
E2+AP-1	5'-CTAGTGACCGAAAACGGTCGGCGCTGACTCAGATT-3' 3'-ACTGGCTTTTGGCCAGCCGCGACTGAGTCTAAGATC-5'
rbc S	5'-AGCTTTTTCAATCTTGTGTGGTTAATATGA-3' 3'-AAAAGTTAGAACACACCAATTATACTTCGA-5'
UPE	5'-TAGGCCACGTGACCGGGTGTTCCTGCA-3' 3'-ACGTATCCGCTGCACTGGCCACAAGG-5'

Tabla I.- Oligonucleótidos de doble cadena utilizados en los experimentos de retardamiento y competencia en geles nativos de poliacrilamida, los cuales contienen fragmentos cortos de ADN de la RLC del PVH-18 (E2 + K y E2 + AP1) y secuencias no relacionadas con esta región (rbc S y UPE).

Fig. 4: Representación esquemática de las construcciones que contienen subfragmentos de la RLC del PVH-18. El oligonucleótido sintético E2+K (1) con extremos cohesivos XbaI, fué clonado en el polilinker del plásmido pGEM 4Z, resultando el plásmido pKGEM (3). El fragmento RsaI-RsaI de la RLC del PVH-18 (nucleótidos 7717 a 7739 de la secuencia descrita por Cole y Danos, 1987), fué subclonado en el polilinker del plásmido pTZ originando el plásmido pAlu 15 (2).

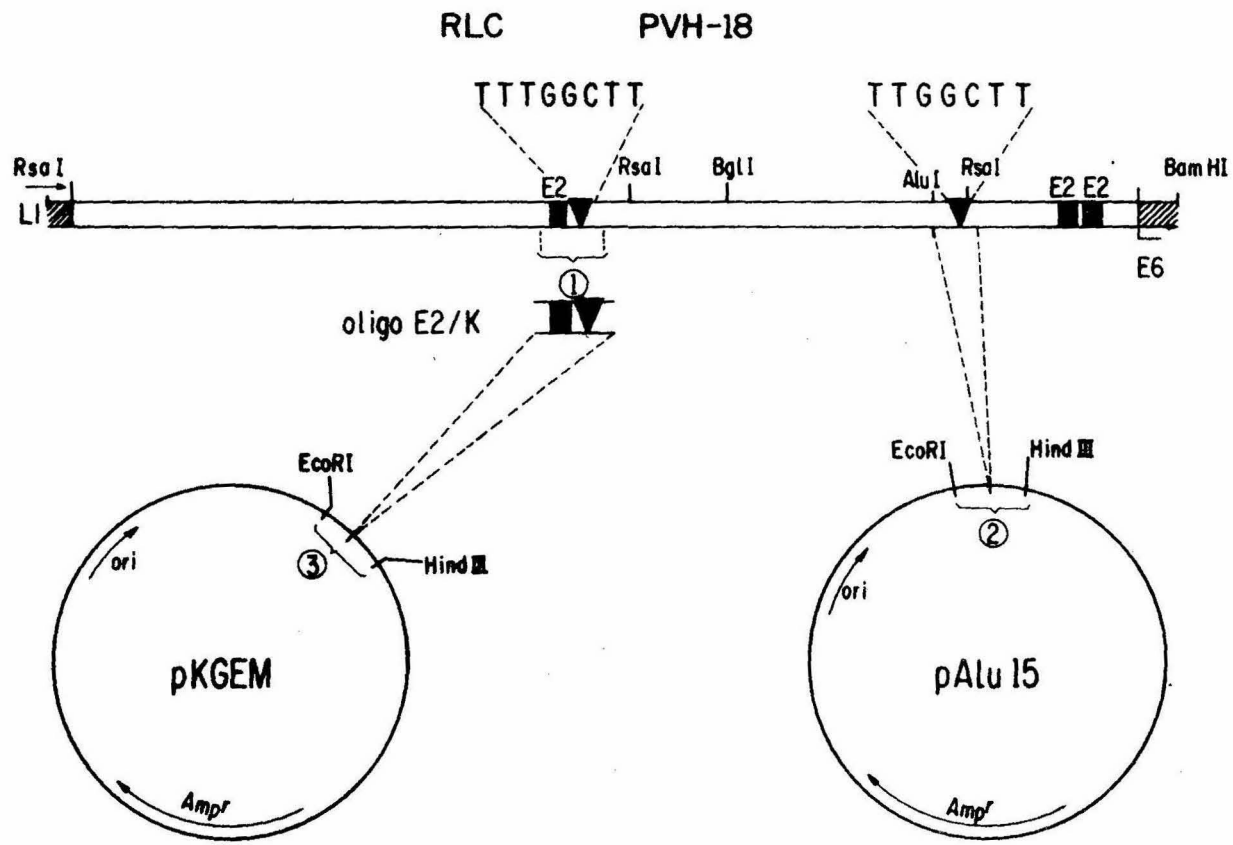


Figura 4

MARCAJE RADIOACTIVO DE SONDAS DE ADN

El marcaje radiactivo de ADN con [α - 32 P] dNTP (Amersham, UK), se realizó empleando el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I, la cual incorpora nucleótidos marcados en los extremos 3' del ADN lineal de doble cadena, con extremos 5' salientes (oligonucleótidos ó fragmentos).

Para el marcaje de los oligonucleótidos, la reacción se realizó agregando 100 ng de ADN de doble cadena, 0.166 mM de tres dNTP no marcados (exceptuando el que se incorpora marcado), 1.5 μ l de tampón Klenow 10X (0.5 M Tris pH 7.2, 0.1 M MgSO₄, 1mM Dithiothreitol y 500 μ g/ml de albúmina sérica bovina) y 60 μ Ci de [α - 32 P] dNTP (dATP ó dCTP, dependiendo de la secuencia del extremo 5' terminal), la mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 15 μ l con agua bidestilada estéril y se dejó incubar de 30 a 45 minutos a temperatura ambiente; para separar el ADN marcado del α - 32 P dNTP no incorporado, se agregaron a la mezcla 100 μ l de TE + 50 μ l de fenol saturado + 50 μ l de solución cloroformo: alcohol isoamílico 24 : 1 y se centrifugó durante 5 minutos a 14000rpm a temperatura ambiente, se tomó la fase acuosa y se agregó un volumen de CH₃COONH₄ 4M, del nuevo volumen se añadieron 2.5 volúmenes más de etanol absoluto y se centrifugó a 14 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante, la pastilla se lavó con etanol al 80%, se dejó secar de 5 a 10 minutos y se resuspendió con 100 μ l de TE 1X. La actividad del ADN marcado fué usualmente de 20 a 50 cpm/ng de ADN.

Para el marcaje de los fragmentos, se digirieron de 1 a 2 μg de ADN plásmidico, con la enzima de restricción adecuada para cortar una sola vez el polilinker en el cual se encuentra clonado el fragmento de ADN viral; para probar si la digestión fue completa, se tomó una muestra y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE IX. El marcaje se realizó en el sitio de restricción seleccionado de igual forma al de los oligonucleótidos. Una vez marcado el ADN lineal por ambos extremos del polilinker, se realizó una restricción secundaria para separar el inserto del vector, fraccionando la mezcla realizando una electroforesis en un gel nativo de poliacrilamida 5% en TBE IX a 300 volts. Para visualizar la ubicación del fragmento en el gel, este se expuso en una placa de autoradiografía durante 5 minutos, la banda se separó del gel de poliacrilamida, se depositó en 400 μl de tampón de elución (0.1% SDS, 10 mM Tris pH 7.5, 0.5 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ y 1 mM EDTA) y se incubó una noche a 37 °C. La mezcla se depositó en una jeringa de 20 ml y se pasó por una unidad de filtración con membrana millipore de 0.45 μm , el tubo se lavó con 300 μl de tampón de elución y la jeringa con 700 μl de isopropanol. La mezcla se centrifugó a 14 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, el sobrenadante se decantó y la pastilla se dejó secar de 5 a 10 minutos y se resuspendió en 100 μl de TE + 50 μl de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 4M + 250 μl de etanol absoluto, se centrifugó a 14 000 rpm, durante 30 minutos a 4 °C; el sobrenadante se decantó, la pastilla se lavó con etanol 80%, se dejó secar de 5 a 10 minutos y se resuspendió con TE IX, con una actividad de 25 a 50 cpm/ng de ADN.

RESULTADOS

En un estudio previo, en el cual se analizó la interacción "in vitro" de varias proteínas celulares y virales en la RLC del PVH-18 (García-Carrancá y cols., 1988), se sugirió que un factor nuclear de células HeLa, es capaz de unirse a la secuencia de ADN "TTTGGCTT" (AAGCCAAA sobre la otra cadena, en dirección antisentido respecto al promotor) nombrada secuencia K. Posteriormente por experimentos de Footprinting con DNAasa I, se observó que un factor nuclear de células HeLa y SW13 (ambas de origen epitelial) se une a esta secuencia (García-Carrancá y cols., 1989). La región protegida esta localizada en el segmento distal de la RLC del PVH-18 y corresponde con una secuencia "AAPuCCAAA" que esta altamente conservada en las regiones promotoras de varios genes de citoqueratinas e involucrina humanos (ver tabla II).

Para estudiar la naturaleza de este factor se construyó un oligonucleótido (E2+K) el cual contiene 32 pb de la RLC del PVH-18 (nucleótidos 7454 a 7485 de la secuencia descrita por Cole y Danos, 1987). Este oligonucleótido fué usado en ensayos de retardamiento en gel para evaluar la actividad de unión al ADN de la proteína nombrada factor K.

Cuando se incubaron el oligonucleótido E2+K y los fragmentos de ADN procedentes de los plásmidos pKGEM y pAlu15 (ver figura 4) marcados radiactivamente, con extractos de proteína de células HeLa (Fig. 5), se observó la formación de los complejos C1 y C2

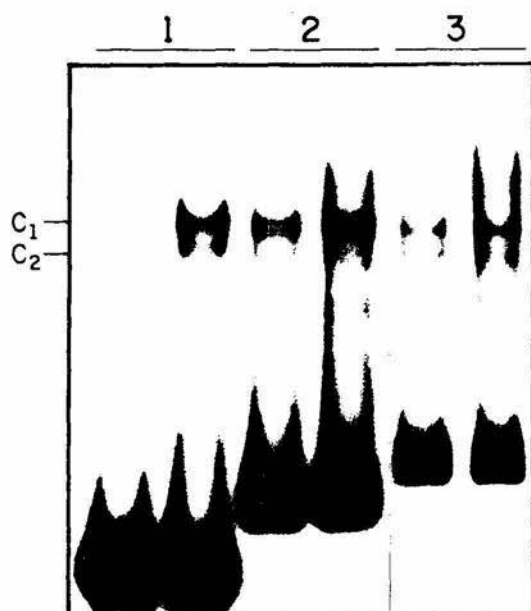


Fig. 5: Interacción del factor K, de extractos nucleares de células HeLa, con secuencias blanco. Los distintos oligonucleótidos y fragmentos marcados, se incubaron con diferentes concentraciones de proteínas. (1) oligonucleótido E2-K incubado con 5 y 7 μ g de proteína, (2) fragmento de la RLC del PVH-18 (nucleótidos 7719 a 7739 de la secuencia descrita por Cole y Danos, 1987) y (3) fragmento EcoRI-Hind III del plásmido pGEM, el cual posee el oligonucleótido E2-K y el polilinker del vector pGEM4Z, incubados con 7 y 9 μ g de extracto nuclear. C1 indica el complejo K-ADN; C2 corresponde a una banda retardada inespecífica.

estas bandas retardadas mostraron una movilidad electroforética similar en todas las sondas lo que indicó que la movilidad del complejo ADN-Proteína esta determinada por la naturaleza del factor proteico y no por el tamaño de la sonda empleada.

La especificidad de los complejos retardados fue probada por ensayos de competencia. El oligonucleótido E2+K marcado, se incubó con 6 µg de extracto nuclear de células HeLa en presencia de cantidades crecientes de oligonucleótidos homólogos ó heterólogos no marcados radiactivamente, estos últimos contienen sitios de unión para diferentes factores de transcripción conocidos (AP1, UPE y rbcS; ver metodología). Este análisis mostró que la formación del complejo C1 fue inhibida completamente sólo por el oligonucleótido homólogo empleando bajas concentraciones (10 ng) de competidor frío (E2+K); mientras que con el resto de oligonucleótidos empleados no se observó ningún efecto aun empleando concentraciones 100 veces mayores de competidores. Este resultado sugiere que el complejo C1 resulta de una interacción específica (Fig.6). Un segundo complejo de migración (C2) fué observado solo cuando se usaron los oligonucleótidos que contienen un sitio palindrómico de unión para E2; se observó también la formación de un complejo (C3) inespecífico.

Para estudiar si el factor K presenta alguna especificidad tisular exclusiva, se prepararon extractos nucleares de diferentes líneas celulares tanto epiteliales (HeLa, SW13 y MDCK) como no epiteliales (3T3-A31 y 3T3 Balb/c) así como de leucocitos humanos circulantes y se probaron en ensayos de retardamiento.

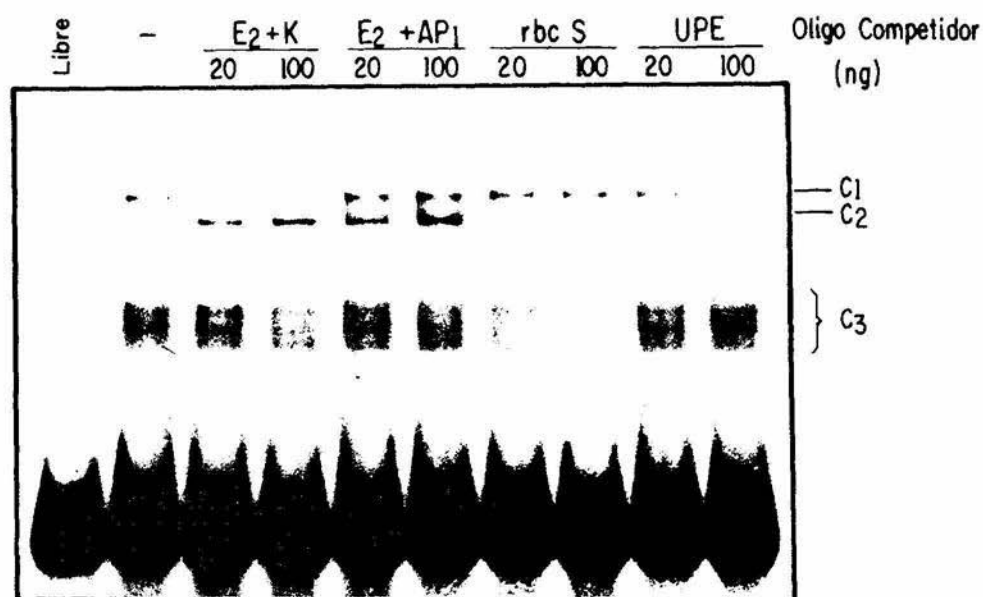


Fig. 6: Unión específica del factor K a su secuencia blanco. El oligonucleótido E₂-K marcado, se incubó con 6 µg de extracto nuclear de células HeLa, en ausencia ó presencia de 20 ó 100 ng de oligonucleótido competidor específico (E₂+K) ó inespecíficos (E₂+AP₁, rbcS y UPE); (-) indica ausencia de competidor; C1, banda retardada específica del complejo factor K-oligonucleótido; C2 y C3 son bandas retardadas no específicas.

Al realizar los ensayos con la sonda (E2+K), incubándola con extractos nucleares de células HeLa, SW13 y 3T3 Balb/c (fig. 7a), se observó la formación de un complejo C1, el cual se detecta empleando concentraciones menores de extractos de células epiteliales con respecto a la no epitelial en la cual se requiere el doble de concentración de proteína para visualizar el complejo retardado C1.

Al incubar la sonda (E2+K) con extractos de células MDCK y 3T3-A31, se observó la formación del complejo C1, empleando concentraciones altas de proteína con relación a la que se requirió emplear con células HeLa para la formación del complejo factor K-oligonucleótido (Fig. 7b), (en este experimento se añadió 0.1% de NP-40 para evitar la agregación de complejos en los orígenes del gel) estos resultados sugieren que el factor K se encuentra enriquecido en células HeLa.

Al incubar la sonda (E2+K) con el extracto de leucocitos humanos (Fig. 8), no se detectó la formación de ningún complejo retenido, aún empleando concentraciones relativamente altas de proteína, para disminuir la formación de complejos en los orígenes del gel debido a las elevadas concentraciones de proteína, se adicionó 0.1% de NP-40 a la reacción de unión.

Para comprobar la existencia de factores nucleares activos en los extractos de proteína empleados, se utilizó el oligonucleótido E2+AP1 como sonda radioactiva en ensayos de retardamiento, esta secuencia no se encuentra de manera nativa en la RLC del

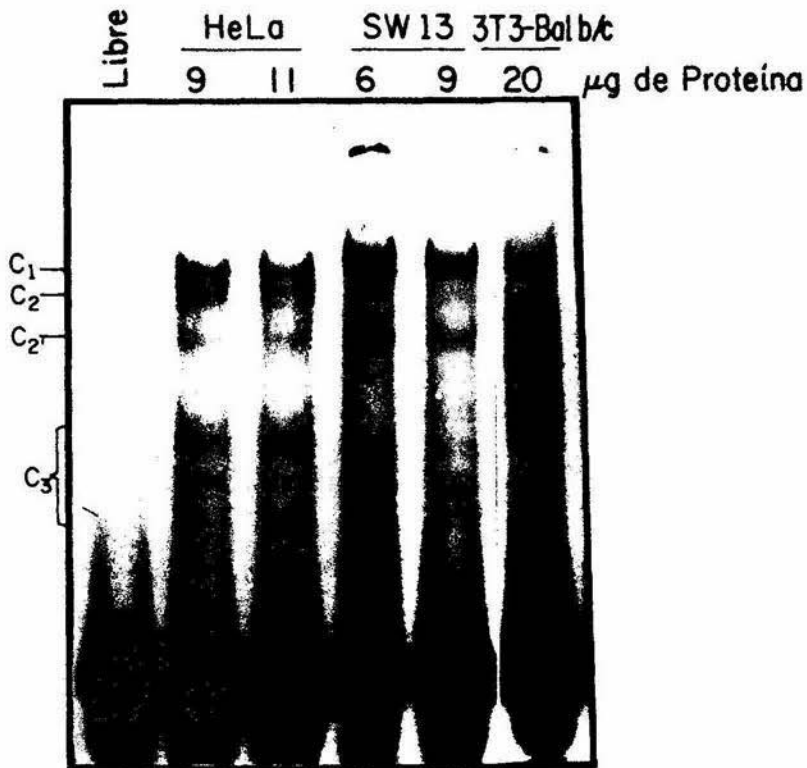
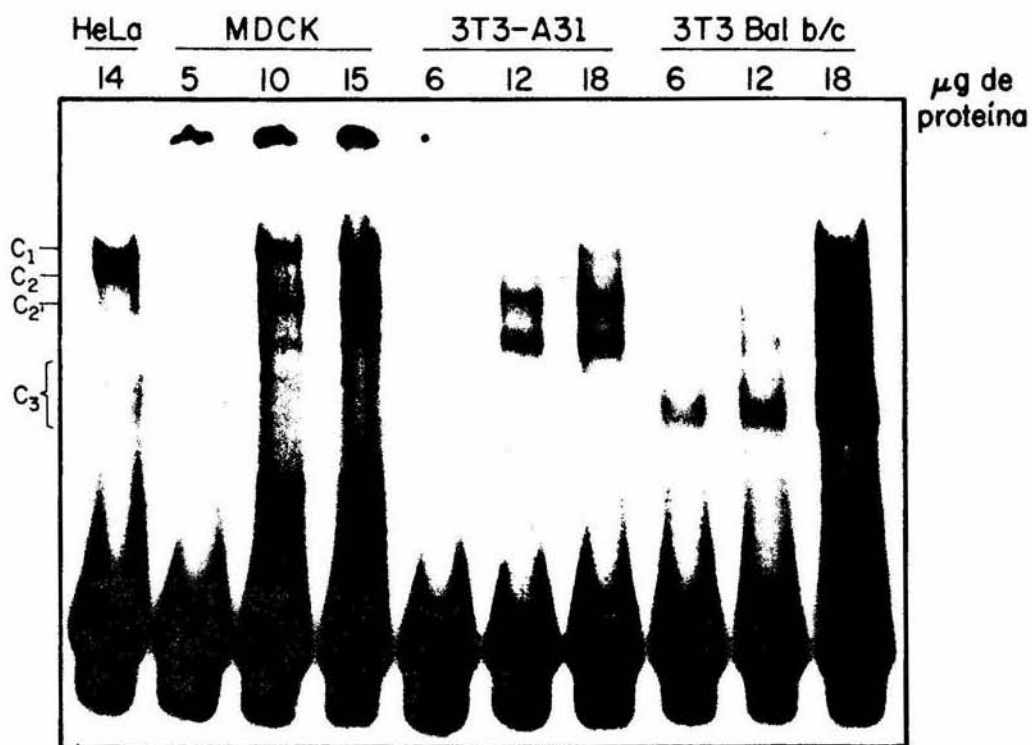


Fig. 7a: Presencia del factor K en extractos nucleares de líneas celulares epiteliales (HeLa y SW13) y no epiteliales (3T3Balb/c). Se utilizó el oligonucleótido E2+K marcado e incubado con diferentes concentraciones de proteína; se usaron 9 y 11 µg de proteínas de células HeLa, 6 y 9 µg de células SW13 y 20 y 20 µg de células 3T3 Balb/c; el carril libre no contiene extracto. C1 indica el complejo específico formado por el factor K-oligonucleótido; C2, C2' y C3 son bandas retardadas no específicas.

Fig. 7b: Presencia del factor K en extractos nucleares de líneas celulares epiteliales (HeLa y MDCK) y no epiteliales (3T3 Balb/c y 3T3-A31). El oligonucleótido E2+K, marcado radiactivamente se incubó con diferentes concentraciones de proteínas, en presencia de 0.1% de NP-40. En las reacciones se usaron 14 µg de proteínas del extracto de células HeLa; 5, 10 y 15 µg de células MDCK; 6, 12 y 18 µg de células 3T3-A31 y 6, 12 y 18 µg de células 3T3 Balb/c. C1 indica el complejo específico factor K-oligonucleótido; C2, C2'y C3 indican bandas inespecíficas.



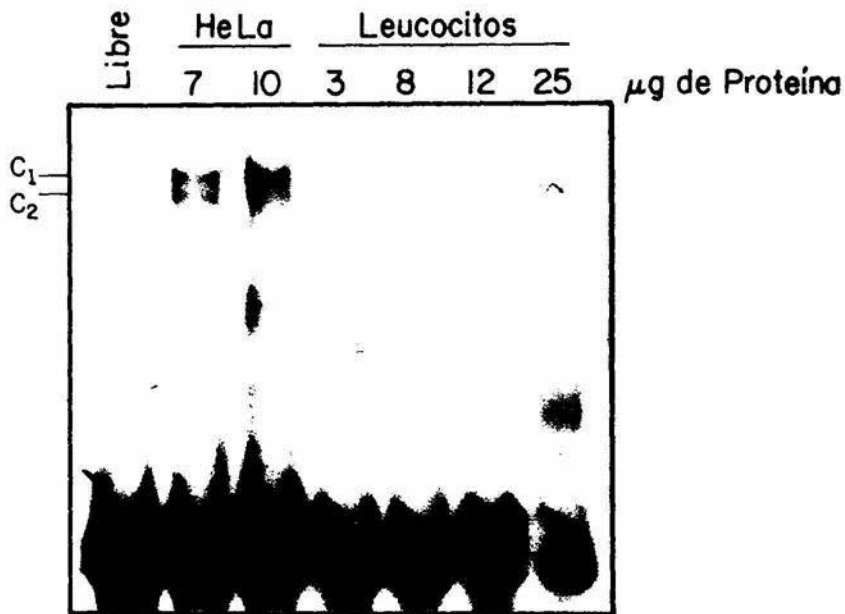


Fig. 8: Ausencia del factor K en extractos nucleares de leucocitos humanos circulantes. La incubación se realizó utilizando 3, 8, 12 y 25 μg de proteínas de leucocitos y el oligonucleótido EB-K marcado radiactivamente. La formación del complejo factor K-oligonucleótido se obtuvo incubando 7 y 10 μg de extracto nuclear de células HeLa. C1 corresponde a la banda retardada específica del factor K y C2 indica una banda retardada inespecífica. En este experimento, se adicionó a la reacción 0.1% de NP-40.

PVH-18, ya que estos sitios de unión para factores, se encuentran ubicados en distintas posiciones.

La formación de un complejo retardado (a) indica la presencia de un factor de transcripción de la familia AP1 en los extractos de células HeLa, MDCK, SW13, 3T3 Balb/c y 3T3-A31 (Fig. 9), empleando concentraciones relativamente bajas de proteínas en las incubaciones, sin embargo no se observó la formación de ningún complejo con los extractos de leucocitos, aún empleando concentraciones altas de proteína.

La especificidad de unión del complejo retenido (a), fue confirmada por experimentos de competición, usando 3 µg de extracto nuclear de células SW13 e incubándolo con la sonda E2+AP1 en presencia de cantidades crecientes de oligonucleótidos homólogos (E2+AP1) y heterólogos (E2+K, rbc S y UPE) no marcados radiactivamente, como competidores (Fig. 10).

No se observó competición del complejo (a) con los oligonucleótidos no relacionados aún empleando un exceso 100 veces mayor, mientras que un exceso 10 veces mayor de oligonucleótido homólogo eliminó la formación del complejo (a).

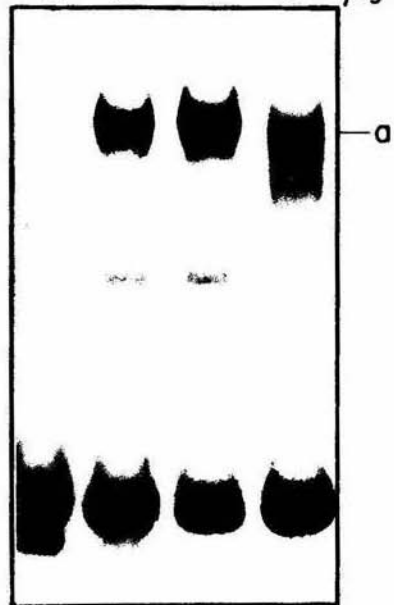
La presencia y localización de secuencias K (TTGGCTT) fue analizada en la RLC de otros PVH genitales secuenciados (6b, 11, 16, 18 y 33).

La tabla II muestra una comparación de las secuencias con posibles sitios de unión del factor K y su posición con respecto a la caja TATA del MLA de E6, también se hizo una comparación de

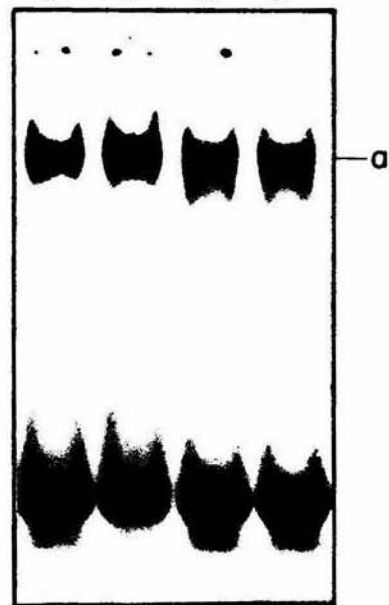
Fig. 9: Presencia del factor AP1 en extractos nucleares de células epiteliales (HeLa y MDCK) y no epiteliales (3T3-A31 y 3T3 Balb/c). El oligonucleótido E2+AP1 se incubó con (A) 5 y 7 μg de proteínas de células HeLa y 5 μg de células 3T3 Balb/c; (B) incubación con 3 y 5 μg de proteínas de células MDCK y 3 y 5 μg de células 3T3-A31. (a) indica la banda retardada específica de la interacción AP1-oligonucleótido, el carril libre no contiene extracto nuclear.

A

Libre HeLa 3T3Balb/c
5 7 5 μg de Proteína

**B**

MDCK 3T3-A31
3 5 3 5



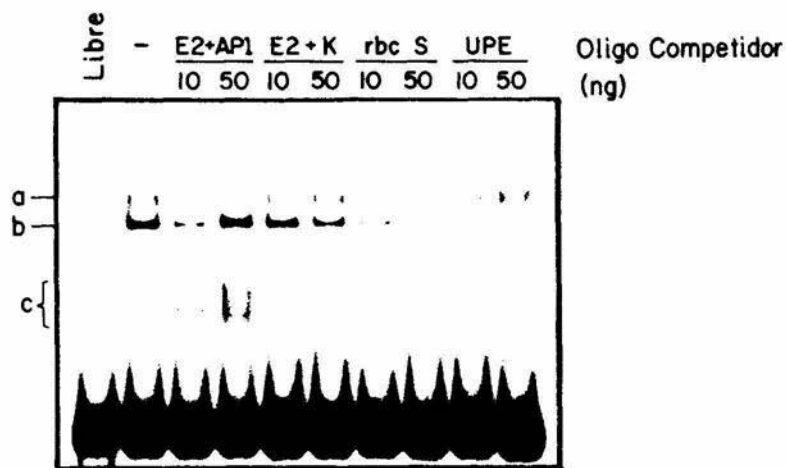


Fig. 10: Unión específica del factor nuclear AP1, a su secuencia blanco. Se incubó 1 ng del oligonucleótido E2+AP1, marcado radiactivamente, con 3 µg de extracto nuclear de células SW13, en ausencia ó presencia de 10 y 50 ng de oligonucleótido específico (E2+AP1) ó inespecíficos (E2+K, rbcS, UPE). El carril libre no contiene extracto nuclear; (-) indica ausencia de oligonucleótido competidor; (a) señala la banda retardada específica del complejo AP1-Oligonucleótido; (b) y (c) son bandas retardadas no específicas.

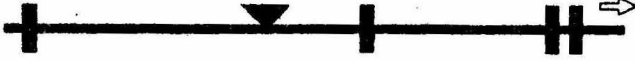
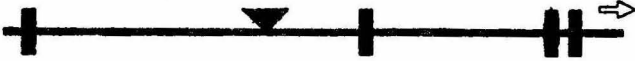

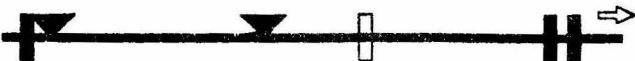

los sitios K encontrados en las regiones regulatorias de la transcripción de genes de citoqueratinas humanos que han sido secuenciados y que son expresados en epitelios estratificados así como del gen de involucrina humano.

Se observa que existe una copia perfecta de la secuencia K en la RLC de los PVH analizados y su localización respecto a la caja TATA entre estos se encuentra altamente conservada (Fig. 11).

Fig. 11: Localización esquemática de los sitios de unión de los factores E2 y K, en la RLC de los PVH genitales secuenciados. Las barras negras indican sitios perfectos de unión de E2 (ACCG-N4-CGGT); las barras claras, sitios imperfectos (ACC-N6-GGT). Los triángulos negros indican sitios posibles de unión del factor K; las flechas indican el inicio y dirección de la transcripción del gen E6. Se muestra el tipo de PVH genital, su potencial oncogénico y su incidencia.

LCR de PVH GENITALES

TIPO ONCOGENICIDAD INCIDENCIA

	6b	<i>baja</i>	<i>alta</i>
	11	<i>baja</i>	<i>alta</i>
	16	<i>alta</i>	<i>alta</i>
	18	<i>alta</i>	<i>baja</i>
	33	<i>alta</i>	<i>baja</i>

DISCUSION

los experimentos mostraron que existen factores celulares que interaccionan específicamente con secuencias blanco del ADN viral. El factor K, se encuentra enriquecido en células HeLa (de origen epitelial, derivadas de un carcinoma de cérvix) y reconoce la secuencia K: 5'-AAGCCAAA-3',
3'-TTCGGTTT-5'.

Esta secuencia está presente dos veces en la RLC del PVH-18; ambos sitios se localizan arriba del sitio cap de E6, a 393 y 126 pb, respectivamente. La secuencia K esta presente una sola vez en los demas PVH genitales secuenciados a la fecha y es muy similar a aquella que se encuentra altamente conservada en los promotores de los genes de citoqueratinas (que son expresadas en los epitelios estratificados) y en el gen de la involucrina humana (ver Tabla II). Sin embargo, la secuencia K se encuentra en dirección-antisentido, respecto al promotor en todos los PVH genitales.

Los principales componentes estructurales de las células epiteliales son las queratinas, proteínas fibrosas que se agregan para formar los filamentos intermediarios. Las queratinas son una familia de aproximadamente 20 polipéptidos (Moll y cols., 1982). Se han distinguido dos subfamilias en función de su comportamiento en sistemas electroforéticos en geles bidimensionales, una ácida (tipo I) y una neutra/básica (tipo II) (Sun y cols., 1984).

Las queratinas se expresan diferencialmente a partir de un gran complejo multigénico, de acuerdo a diferentes rutas de diferenciación celular, siguiendo determinadas reglas, estas son

expresadas por pares formados por un representante de cada subfamilia, los cuales se aparean como tetrámeros; la combinación de pares es característica de un fenotipo epitelial (Fuchs y Green, 1986).

El análisis de las secuencias de varios genes de queratinas, revela que las regiones 5' son altamente homólogas entre especies diferentes (Bovinos, Murinos y Humanos), en genes que codifican para las mismas citoqueratinas o las equivalentes, lo que sugiere que estas regiones son esenciales para una eficiente expresión celular específica.

Se ha demostrado que las regiones 5' juegan un papel muy importante en la regulación transcripcional de muchos genes eucarióticos, la resistencia a las presiones de mutación mostrada, hace pensar que la conservación evolutiva que poseen es debida a una probable importancia funcional para su expresión.

Chavdhury (1986) ha reportado que los extremos 5' de los genes de las citoqueratinas humanas (2 ácidas No 14 y 16 y una básica No 6) que son coexpresadas, exhiben un grado significativo de homología, sugiriendo que estas secuencias juegan un papel importante en la expresión coordinada de estos tres genes. Además de la caja TATA, existe una secuencia AA(Pu)CCAAA (Pu=Purina) altamente conservada, que se encuentra en todos los elementos promotores de genes de citoqueratinas que se expresan en epitelios estratificados humanos. Esta secuencia puede ser localizada a distancias variables de la caja TATA en genes diferentes pero su posición en un gen dado está conservada en diferentes especies. Una secuencia muy similar se encuentra arriba del gen que

codifica para la Involucrina, una proteína sintetizada por los queratinocitos humanos (ver Tabla II) (Blessing y cols., 1987); sin embargo, esta secuencia está ausente en genes de citoqueratinas que se expresan en epitelios simples o de queratinas no epidermales.

En años recientes se ha ido aclarando que el tropismo hacia ciertos tejidos, en muchos virus, puede estar mediado por elementos genéticos que dirigen la expresión de genes virales. El enhancer y el promotor de un virus pueden ser activos sólo en un tipo de células, que contienen una apropiada concentración de factores de regulación genética.

Se han caracterizado varios elementos en la RLC de algunos PVH genitales, que son blanco de interacción de factores proteicos virales y celulares (García-Carrancá y cols., 1988). Se ha observado en experimentos de cotransfección (Bernard y cols., 1989) que en queratinocitos humanos, el producto de E2 participa en el control genético, reprimiendo fuertemente al promotor de E6 del PVH-18, en el que se encuentran dos sitios de unión para E2 cercanos a la caja TATA, lo cual podría resultar en una interferencia espacial que impida la formación de un complejo de transcripción sobre el mencionado promotor.

El análisis de las lesiones malignas de CaCU ha mostrado la presencia de PVH mayoritariamente en estado integrado al genoma celular, en donde el rompimiento del ADN viral ocurre generalmente a nivel del MLA E2, por lo que el genoma viral podría quedar bajo el efecto de productos de sus células huésped, en especial de factores de regulación de genes de queratinas, con lo

cual la activación de los genes virales ocurriría durante la ruta de diferenciación de una célula epitelial basal a una célula queratinizada.

La mayor abundancia del factor K en los tejidos epiteliales, sugiere la posibilidad de que este factor involucrado posiblemente en la regulación transcripcional de los genes de citoqueratinas e involucrina humanos, sea utilizado para la expresión de los oncogenes virales (E6 y E7), los cuales se activan durante la ruta de la diferenciación de los epitelios.

Se identificó una secuencia específica 5'-TGACTAA-3', que es blanco de interacción de un miembro de la familia AP-1; dicha secuencia se encuentra presente dos veces en el RLC del PVH-18, una localizada a 350 pb arriba del sitio cap de E6 y la otra a 175 pb arriba del mismo sitio. Esta secuencia reconocida por AP-1, constituye un elemento de respuesta a esteres de forbol (García-Carrancá et al. 1988).

zur Hausen (1987a) ha sugerido que el papel de los PVH es de promotor más que de iniciador de un tumor; algunos factores de riesgo en asociación con los PVH para el desarrollo de una malignidad son la exposición a la luz U.V., el hábito de fumar y coinfecciones por Herpex Simplex tipo II. Así, el desarrollo del CaCU puede ser facilitado y acelerado por agentes ambientales que activen la transcripción de los PVH que habían estado integrados y permanecido en estado latente, en donde los factores de respuesta al ambiente como AP1, podrían estar altamente implicados en la activación de los genes virales.

Varias observaciones clínicas y epidemiológicas, pueden ser explicadas con base en la activación de los promotores de los PVH, por factores de respuesta a agentes extracelulares.

Los factores de la familia AP-1 son los transductores de una serie de eventos que se inician en la membrana plasmática y que involucran señales de respuesta a agentes físicos (luz U.V.), químicos (promotores de tumores) y biológicos (hormonas) (Angel y cols., 1987; Lee y cols., 1987). Estas señales pueden influenciar la unión de la RNA polimerasa II al ADN, es decir el encendido ó apagado de los oncogenes virales E6 y E7 (ver fig. 12) (García-Carrancá y cols., 1986).

La parte central de la RLC del PVH-18 posee un enhancer transcripcional tejido-específico, que es reconocido por AP1 y también contiene una secuencia 5'-TTGGCTT-3' (nucleótidos 7730 a 7736 de la secuencia descrita por Cole y Danos, 1987).

Todos los PVH secuenciados muestran una alta homología en su organización genómica (Giri y Danos, 1986), por lo que la epiteliotropia y potencial maligno diferencial que presentan, probablemente se deba a pequeñas diferencias en la disposición de los elementos regulatorios transcripcionales virales, a los mecanismos de regulación de la transcripción de genes específicos en sus células blanco (ver Figura 12) y a la interacción de factores celulares como K y AP-1 con la RLC viral.

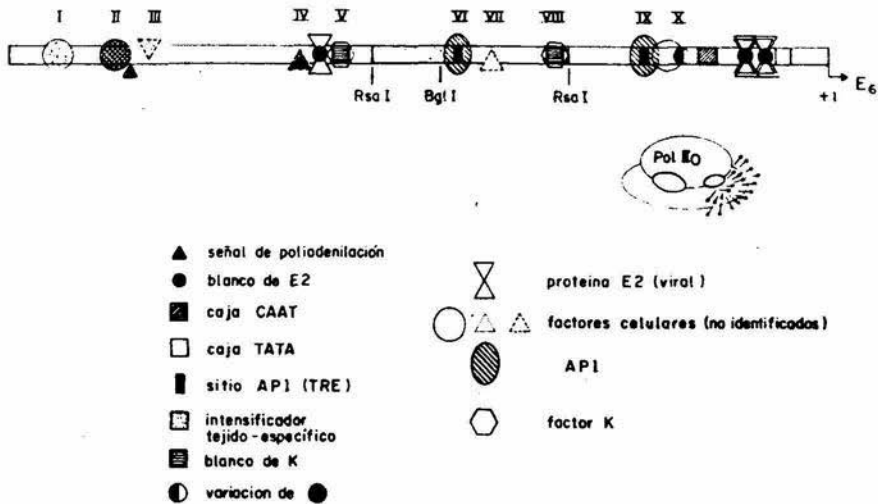


Fig. 12: Esquema de las interacciones ADN-proteínas, en la Región Larga de Control del PVH-18. Se ilustran algunos elementos del ADN, que son blanco de interacción de factores celulares o virales. Estos factores modulan la actividad de la RNA polimerasa II, encargada de la transcripción de genes celulares y virales. En la polimerasa II se ilustran algunos posibles sitios de fosforilación.

CONCLUSIONES

Los experimentos mostraron que existen factores celulares que interaccionan específicamente con secuencias del ADN viral. El factor K reconoce específicamente una secuencia altamente conservada en la región 5' de los PVH genitales. Esta secuencia esta presente dos veces en la RLC del PVH-18 (una sola vez en los demas PVH genitales) y es homóloga a un elemento consenso que se encuentra en las regiones promotoras de genes de citoqueratinas e involucrina humanos que se expresan en epitelios estratificados. El factor K se encuentra enriquecido en células HeLa (de origen epitelial) respecto a células no-epiteliales (Leucocitos humanos circulantes, 3T3-A31 y 3T3 Balb/c) ó de células derivadas de epitelios planos ó glandulares (MDCK y SW13) que no son el blanco natural de los PVH, esto sugiere que un factor de transcripción de genes de citoqueratinas esta implicado en la alta especificidad tisular de los PVH y podría ser utilizado para la expresión de los oncogenes virales, los cuales se activan durante la ruta de diferenciación de los epitelios. La proteína celular AP1 interacciona con una secuencia de ADN repetida dos veces en la RLC del PVH-18, esta proteína puede estar implicada en la activación transcripcional de los oncogenes virales al ser la transdutora final de eventos que se inician en la membrana celular y terminan con la activación de genes.

GLOSARIO

Amplificación.- Producción de copias adicionales de ADN intra o extracromosomales.

Autoradiografía.- Detección de moléculas marcadas radiactivamente por su efecto de crear una imagen sobre película radiográfica.

CAAT,caja.- Secuencia conservada, localizada cerca de 75 pb arriba del sitio de inicio de la transcripción de algunos genes eucarióticos, es reconocida por factores como NF1/CTF y NF-Y; puede estar involucrada en la unión de la RNA polimerasa II.

Cis-activación.- Activación transcripcional de genes por elementos de control en la misma molécula de ADN.

DNA-ligasa.- Enzima que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un grupo 3'-OH y otro 5'-PO₄ adyacentes.

Endonucleasa.- Enzima que hidroliza enlaces fosfodiéster internos en un polinucleótido.

Enhancer.- Secuencia de ADN intensificadora de la transcripción independientemente de su orientación y distancia en relación al promotor.

Enzima de restricción.- Endonucleasa que reconoce secuencias de nucleótidos específicas en el ADN, usualmente no metiladas.

Fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de E.coli.- enzima que posee la actividad 5'-3' polimerasa y la 3'-5' exonucleasa, pero carece de la actividad 5'-3' exonucleasa.

Footprinting.- Técnica para identificar el sitio de unión de alguna proteína al ADN por la propiedad de darle protección contra el ataque de nucleasas o agentes químicos.

Gen.- Segmento de ADN que codifica una cadena polipeptídica, incluyendo las regiones involucradas en el procesamiento del ARN.

Marco de Lectura Abierta.- Región de ADN comprendida entre un codon de iniciación y otro de terminación, potencialmente traducible, contiene tripletes que codifican para aminoácidos.

MDCK.- Línea celular derivada de epitelio simple de riñón de perro.

Neoplasma.- Masa anormal de tejido, donde existe un crecimiento excesivo e incoordinado, comparado con el tejido normal, la cual persiste después del cese del estímulo que indujo a las células a hacer el cambio.

Nucleótido.- Unidad básica de la estructura del ADN, consta de tres partes: un azúcar (ribosa o desoxiribosa), una base nitrogenada (adenina, citosina, guanina y timina o uracilo) y un grupo fosfato.

Oncogen.- Gen cuya expresión anómala contribuye a que una célula normal se transforme en cancerosa.

Ori (origen).- Secuencia de ADN en la cual la replicación es iniciada.

Palindrome.- Secuencia de ADN que es la misma cuando es leída de izquierda a derecha o de derecha a izquierda, consiste de repetidos invertidos adyacentes.

Par de bases.- Dos bases nitrogenadas que se complementan por puentes de hidrógeno en ADN o ARN de doble filamento.

Plásmido.- Moléculas de ADN bicatenario, circulares, extracromosomales, se replican independientemente de sus células huésped y determinan rasgos genéticos accesorios no codificados usualmente por el cromosoma bacteriano.

Promotor.- Región de ADN que contiene señales de inicio de la transcripción, unión (caja TATA) y orientación (caja CAAT) para las RNA polimerasas.

Represor.- Proteína que se une a una secuencia en el ADN, inhibiendo la transcripción de los genes adyacentes.

Secuencia consenso.- Es una secuencia idealizada en la cual cada posición representa la base encontrada un mayor número de veces, cuando se comparan varias secuencias de ADN.

SW-13.- Células de Adenocarcinoma adrenocortical humano.

TATA (caja).- Es un heptamero conservado rico en A-T, cerca de 25 pb arriba del punto de inicio de la transcripción de un gen, puede estar involucrada en la orientación de la RNA polimerasa II para la iniciación de la transcripción.

Transactivación.- Regulación transcripcional positiva de genes ubicados en secuencias de ADN distintas a la del elemento control.

Transcripción.- Transferencia de información genética codificada en las cadenas de ADN a una secuencia de nucleótidos de ARN.

3T3-A31.- Línea celular derivada de fibroblastos de ratón embriónico no tumorigénicos.

3T3-Balb/c.- Línea celular establecida a partir de fibroblastos de ratón embriónico.

REFERENCIAS

Alvarez, S. L. M. (1988) Análisis molecular de inserciones del virus papiloma humano (VPH) en el oncogene c-myc de tumores cérvico-uterinos. Tesis de Licenciatura. ENEP-Iztacala UNAM. pp 64-71.

Ambrose, E. J. C. & Roe, D. M. (1975) Biology of cancer. 2a edition. Ellis Horwood Limited. Great Britain. pp 1-2.

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P., Karin, M. (1987) Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. Cell. 49: 729.

Aviles, C. L. B. (1989) Detección y caracterización de secuencias del virus papiloma humano tipo 18 en cáncer cérvico-uterino. Tesis de Licenciatura. ENEP-Iztacala UNAM pp 3-8.

Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A., Howley, P. M. (1987) Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. J. Virol. 61: 962.

Barroso, E. (1986) Registro nacional de cáncer; estado actual y perspectivas. Rev. del INC. 32: 190.

Beaudenon, S., Kremsdorf, D., Croissant, O., Jablonska, S., Wain-Hobson, S., Orth, G. (1986) A novel type of human papillomavirus associated whit genital neoplasias. Nature. (London) 321: 246.

Bernard, B. A., Bailly, C., Darmon, M., Thierry, F., Yaniv, M. (1989) The intact HPV18-E2 gene product is a transcriptional repressor of the homologous E6 promoter in human keratinocytes. J. Virol. 63: 4317.

Bishop, J. M. (1983) Cellular oncogenes and retrovirus. Ann. Rev. Biochem. 52: 301.

Bishop, J. M. (1985) Viral oncogenes. Cell. 42: 23.

Blessing, M., Zentgraf, H. and Jorcano, J. L. (1987) Differentially expressed bovine cytokeratin genes. Analysis of gene linkage and evolutionary conservation of 5'-upstream sequences. EMBO J. 6: 567.

Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., zur Hausen, H. (1984) A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 3: 1151.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248.

Brien, M. D., Slater, T. F. (1984) Cancer of the uterine cervix. Academic Press. USA. pp 5-20.

Broker, T. R., Botchan, M. (1986) Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. *Cancer Cells.* 4: 17.

Cereghini, S., Raymondjean, M., Garcia-Carranca, A., Herbomel, P. and Yaniv, M. (1987) Factors involved in control of tissue-specific expression of albumin gene. *Cell* 50: 627.

Cole, S. T., Danos, O. (1987) 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.* 193: 599.

Cripe, T. P., Haugen, T. H., Turk, J. P., Tabatabai, F., Schmid, P. G., Durst, M., Gissman, L., Roman, A., Turek, L. P. (1987) Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* 6: 3745.

Danos, O. (1986) Architecture et fonctionnement du génome des papillomavirus. These du grade de Docteur es sciences. Université Paris, Francia.

Díaz, P. R. y Zaragoza, T. (1974) Memorias de las jornadas médicas del centro medico privado. "Hospital Frances". México.

Dignam, J. D., Levobitz, R. M. and Roeder, R. G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids Res.* 11: 1475.

Doobar, J. (1986) Identification of the human papillomavirus, E4 gene products. *EMBO J.* 5: 355.

Destatni, N., Thierry, F. and Yaniv, M. (1988) A dimer of BPV-1 E2 containing a protease resistant core interacts with its DNA target. *EMBO J.* 7: 3807.

Dulbecco, R. (1984) La naturaleza del cáncer. Mundo científico. 3: 168.

Dürst, M., Gissman, L., Ikenberg, H., zur Hausen, H. (1983) A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 3812.

Dürst, M., Kleinheinz, A., Hotz, M., Gissman, L. (1985) The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. J. Gen. Virol. 66: 1515.

Dürst, M., Schwarz, E., Gissman, L. (1986) Integration and persistence of human papillomavirus DNA in genital tumors. En: Banbury report 21: Viral etiology of cervical cancer. (R. Peto, P. M. Howley eds.) Cold Spring Harbor Laboratory. CSH. New York. 273.

Dürst, M. (1987) Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 1070.

Fernández, R. (1983) Neoplasias en México. Salud Pública de México. SSA. 25: 3.

Frederick, M. (1987) Current protocols in molecular biology. Harvard Medical School. (Ausebel, B. R., Kingston, R. E. eds.) Massachusetts General Hospital. USA.

Fuchs, E. and H. Green (1986) Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. Cell 19: 1033.

García-Carrancá, A., Miguel, F., Dahmus, M. E., Gariglio, P. (1986) Structure of monkey kidney cell RNA polymerase II: Characterization of RNA polymerase associated with SV40 late transcriptional complexes. Arch. Biochem. Biophys. 251: 232.

García-Carranca, A., Thierry, F., Yaniv, M. (1988) Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. J. Virol. 62: 4321.

García-Carranca, A., Alvarez-Salas, L., Bravo, C., Yaniv, M., Gariglio, P. (1989) A nuclear factor from epithelial cells binds to conserved "TTGGCTT" motifs on the long control region of human papillomavirus type 18 (HPV18). En: Papillomaviruses UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series. (P. M. Howley and T. R. Broker, eds.). Alan R. Liss, Inc., New York. 124.

Gariglio, P., Ocadiz, R., Saucedo, R., (1987) Human papilloma-virus DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine cervix carcinoma. *Cancer Cells*. 5: 343.

Garner, M. M. and Revzin, A. (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucl. Acids. Res.* 9: 3047.

Garner, M. M. and Revzin, A. (1988) Studying DNA-Protein interactions by gel electrophoresis. *Focus*. 10: 26.

Giri, I. and Danos, O. (1986) Papillomavirus genomes: from sequence data to biological properties. *Trends in genetics*. 2: 227.

Gissman, L., Wolnik, L., Ikenberg, H., Koldovski, U., zur Hausen, H. (1983) Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 560.

Gissman, L. and Schwarz, E. (1986) In papillomaviruses CIBA-GIEGY Symposium 120, Wiley, Chichester. pag. 190-197.

Gius, D., Grossman, S., Bedell, M. A., Laimins, L. A. (1988) Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 62: 665.

Gloss, B., Chong, T. and Bernard, H-U. (1989) Numerous nuclear proteins bind the long control region of human papillomavirus type 16: A subset of 6 of 23 DNase I-protected segments coincides with the location of the cell-type-specific enhancer. *J. Virol.* 63: 1142.

Hakama, M. (1986) Efficacy of screening for cervical cancer. En Banbury report 21: Viral etiology of cervical cancer. (R. Peto, P. M. Howley, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory. CSH. New York. 45.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557.

Hatt, D. H., Gantt, M. J. and Piper, J. (1981) American type culture collection Catalogue of strains II. Editorial Staff. USA.

Jacobsen, H., Klenow, H. and Ovargaard-Hansen, K. (1974) The N-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from Escherichia coli and of the large and the small fragments obtained by a limited proteolysis. *Eur. J. Biochem.* 45: 623.

Koss, L. (1986) Sequence of events in carcinogenesis of the uterine cervix. En: Banbury report 21 Viral etiology of cervical cancer. (R. Feto, P. M. Howley, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory. CSH. New York. 179.

Lazo, P. A. (1987) Structure, DNase I hypersensitivity and expression of integrated papillomavirus in the genome of HeLa cells. Eur. J. Biochem. 165: 2365.

Lazo, P. A. (1988) Human papillomaviruses in oncogenesis. Bio Essays: 9.

Lee, W., Mitchell, P., Tjian, R. (1987) Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. Cell 49: 741.

Lorincz, A. T., Temple, G. F., Kurman, R. J., Jenson, A. B. and Lancaster, W. D. (1987) Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. J. N. C. I. 79: 671.

Mallon, R. G., Wociechowicz, D. and Defendi, V. (1987) DNA binding activity of papillomavirus proteins. J. Virol. 61: 1655.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) Molecular cloning; A laboratory manual. CSH Laboratory Press, USA.

Matthews, R. E. F. (1982) Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the international committee on taxonomy of viruses. Intervirology. Vol. 17, No. 1-3.

Moll, R., Franke, W. W. and Schiller, D. L. (1982) The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 31: 11.

Morin, C., Braun, L., Casas-Cordero, M., Shah, K. V., Roy, M., Fortier, M., Meisels, A. (1981) Confirmation of the papillomavirus etiology of condylomatous cervix lesions by the peroxidase-antiperoxidase technique. J.N.C.I. 66: 831.

Munger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M., Schlegel, R. (1989) The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. J. Virol. 63: 4417.

Nelson, J. H., Averette, H. E., Richart, R. M. (1984) Dysplasia, carcinoma in situ, and early invasive cervical carcinoma. Cancer J. For clinicians. 34: 306.

Nishimura, S., Sekiya, T. (1987) Human cancer and cellular oncogenes. *Biochem. J.* 243

Ocadiz, R., Saucedo, R., Cruz, M., Graef, A., Gariglio, P. (1987) High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine-cervix. *Cancer Res.* 47: 4173.

Olper, P. y Garcia, S. (1979) Registro de neoplasias en el IMSS. *Patología.* 17: 169.

Orth, G., and Favre, M. (1985) Human papillomavirus: biochemical and biologic properties. *Clin. Dermatol.* 4: 27.

Ostrow, R. S., and Faras, A. J. (1987) The molecular biology of human papillomavirus and the pathogenic of genital papillomas and neoplasms. *Cancer and Metastasis. Rev.* 6: 385.

Peto, R. (1986) Molecular aspects of papillomavirus host-cell interactions. En: *Banbury report 21 : Viral etiology of cervical cancer.* (R. Peto, P. M. Howley, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 3, 1986.

Pfister, H. (1987) Human papillomaviruses and genital cancer. *Advances in Cancer Research.* 48: 113.

Pirisi, L., Yasumoto, S., Feller, M., Duniger, J. and Di Paolo, J. A. (1987) Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virol.* 61: 1061.

Pollack, R. (1984) Transformation mechanism at the cellular level. En George Klein (ed) *Advances in viral oncology. Mechanism of neoplastic transformation at the cellular level (Vol.4)* Raven Press. N. Y.

Raymond, C. A. (1987) Cervical dysplasia upturn worries gynecologist, health officials. *J.A.M.A.* 257: 2397.

Robbins, S. (1974) *Pathologic basis of disease.* W. B. Saunders Company Philadelphia. London.

Schlegel, R., Phelps, W. C., Zhang, Y., Barbosa, M. S. (1988) Quantitative keratinocyte assays identifies papillomavirus types associated with human cervical carcinoma and detects two distinct viral activities. *EMBO J.* 7: 3181.

Schneider-Maunoury, S., Crossant, O., Orth, G., (1987) Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J. Virol.* 61: 3295.

Schwarz, E., Durst, M., Demenkowski, C., Latterman, O., Zech, R., Wolfspurger, E., Suhai, S. M., Zur Hausen, H. (1983) DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *EMBO J.* 2: 2361.

Schwarz, E., Freese, U. K., Gissman, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., zur Hausen, H. (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature (London)*. 314: 111.

Schwarz, E., Schneider-Gadicke, A., Roggenbuck, B., Mayer, W., Gissman, L., zur Hausen, H. (1986) Expression of human papillomavirus DNA in cervical carcinoma cell lines. En Banbury report 21: Viral etiology of cervical cancer. (R. Peto, P. M. Howley, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, New York. pp 281.

Seedorf, K., Krammer, G., Durst, M., Suhai, S., & Rowekamp, W. G. (1985) Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*. 145: 181.

Shodell, M. (1986) Preface. En: Banbury report 21. Viral etiology of cervical cancer. (R. Peto, P. M. Howley, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory. CSH. New York.

Smotkin, D., and Wettstein, F. O. (1986) Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 4680.

Sun, T. T., Eichner, R., Schermer, A., Cooper, D., Nelson, W. A. and Weiss, R. A. (1984) Classification, expression and possible mechanisms of evolution of mammalian epithelial keratins: A unifying model. *Cancer Cells* 1: 169.

Thierry, F., García-Carrancá, A., Yaniv, M. (1987) Elements that control the transcription of genital human papillomavirus type 18. *Cancer Cells* 5: 23.

Thierry, F., Heard, J. M., Dartmann, K. and Yaniv, M. (1987) Characterization of a transcriptional promoter of human papillomavirus 18 and modulation of its expression by simian virus 40 and adenovirus early antigens. *J. Virol.* 61: 134.

Thierry, F., Dostatni, N., Arcangoli, B. (1988) Fichas técnicas del curso de Virología, Instituto Pasteur, Paris, Francia.

Westein, I. B. (1984) Multistages carcinogenesis involves multiple genes and multiple mechanisms. En Arold Levine (ed) The transformed phenotype. *Cancer Cells*. Cold Spring Harbor Lab. New York.

Wildeman, A. G., Sassone-Corsi, P., Grundstrom, T., Zenke, M. and Chambon P. (1984) Stimulation of in vitro transcription from the SV40 early promoter by the enhancer involves a specific trans-acting factor. EMBO J. 3: 3129.

zur Hausen, H. (1986) Papillomavirus in human urogenital cancer. En: Banbury report 21. Established results and prospects for the future. Cold Spring Harbor Laboratory. CSH. New York. pp 327.

zur Hausen, H. (1987a) Papillomaviruses in human cancer. Cancer. 59: 1692.

zur Hausen, H. (1987b) Condylomata acuminata and human genital cancer. Cancer Res. 36: 794.