



3
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION DE UN FACTOR CELULAR QUE
INTERACTUA CON 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 :

MARCO ALCARAZ MILLMAN



CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, D. F.

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

CONTENIDO

INTRODUCCION.....	1
Regulación Genética y Factores de Transcripción.....	1
Biología de los Papilomavirus.....	10
Biología Molecular de los Papilomavirus.....	14
OBJETIVO.....	24
MATERIAL Y METODOS.....	25
Ensayos de Retardamiento en Gel.....	25
Aislamiento de Núcleos de Hígado de Rata.....	26
Aislamiento de Núcleos de Línea Celular HeLa.....	27
Preparación de Extractos Nucleares.....	27
Cultivos Celulares.....	29
Marcaje Radioactivo de los Oligonucleótidos.....	29
Oligonucleótidos Utilizados en los Ensayos.....	31
RESULTADOS.....	32
DISCUSION.....	44
CONCLUSIONES.....	55
REFERENCIAS.....	56
LISTA DE ABREVIATURAS.....	64

INTRODUCCION

REGULACION GENETICA Y FACTORES DE TRANSCRIPCION

Los diferentes tipos de células que existen en un organismo pluricelular deben coordinar la actividad de sus genes para lograr un funcionamiento armónico del organismo del cual forman parte. En muchos casos, el más importante nivel de regulación de la actividad genética es el transcripcional.

Así como ocurre en organismos procariontes, el control de la transcripción en las células eucariontes es el resultado de la interacción entre secuencias reguladoras en el DNA y factores proteicos. Estos últimos se conocen como factores de transcripción, ya que muchos de éstos presentan afinidades marcadas por secuencias específicas contenidas en el DNA, que están encargadas de regular la transcripción de uno o varios genes (Johnson y McKnight, 1989).

Los factores de transcripción intervienen en la regulación de la expresión de genes particulares mediante el reconocimiento de secuencias reguladoras del DNA que se encuentran en zonas aledañas al gen en cuestión (o inclusive dentro del mismo gen). Cada tipo celular contiene una determinada combinación de factores, la cual depende no sólo del tipo celular en cuestión, sino también del momento del ciclo celular, y en última instancia, de señales extracelulares.

Así, la combinación de secuencias reguladoras de un gen o grupo de genes constituyen una especie de código de regulación que determina dónde, cuándo, bajo qué circunstancias y con qué intensidad debe expresarse el gen en cuestión. Los factores de transcripción son los efectores de este código, ya que únicamente a través de ellos son capaces las RNA polimerasas (las enzimas encargadas de realizar la transcripción) de reconocer y transcribir de manera específica genes particulares (rev. en: Lewin, 1990).

Funcionalmente, se pueden reconocer dos tipos de factores de transcripción: los denominados generales, los cuales parecen ser necesarios para que se inicie la transcripción en cualquier promotor, y los específicos, que reconocen secuencias particulares presentes sólo en algunos genes y por lo tanto sólo son requeridos para la expresión de éstos últimos (aunque pueden estar ampliamente distribuidos y ser prácticamente ubicuos), o inclusive, únicamente para aumentar o disminuir el nivel de expresión constitutivo o basal de un gen (Buratowski, 1989).

Los factores de transcripción generales forman diversos complejos en presencia o ausencia de las RNA polimerasas, necesarios todos para realizar la transcripción. El primero de éstos complejos, conocido como complejo comprometido, se forma al reconocer un factor conocido como TFIID una secuencia de DNA altamente conservada en prácticamente todos los organismos, conocida como caja TATA. El factor TFIIA también interviene en éste complejo, aparentemente estabilizando la unión TFIID-TATA (Buratowski et al, 1989). La función del complejo comprometido

sería la de señalar a las RNA polimerasas los genes que deben de ser leídos.

Posteriormente, la RNA polimerasa reconoce a éste complejo mediante el factor TFIIB; la iniciación de la transcripción, sin embargo, no parece ser posible hasta que se une al complejo ya formado el factor TFIIE, el cual confiere una actividad de ATPasa DNA-dependiente; al complejo formado se le conoce como complejo de iniciación rápida. Al elongarse la cadena de RNA transcrita, algunos de éstos factores son liberados (como TFIIE y TFIIB) y otros se mantienen unidos al DNA, sin acompañar a la polimerasa (como TFIID y TFIIA). Aunque éste mecanismo es el que se propone para la RNA polimerasa II, encargada de transcribir genes estructurales, aparentemente tiene muchos puntos en común con el mecanismo utilizado por la RNA polimerasa III (Murphy et al, 1989).

Los factores específicos pueden tener diversas funciones, la primera de las cuales es el poder sustituir a alguno de los factores generales, en el caso de algunos genes; por ejemplo, se sabe que no todos los genes poseen cajas TATA en sus promotores, por lo que el factor TFIID no es utilizado para formar el complejo comprometido; en éste caso, algún otro factor probablemente sustituya a TFIID.

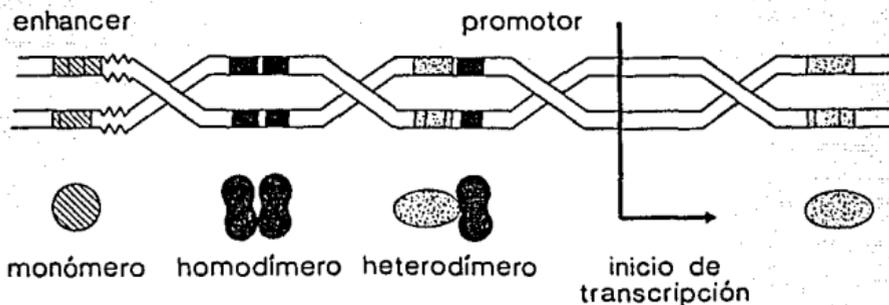
Comúnmente, sin embargo, los factores de transcripción específicos actúan como moduladores (positivos o negativos) de la transcripción, o bien como determinantes de especificidad, temporalidad o de contexto fisiológico de la misma. En ambos casos, su función la cumplen permitiendo o regulando el acceso de la RNA

polimerasa a la región de la cromatina en donde se encuentran genes listos a ser transcritos (es decir, a cuyos promotores están adheridos complejos comprometidos); en tejidos específicos (como en el caso de los factores linfocito-específicos Oct-2 y NF kappaB), en momentos particulares del desarrollo ontogenético (como en el caso de diversas proteínas homeóticas), o bien en respuesta a alguna señal externa a la célula, debida a un cambio en las condiciones fisiológicas del organismo o a la presencia de un estímulo ambiental particular (como en el caso de los receptores de hormonas).

Estas funciones las cumplen muchos de estos factores mediante el reconocimiento específico de módulos de secuencias cortas y particulares, presentes en regiones reguladoras de los genes, conocidas como promotores y secuencias intensificadoras ("enhancers"). En el caso de los promotores, los módulos se encuentran a distancias cortas y generalmente están situados en dirección 5' de los genes a ser transcritos, y se encuentran separados por distancias definidas los unos de los otros. Como "enhancers", los módulos se encuentran a distancias más grandes de los genes que regulan, pudiendo inclusive regular a dos grupos de genes situados en direcciones opuestas; además, se encuentran muy juntos unos "enhancers" a otros, y pueden funcionar igualmente si se les invierte o si se les coloca a distancias muy variables de los genes que regulan (Lewin, 1990).

Los "enhancers", a su vez, están compuestos por elementos básicos que se repiten y se combinan entre ellos para formar a los

A



B

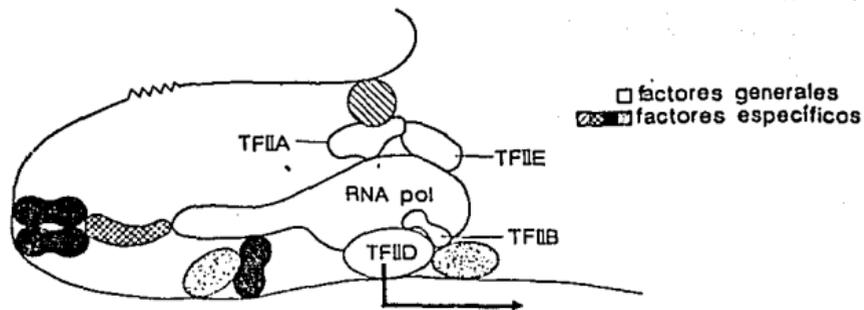


Fig. 1. A: Módulos del DNA y factores trans-activadores que los reconocen. B: Complejo de transcripción. Nótese que la región correspondiente al enhancer puede estar a una cierta distancia del promotor y aún así activar la transcripción, gracias a un doblez en el DNA. Adaptado de: Mitchell y Tjian, 1989.

distintos "enhancers"; estos elementos se denominan "enhanzones" (Ondek et al, 1988), y a diferencia de los enhancers, no pueden conferir actividad a un gen por cuenta propia, sino que requieren combinarse con otros "enhanzones". Además, para ser funcionales, los "enhanzones" requieren estar situados a una determinada distancia unos de otros, formando parejas; una pareja de "enhanzones" conforma el elemento funcional mínimo que se conoce como "enhancer", aunque generalmente se requiere una repetición en tándem de un "enhanzón" o una oligomerización de una pareja de "enhanzones" para formar un "enhancer" funcional (Fromental et al, 1988). Los enhanzones son reconocidos por los distintos factores de transcripción, y el arreglo de los "enhanzones" determina cómo se situarán unos factores relativos a otros: si dos "enhanzones" idénticos se encuentran uno al lado del otro, el resultado podría ser que dos factores idénticos formaran un homodímero al unirse al DNA; dos "enhanzones" diferentes inducirán la formación de un heterodímero.

Los factores de transcripción activan la expresión genética mediante dominios de 30 a 100 aminoácidos que son independientes de los dominios que reconocen y se unen a las secuencias específicas en el DNA. Estos dominios, denominados activadores, son las regiones que confieren funcionalidad a los factores de transcripción, ya que éstos son los sitios a los que se unen las RNA polimerasas, ya sea directamente, o bien indirectamente, a través de proteínas que hacen las veces de puentes entre las polimerasas y los factores secuencia-específicos; por ejemplo, los factores que

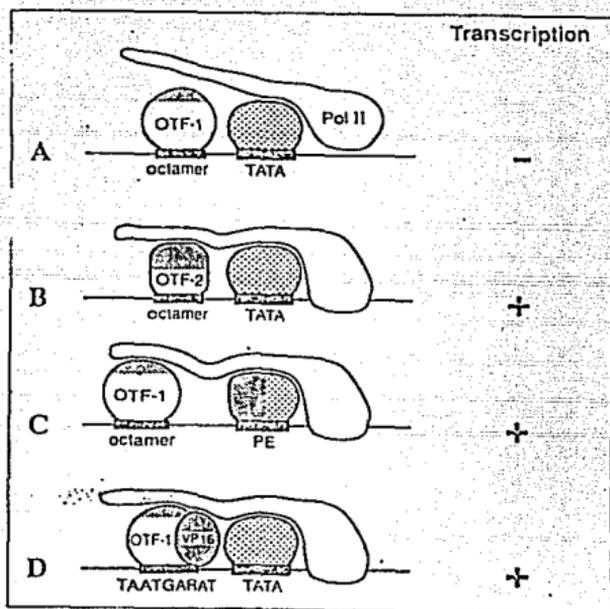


Fig. 2. Cooperación de dominios de activación de la transcripción. En este ejemplo, A: en células no linfáticas, el factor ubicuo Oct-1 no es lo suficientemente activo para promover transcripción porque no presenta un dominio fuertemente activador (area ashurada); B: en células linfáticas la presencia de Oct-2, en cambio, sí logra activar la transcripción; C: un promotor de snRNA que contiene un equivalente a caja TATA (caja PE) capaz de unirse a un factor con un segundo dominio de activación permite a Oct-1 activar transcripción en conjunción con este factor; D: un segundo dominio de activación, aportado por VP16, auxilia a Oct-1 y permite activar la transcripción de un promotor de un gen estructural. De: Schaffner, 1989.

pertenecen a los complejos de transcripción (Ptashne y Gann, 1990) (ver Fig. 1).

Un factor de transcripción puede tener más de un dominio activador, y varios dominios activadores juntos parecen tener un efecto sinérgico sobre la activación transcripcional (Mitchell y Tjian, 1989). Según el tipo y el número de dominios activadores que posea un determinado factor, podrá activar la transcripción de determinados genes. En algunos casos, sólo podrá activar la transcripción de un gen si se combina con algún otro factor que a su vez posea un dominio activador; la combinación de los dominios activadores de ambos factores activará al gen. En otros casos, ambos dominios activadores se encontrarán presentes en un sólo factor.

Un ejemplo del primer caso (dominios activadores en distintos factores) lo constituye el factor Oct-1, el cual puede activar la transcripción de los genes de U2 snRNAs sin el auxilio de otros factores secuencia-específicos, pero no la de genes que codifican para proteínas (genes estructurales). Con el auxilio de el factor viral VP16, sin embargo, Oct-1 es capaz de activar la transcripción de genes estructurales. En cambio, Oct-2, un factor con afinidad por la misma secuencia que Oct-1, activa por sí mismo la transcripción de genes estructurales, pero no la de los genes de los U2 snRNAs. Aparentemente, esto se debe a que Oct-1 y Oct-2 comparten un dominio activador pero difieren en otros; Oct-1 no posee uno de los dos dominios activadores que permiten la transcripción de genes estructurales que sí posee Oct-

2. Para que Oct-1 pueda activar la transcripción de genes estructurales, es necesario que otro factor aporte el segundo dominio activador; en este caso, esto es exactamente lo que hace VP16 (Schaffner, 1989; Tanaka et al, 1992) (ver Fig. 2).

El sinergismo que es producto de la suma de dominios activadores podría deberse a que existe un equilibrio dinámico entre las RNA polimerasas o los otros componentes del complejo de transcripción que se encuentran unidos a los factores secuencia-específicos y los que no lo están. Una mayor cantidad de dominios activadores estabilizarían la unión RNA polimerasa-factores secuencia-específicos y desplazarían el equilibrio hacia la unión, permitiendo la iniciación de la transcripción (Ptashne, 1988). Entre los diversos dominios que componen a la RNA polimerasa II (encargada de transcribir los genes estructurales a RNA mensajero), existe un dominio altamente repetitivo, el carboxi-terminal, que consiste en la repetición de un heptapéptido, resultando en la formación de una especie de "cola" en la polimerasa. Esta "cola" aparentemente está involucrada en el reconocimiento de factores de transcripción específicos, ya que mutaciones sobre la región del gen que codifica para este dominio alteran la especificidad de la transcripción. Ya que el dominio es largo (entre más complejo el organismo, más larga la cola), se postula que interactúa con varios dominios activadores de los factores al mismo tiempo (Woychik y Young, 1990; Corden, 1990; Liao et al, 1991); esto es un apoyo a la teoría del equilibrio dinámico que se menciona arriba.

De esta manera, una combinación de secuencias de DNA específica una combinación de factores de transcripción, lo cual a su vez determina una combinación de dominios activadores que interactuarán con los complejos de transcripción unidos a los promotores de uno o varios genes, activando, reprimiendo o modulando la expresión de los mismos, según el contexto celular en el que se hallen los genes.

BIOLOGIA DE LOS PAPILOMAVIRUS

Un sistema atractivo para estudiar cómo se regula la expresión tejido-específica de un gen lo representan los papilomavirus, los cuales comprenden una familia de pequeños virus de DNA que inducen proliferaciones epiteliales o fibroepiteliales en la piel o mucosas de vertebrados superiores. Estas proliferaciones, llamados papilomas o verrugas, son generalmente benignas, muestran un crecimiento limitado, y frecuentemente regresionan espontáneamente (Rulison, 1942; Massing, 1963). Sin embargo, algunos miembros de la familia de papilomavirus inducen proliferaciones que pueden progresar hasta formar carcinomas epiteliales, usualmente después de un periodo prolongado de latencia (rev. en: zur Hausen et al, 1987).

El reconocimiento del potencial oncogénico de los papilomavirus humanos (HPVs) ha provocado un interés creciente, y el hecho de que el DNA y el RNA virales persisten en carcinomas ha implicado un papel directo de éstos virus en la conversión hacia el estado

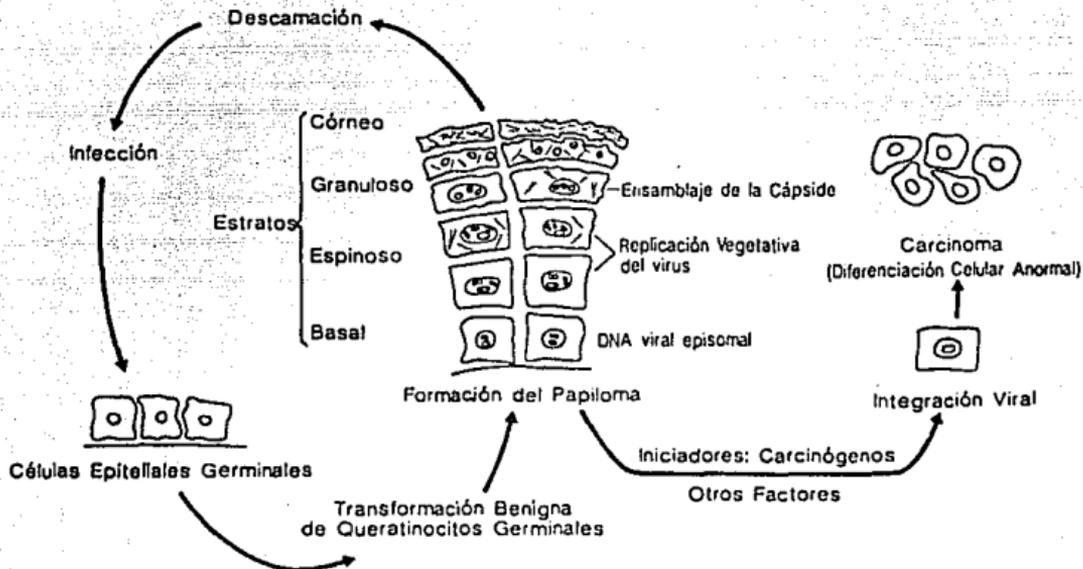


Fig. 3. Ciclo replicativo de un papilomavirus en lesiones productivas y en lesiones que progresan hacia la malignidad. La integración viral parece ser necesaria para la transformación maligna en los HPVs 16,18,31 y 33. Adaptado de: Pfister, 1990.

maligno y su mantenimiento (rev. en: zur Hausen et al, 1987).

Más recientemente, el papel causativo de los HPVs tipo 16,18,33 y 35 en la inducción de cánceres genitales ha sido documentado, y el DNA y RNA virales han sido detectados en hasta el 90% de biopsias tomadas de estos cánceres (zur Hausen, 1988). Sin embargo, la infección del epitelio genital por algunos otros HPVs (6 y 11, p. ej.), rara vez conlleva a un desarrollo maligno. De manera interesante, en el caso de los HPVs oncogénicos, secuencias específicas del DNA viral se encuentran integradas al genoma celular.

Los HPV poseen una estricta especificidad tisular, ya que sólo infectan epitelios estratificados planos (secos como la piel o húmedos como las mucosas orales y genitales).

Los epitelios estratificados de los mamíferos están compuestos principalmente por queratinocitos, los cuales están dispuestos en capas sucesivas en diferentes estadios de diferenciación. 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 córneo están constituidas por células muertas, totalmente queratinizadas, que son eliminadas por descamación.

Es muy probable que el virus infecte células germinales del estrato basal para establecerse en el epitelio (Pfister, 1984; Pfister, 1987). Aunque no se conocen con certeza los mecanismos

mediante los cuales los papilomavirus inducen la formación de verrugas, se supone que la inducción de los genes virales dá como resultado la producción de proteínas virales que estimulan la proliferación celular e interfieren con la diferenciación normal de las células epiteliales (Orth y Favre, 1985). La diferenciación terminal de los queratinocitos permite a los virus primero, replicar su DNA, a la altura del estrato espinoso, y posteriormente, sintetizar sus proteínas estructurales, principalmente en el estrato granuloso (Pfister, 1990). La síntesis vegetativa del DNA 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 (ver Fig. 3).

Numerosas observaciones realizadas en proliferaciones inducidas por papilomavirus humanos y animales que han subsecuentemente acabado por malignizarse han implicado la participación de agentes adicionales, químicos, físicos o genéticos, en el desarrollo de tumores malignos (Orth et al, 1980, zur Hausen et al, 1984, zur Hausen y Schneider, 1987). En particular, se ha enfatizado el posible papel jugado por la nicotina, infecciones por HSV, bacterias y protozoarios, en la iniciación del cáncer cervical. La pérdida de un supresor tumoral localizado en el cromosoma 11 parece ser un evento esencial adicional, a nivel genético, en el desarrollo de la tumorigenicidad (Saxon et al, 1986).

En México, aproximadamente el 31% de los cánceres cervicales estudiados en diferentes estadios de malignidad se asocian al HPV-

16 (Gariglio y cols., 1987), y un 7% al HPV-18 (Aviles, 1989).

BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS PAPILOMAVIRUS

Los papilomavirus son un grupo de virus de DNA bicatenario pequeños, pertenecientes a la familia Papovaviridae, al igual que polioma y SV40.

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

Todos los HPVs exhiben una organización genómica similar, consistente en por lo menos 10 secuencias potencialmente codificantes o marcos de lectura abiertos (ORFs), todas sobre la misma cadena de DNA. Esto es consistente con la observación de que todos los transcritos virales de RNA mensajero que han sido detectados, están codificados por esta cadena (Antmann y Sauer, 1982; Engel et al, 1983, Nasseri et al, 1982); la otra cadena contiene únicamente ORFs pequeños no conservados, y se cree que no es codificante.

El papilomavirus humano tipo 18 (HPV-18) es uno de los tipos virales asociados a cáncer genital (neoplasias del cérvix). Su genoma de DNA de doble cadena es circular, y está formado por 7857 pares de bases (Cole y Danos, 1987). Los ORFs corresponden a 7 regiones de expresión temprana (E1-E7) y 2 regiones de expresión tardía (L1-L2), cada uno de los cuales realiza funciones

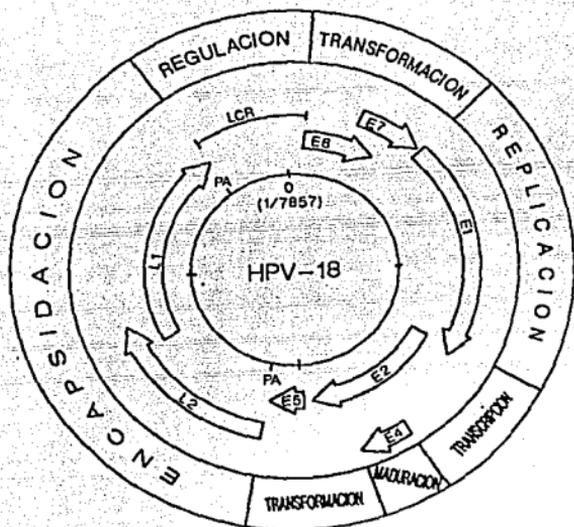


Fig. 4. Mapa genético del papilomavirus humano tipo 18 (HPV-18). El genoma de DNA es circular, de doble cadena y posee 7857 pb. Existen 7 regiones de expresión temprana (E) y dos de expresión tardía (L). La ubicación de las flechas hacia el exterior indica el marco de lectura abierto al que corresponde cada transcrito. Entre el final de la región tardía y el inicio de la región temprana se encuentra la región larga de control (LCR), la cual contiene los elementos regulatorios de la transcripción temprana y el origen de la replicación. Se indican los sitios de poliadenilación (pA). En el anillo externo se indican las funciones realizadas por las distintas regiones del genoma. Adaptado de: Bravo, 1990.

específicas dentro del ciclo de vida de estos virus. (Seadorf y cols., 1985) (ver Fig. 4)

La persistencia de transcritos virales específicos en la mayoría de las células transformadas sugiere fuertemente que sus proteínas correspondientes juegan un papel en el desarrollo o mantenimiento del estado transformado. Estudios tempranos que se realizaron para identificar o asignar funciones a las proteínas virales fueron obstaculizados por los bajos niveles de RNA mensajero y de proteína en las células transformadas. Más recientemente, las funciones de la mayoría de los genes virales ha sido dilucidada, principalmente por experimentos en los cuales el gen de interés es deletado, mutado, o expresado desde promotores heterólogos en la ausencia de otros genes, para determinar sus efectos sobre la transformación y replicación virales (Souza et al, 1989).

Así, se ha determinado que el gen E1 parece codificar para una proteína que regula la replicación extracromosomal del virus (Giri y Danós, 1986), mientras que el producto de E2 es un factor transregulador, el cual modula positiva o negativamente la expresión del genoma viral a partir de promotores tempranos en la región larga de control (LCR); en vista de que la expresión de los genes transformantes está regulada por E2, se dice que ésta proteína tiene un papel indirecto en la transformación.

E2 se une al DNA reconociendo específicamente la secuencia palindrómica ACCG-NNNN-CGGT; dicha secuencia se encuentra repetida varias veces en la LCR de todos los HPV secuenciados hasta ahora

(Dartmann, et al, 1987). Varios trabajos han mostrado que esta proteína activa fuertemente la transcripción de las LCR de diversos HPVs (Phelps, 1987; Hirochika, 1988; Guido et al, 1992). Contrastando con éstas observaciones, se encontró que el promotor genuino de E6 en el HPV18 es fuertemente reprimido por la proteína E2 en células SW13 (Thierry, 1987a; Thierry, 1987b) o en queratinocitos humanos (Bernard, 1989). Trabajos recientes han demostrado que E2 reprime la transcripción cuando el sitio de unión a E2 en la LCR se encuentra a menos de 70 pares de bases del sitio CAP, como ocurre en los HPVs 6,11,16,18 y 33, asociados a lesiones de los genitales (Guido et al, 1992).

La función de las proteína E3 en HPV se desconoce; la función de E4 aún tiene que ser establecida, pero se ha sugerido que quizá juegue un papel en la maduración del virus, tratándose posiblemente de una proteína estructural o de transporte (Doorbar et al, 1986). En cambio, se ha encontrado que la proteína E5 del HPV-6 es capaz de transformar células 3T3, provenientes de fibroblastos de ratón, aunque no así células C127, derivadas de epitelios de ratón (Chen y Mounts, 1990); su homólogo en el BVP (papilomavirus bovino), en cambio, sí es capaz de transformar células epiteliales, aparentemente mediante la activación de receptores de factores de crecimiento (Martin et al, 1989).

Los productos de E6 y E7 han sido implicados en la inducción y el mantenimiento del estado inmortalizado en células que contienen secuencias de HPV. Contrariamente a lo que sucede con los genes E1 y E2, E6 y E7 permanecen intactos durante la integración

del DNA viral al genoma celular; dichos genes se expresan selectivamente en tumores genitales y líneas celulares derivadas de tumores humanos (Schwarz et al, 1985). Además, se ha demostrado que la expresión de E6 y E7 es esencial para la proliferación in vitro de células provenientes de carcinomas cervicales (von Knebel, 1988) y que E6 y E7 son capaces de inmortalizar células humanas primarias (Barbosa et al, 1989; Munger et al, 1989a).

Un mecanismo que se ha sugerido como plausible para explicar la interferencia de los genes virales con la proliferación celular normal, es la formación de complejos proteicos entre E7 y el producto del gen retinoblastoma, y E6 con p53. Retinoblastoma y p53 son genes supresores de tumores, encargados del control de la proliferación celular normal (Dyson et al, 1989; Werness et al, 1990; Munger et al, 1989b); E6 y E7 desregularían este control. Recientemente, se ha encontrado un análogo celular de E6, por lo que se ha postulado que E6 podría estar substituyendo el funcionamiento adecuado de la proteína celular, promoviendo así el desregulamiento del crecimiento o diferenciación celular (Roggenbuck et al, 1991).

Las células HeLa, una línea celular derivada de un cáncer cervical, contienen DNA del HPV-18 integrado, y estas secuencias son transcritas activamente en ellas (Schwarz et al, 1985).

L1 y L2 son genes que codifican para las proteínas que componen la cápside del virus, y sólo se expresan en tejidos infectados que producen virus (Lazo, 1988; Baker et al, 1988).

El genoma contiene un segmento de DNA no codificante, conocido

como región larga de control (LCR), que mide aproximadamente 1 Kb en los HPVs genitales (en cutáneos es más pequeño, midiendo 400 pb). Aquí se ha identificado el origen de la replicación viral, así como secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción viral; éstas últimas interactúan con factores transactivadores tanto celulares como virales (García-Carrancá et al, 1988).

Funcionalmente, se puede dividir a la LCR en tres regiones. La región distal (relativo al gen de E6) es responsable del 25% de la actividad transcripcional del promotor de E6, y un trabajo realizado anteriormente detectó, mediante ensayos de "footprint", 4 sitios de unión de factores celulares (I-IV), además de un sitio sencillo de unión a E2, en extractos nucleares de diferentes células. La región central contiene un enhancer constitutivo que se activa en células de origen epitelial, y posee por lo menos dos sitios de unión a factores celulares (V-VI) (García-Carrancá et al, 1988); otros trabajos han identificado algunos sitios más, reconocidos por el factor ubicuo NF-1.

Finalmente, la región proximal contiene otros dos sitios de unión a factores celulares (VII-VIII) y un doble sitio de unión de E2 (García-Carrancá et al, 1988), y funciona como represor de transcripción en presencia de E2 (Thierry et al, 1987a).

Puesto que el enhancer constitutivo de la LCR tiene actividad epitelio-específica, y funciona aún en ausencia de proteínas virales (Swift et al, 1987), se sugirió que las dos huellas que se encontraron protegiéndolo eran producidas por factores celulares, posiblemente involucrados en la especificidad del HPV. De éstas, la

huella V cubre una secuencia 5'-TGAATAA-3', idéntica a una que se sabe es capaz de ser reconocida por el factor de transcripción AP-1, el cual es ubicuo, excepto en células F9 de teratocarcinoma embrionario (Krysky, Piette y Yaniv, 1987). La huella VI cubre una secuencia similar (5'-TGCATAA-3') a la reconocida por AP-1. La posibilidad de que la huella VI fuese producto ya sea de AP-1 o de algún otro factor de transcripción, tejido-específico o no, nos llevó a explorar la naturaleza de éste factor.

Caracterizar los factores que interactúan con la LCR de los papilomavirus es un paso importante para comprender la regulación de los genes de los mismos. Además, aportará información que ayudará a comprender mejor la regulación de aquellos genes que posean promotores con secuencias reconocidas por los factores de transcripción celulares así caracterizados, y podría ayudar a esclarecer cómo se determina la especificidad tisular a nivel transcripcional.

Con el fin de caracterizar la interacción de proteínas reguladoras con un sitio específico dentro de la LCR, correspondiente a los nucleótidos 7639-7652 (Cole y Danós, 1987) del DNA del papilomavirus humano tipo 18, y cubiertos por la huella VI (García-Carrancá et al, 1988), se realizaron ensayos de retardamiento en gel. Para realizar esta técnica, se obtuvieron extractos nucleares de células HoLa y de hepatocitos de rata, los cuales se incubaron con diferentes sondas radioactivas de DNA, para después depositar las mezclas en geles nativos de poliacrilamida a baja fuerza iónica, y someterlas a electroforesis. Los resultados se

visualizaron en placas de autoradiografía, en donde los complejos de DNA-proteína se detectaron debido al decremento de su movilidad electroforética, en relación al corrimiento del DNA libre de factores (ver Fig. 5).

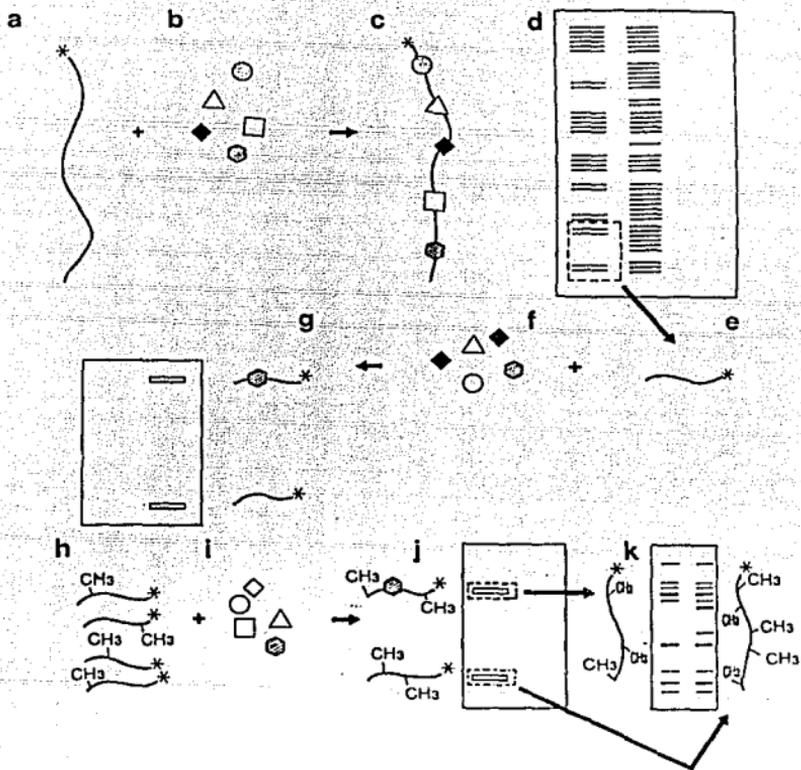


Fig. 5. Métodos de estudio de factores de transcripción. A la región del DNA estudiada (a) se le marca radioactivamente en un extremo, y se le agrega un extracto nuclear (b); el complejo DNA-proteínas formado (c) se digiere enzimáticamente con DNasa, y las proteínas son detectadas como "huellas" en un footprint (d). Se puede fabricar un oligonucleótido de la secuencia cubierta por la huella (e), marcarse, agregarse a otro extracto nuclear (f), y correrse en un gel de retardamiento; un complejo DNA-proteína se verá aquí como una banda retrasada con respecto a la que forma el DNA libre (g). Si se metila el mismo oligonucleótido (h) y se agrega el mismo extracto (i), las bandas retardadas y libres en un gel de retardamiento podrán ser cortadas (j), y el DNA modificado químicamente; en un gel de secuencia, las bandas que representan puntos de contacto DNA-proteínas desaparecerán en el carril correspondiente a la banda retardada (k).

OBJETIVO

Caracterizar el factor de transcripción de células epiteliales que interactúa con la región comprendida entre los nucleótidos 7639 y 7652, en la región larga de control (LCR) del papilomavirus humano tipo 18 (HPV-18).

MATERIAL Y METODOS

ENSAYOS DE RETARDAMIENTO EN GEL

La electroforesis de complejos DNA-proteínas en gel conocida como ensayo de retardamiento se basa en la observación de que los complejos específicos migran a través de geles de poliacrilamida de baja fuerza iónica más lentamente que los fragmentos libres de DNA que no han formado complejo; es decir, los primeros migran retardados con respecto a los últimos (Garner y Revzin, 1981). Esto permite caracterizar la actividad de reconocimiento de factores proteicos por secuencias funcionales específicas de DNA lineal, los cuales pueden estar involucrados en mecanismos de regulación de transcripción o de replicación.

Las reacciones fueron realizadas en volúmenes de 20-25 μ l en presencia de Hepes 10 mM, pH 7.9; KCl 30 mM; glicerol 10% (V/V), DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 1 a 2 μ g poli dI-dC como DNA acarreador, cloruro de magnesio 4 mM y espermidina 4mM.

La mezcla se incubó con extractos nucleares en cantidades variables durante 10 minutos en hielo; posteriormente, se añadieron 1 a 2 ng de oligonucleótidos de doble cadena marcados radioactivamente con 32 -P, 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-11),

conteniendo TBE 0.5X (Tris-Boratos-EDTA:44.5 mM Tris, 44.5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA); las mezclas se colocaron en los pozos del gel añadiendo colorantes indicadores de corrida en los carriles sin extracto (azul de bromofenol 0.02%; xilencianol 0.02%; glicerol 50%) la mezcla se sometió a electroforesis a 150 volts, durante 1:30 a 2:30 hrs dependiendo del tamaño de la sonda. Al concluir la corrida, los geles se fijaron en 10% ácido acético/ 10% metanol por 15-20 min, se transfirieron a papel Whatman 3MM y se secaron por 60-90 minutos. Finalmente, los geles fueron expuestos en película Kodak X-Omat.

AISLAMIENTO DE NUCLEOS DE HIGADO DE RATA

Los hígados (peso aproximado 8-12 g) de 3-9 ratas macho, (cepa Sprague-Dawley, de 180-200 g) fueron disectados y lavados con buffer salino de fosfatos (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1.4 mM). Se eliminó tejido no hepático y se cortaron los hígados en trozos pequeños, agregándose sacarosa modificada (sacarosa 2.3 M, EDTA 1 mM y Hepes 10 mM) en una relación peso:volumen de 1:5. Esta mezcla se homogeneizó utilizando un pistilo de teflón impulsado con motor. El homogeneizado se filtró a través de 4 capas de gaza estéril y se colocó sobre un colchón de 5 ml de sacarosa modificada en tubos de polialómero de 50 ml para rotor de ultracentrifuga Beckman SW 28. Se centrifugó por 60 minutos a 25 000 rpm (82 705 g) a 2 °C. Se aspiró el sobrenadante utilizando una trampa de vacío, eliminándose las 3 capas superiores

al botón de núcleos. Los tubos se dejaron escurrir invertidos y se secó su interior con gaza estéril. Todo lo anterior se realizó en una cámara fría, a 4 °C (Cereghini, 1988).

AISLAMIENTO DE NUCLEOS DE LINEA CELULAR HeLa

Los núcleos fueron aislados por el método del detergente a partir de cultivos celulares de HeLa en confluencia. Las células fueron lavadas con 4 volúmenes de HNB (0.5 M sacarosa, 60 mM KCl, 0.15 mM Tris pH 7.5 15 mM, 0.15 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM espermidina, 0.15 mM espermina, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF). Se centrifugó en centrífuga clínica por 5 minutos a 2000 rpm a 4 C; el sobrenadante se decantó y se añadió HNB + 1% NP40 al botón de células, para lisarlas; inmediatamente después de 5 agitaciones vigorosas, se agregó otro volumen de HNB, para después centrifugar nuevamente en la centrífuga clínica por 10 minutos a 2 500 rpm a 4 C; finalmente, se decantó el sobrenadante, y se dejó escurrir a los tubos invirtiéndolos para después secar su interior con gaza estéril (Cereghini, 1988).

PREPARACION DE EXTRACTOS NUCLEARES

A partir de los núcleos aislados como se menciona arriba, los extractos fueron preparados de la siguiente manera: los botones nucleares fueron resuspendidos en buffer C (Hepes 20 mM pH 7.9, glicerol 25%, NaCl 420 mM, MgCl₂ 1.3 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 0.5 mM,

PMSF 0.5 mM). La suspensión fué puesta en agitación suave a 4 °C durante 45 minutos; a continuación, se centrifugó por 30 minutos a 16 000 rpm (23 941 g) a 4 °C en rotor Beckman SW 50.1; se desecharon los botones resultantes, compuestos por cromatina, y se rescató el sobrenadante, al cual se adicionaron 1.6 volúmenes de una solución que contenía (NH₄)₂SO₄ 3.8M y Hepes 20 mM pH 7.9, con el fin de precipitar las proteínas solubles. Esta mezcla fue agitada suavemente durante 30 minutos a 4 °C y centrifugada durante 20 minutos a 35 000 rpm (154 693 g) a 4 °C, en rotor Beckman SW 40.

El botón de proteínas resultante se resuspendió en 500 ul buffer de diálisis (Hepes 20 mM pH 7.9, KCl 60 mM, glicerol 20%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, EDTA 0.2 mM), conteniendo inhibidores de proteasas (5 ug/ml de extracto de cada uno de los siguientes: pepstatina A, leupeptina, antipaina, quimostatina, aprotinina; y benzamida 2mM). La suspensión se dializó durante 90 minutos a 4 °C contra 1000 volúmenes del mismo buffer de diálisis, conteniendo éste únicamente benzamida 2 mM y PMSF 1 mM como inhibidores de proteasas (Shapiro et al, 1988).

Los extractos fueron repartidos en alícuotas de 10-20 ul, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -70 °C; la concentración de proteínas fué determinada mediante la técnica descrita por Bradford (1976), usando 1 mg/ml albúmina sérica bovina como estándar.

CULTIVOS CELULARES

Todas las células se crecieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 7% de suero fetal de ternera, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, a 37 °C.

MARCAJE RADIOACTIVO DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS

El marcaje radioactivo de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos se realizó de dos maneras distintas: la primera, utilizando 32-P dNTP alfa (Amersham, U.K.) se realizó empleando el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I de E. coli, la cual incorpora nucleótidos marcados en los extremos 3' del DNA lineal de doble cadena, con extremos 5' salientes; esta técnica se utilizó únicamente cuando el oligonucleótido en cuestión poseía un nucleótido complementario al 32-P dNTP utilizado, en la primera o segunda posiciones del extremo monocatenario saliente, con respecto a la zona de doble cadena. En este caso, la reacción se llevó a cabo agregando 100 ng de DNA de doble cadena, 0.166 mM de tres dNTP no marcados (exceptuando el que se incorpora marcado), 1.5 ul de buffer Klenow 10 X (Tris 0.5 M pH 7.2, MgSO₄ 0.1 M, DTT 1mM, y 500 ug/ml de albúmina sérica bovina), 5 unidades/ug de DNA de enzima Klenow, y 60 uCi de 32-P dNTP alfa (dATP ó dCTP, dependiendo de la secuencia del extremo 5' terminal); la mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 15 ul con agua bidestilada estéril y se dejó incubar por 45 minutos a temperatura ambiente.

La otra manera en la que se llevó a cabo el marcaje, fué mediante la utilización de 32-P ATP gama (I.C.N.); en este caso, se utilizó la enzima cinasa, la cual incorpora el fosfato gamma radioactivo que lleva el 32-P ATP al OH- de la posición 5 en el nucleótido terminal del oligonucleótido a marcar. La reacción se realizó utilizando 100 ng de DNA de doble cadena, 1.5 de buffer de cinasa (NaCl 500 mM, Tris 500 mM pH 8.0, MgCl2 100 mM), 5 unidades/ug de DNA de enzima cinasa y 100 uCi de 32-P ATP gama; la mezcla se llevó a un volumen final de reacción de 15 ul con agua bidestilada estéril, y se incubó por 60 minutos a 37 C.

En ambos casos, una vez realizado el marcaje se procedió a separar el DNA marcado de los nucleótidos no incorporados al oligonucleótido y de la enzima. Para realizar esto, se agregaron a la mezcla 100 ul de TE + 50 ul de fenol saturado + 50 ul de solución cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó durante 5 minutos a 14 000 rpm a temperatura ambiente. Después de agitar vigorosamente se tomó la fase acuosa resultante y se agregó un volumen de CH3COONH4 4 M; al nuevo volumen resultante se añadieron 2.5 volúmenes más de etanol absoluto y se centrifugó a 14 000 rpm durante 60 minutos a 4 C. Se decantó el sobrenadante, y la pastilla se lavó con 80% etanol; a continuación, se dejó secar por 10 minutos y se resuspendió con TE 1X de manera que la actividad resultante quedase entre 50-100 cpm/ng de DNA (Cereghini, 1988).

OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS

Como sonda marcada radioactivamente se utilizó un oligonucleótido que contenía la secuencia correspondiente a los nucleótidos 7639-7652 del LCR del HPV-18. Como competidores fríos se utilizaron oligonucleótidos con otras secuencias del LCR del HPV-18 (E2+K, E2+AP-1) y de otros genomas virales (HSV-1-UPE, SV40-OCT), reconocidas por factores de transcripción conocidos (ver Tabla 1.)

VI	5'-GCTACAACAATTGCTTGCATAACTATATCC-3' 3'-TGTGTGTTAACGAACGTATTGATATAGGTGA-5'
E2 + K	5'-CTAGTGCAACCGATTTCGGTTGCCTTTGGCTTATGT-3' 3'-ACGTTGGCTAAAGCCAACGGAAACCGAATACAGATC-5'
E2+AP1	5'-CTAGTGACCGAAAACGGTCGGCGCTGACTCAGATT-3' 3'-ACTGGCTTTTGCCAGCCGCGACTGAGTCTAAGATC-5'
UPE	5'-TAGGCGACGTGACCGGGTGTTCCTGCA-3' 3'-ACGTATCCGCTGCACCTGGCCCCACAAGG-5'
SV40-OCT	5'-GCATGCTTTGCATACTTC-3' 3'-CGTACGAAACGTATGAAG-5'

Tabla 1. Oligonucleótidos de doble cadena utilizados en los experimentos de retardamiento y competencia en geles nativos de poli(acrilamida). Algunos contienen fragmentos cortos de DNA del LCR de HPV-18 (VI, E2+K, E2+AP-1) (Cole y Danós, 1987); otros, secuencias de otras regiones virales (Ad MLP-UPE, SV40-OCT) (Ondek, 1988).

RESULTADOS

Para caracterizar al factor "VI", se construyó un oligonucleótido que contiene 30 pares de bases del LCR del HPV-18 (nucleótidos 7631-7661 de la secuencia descrita por Cole y Danos, 1987), y que contiene la secuencia protegida por la huella VI. Este oligonucleótido fué usado en ensayos de retardamiento en gel para determinar la especificidad de la interacción y contribuir a determinar la naturaleza del factor que produce la huella.

Inicialmente, al desconocerse por completo la naturaleza del factor "VI", se decidió trabajar utilizando extractos nucleares de células HeLa, puesto que éstas derivan de un carcinoma cervical a cuyo origen está asociado el HPV-18, y de hígado de rata, debido a la accesibilidad y abundancia de éste material, útil en caso de determinarse que se trataba de un factor no caracterizado y se decidiese, por lo tanto, proceder a su purificación. Por lo tanto, el primer paso fué determinar la existencia, en extractos de núcleo de hígado de rata y células HeLa, de un factor capaz de reconocer a este oligonucleótido.

Como se observa en la figura 6, los extractos de núcleos de hígado de rata y de células HeLa forman ambos un complejo nucleoproteico de migración idéntica (C1) al incubarse con el oligonucleótido VI marcado. Esto habla no solo de la presencia, tanto en hígado de rata como en HeLa, de un factor celular con capacidad de reconocer la secuencia del oligonucleótido, sino de que muy posiblemente se trata del mismo factor, ya que la movilidad

electroforética del complejo DNA-proteína está determinada por características de la proteína, y movibilidades electroforéticas idénticas podrían indicar proteínas idénticas. En el caso de los extractos de HeLa, se puede observar la formación de una segunda banda de mayor migración (C2), que no se encuentra en hígado, y cuya explicación se dará más adelante.

A continuación, se trató de determinar la especificidad de los complejos retardados mediante ensayos de competencia. El oligonucleótido VI marcado se incubó con 10 ug de extracto de núcleos de hígado de rata en presencia de cantidades crecientes de oligonucleótidos homólogos o heterólogos no marcados radioactivamente (fríos). Estos últimos contenían secuencias reconocidas por factores de transcripción ya conocidos (AP-1, K, UPE; ver Material y Métodos). En la figura 7 se observa el resultado de éste experimento: la formación del complejo C1 fué inhibida parcialmente por el oligonucleótido homólogo empleando bajas concentraciones (10 ng) de competidor frío, y totalmente inhibida al emplear concentraciones más altas (50 ng) del mismo competidor. En cambio, los oligonucleótidos heterólogos no inhibieron la formación del complejo ni aún a altas concentraciones (50 ng) de los mismos. Este resultado sugería que el complejo C1 resultaba de la interacción específica de un factor nuclear y el DNA.

Un experimento posterior determinó que el factor VI podría ser un factor conocido o, por lo menos, un factor perteneciente a una familia de factores conocidos. En condiciones similares a las del experimento anterior, pero ahora utilizando un oligonucleótido

Fig. 6. Presencia de un factor nuclear que reconoce al oligonucleótido VI en extractos nucleares de hígado de rata y células HeLa. Todos los carriles tienen 1 ng de oligonucleótido VI marcado; carril 1: oligonucleótido VI en ausencia de proteína; carriles 2-4: + 4, 8 y 16 ug de extracto nuclear de HeLa, respectivamente; carriles 5-7: + 4, 8 y 16 ug de extracto nuclear de hígado de rata, respectivamente. C1, complejo DNA-proteína específico; C11, complejo DNA-proteína inespecífico; L, oligonucleótido VI libre.

Fig. 7. Unión específica de un factor nuclear presente en hígado de rata con el oligonucleótido VI. Todos los carriles tienen 1 ng de oligonucleótido VI marcado. Carril 1, oligonucleótido VI en ausencia de proteína; carriles 2-9, oligonucleótido VI + 10 ug extracto nuclear de hígado de rata; 3-4: + 10-50 ng oligonucleótido VI frío; 5-6: + 10-50 ng oligonucleótido E2 + AP-1 frío; 7-8: + 10-50 ng oligonucleótido E2 + K frío; 9: + 50 ng UPE. C1, complejo específico; Ci complejo inespecífico; L, DNA libre.

Fig. 6

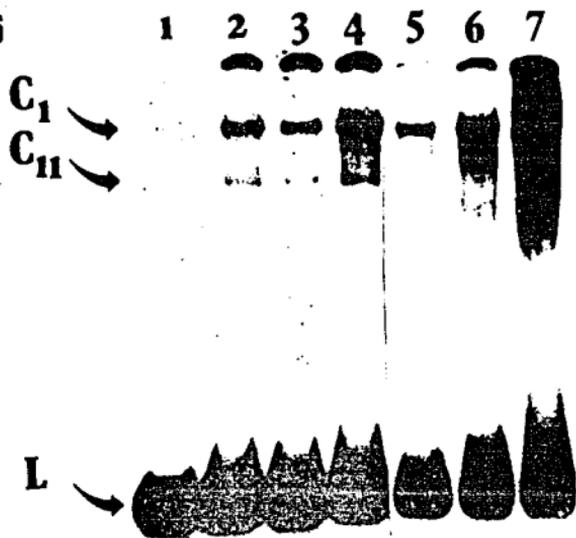
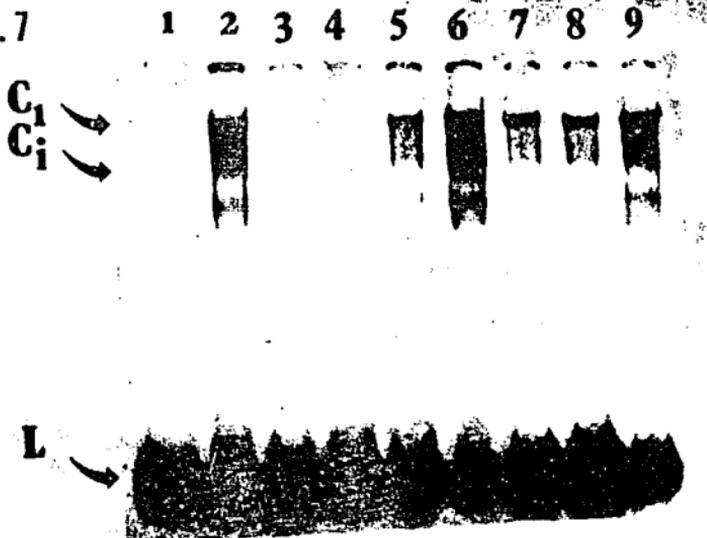


Fig. 7



heterólogo frío que contiene una secuencia reconocida por la familia de factores de transcripción que se unen a secuencias octaméricas (Oct), se observó una inhibición total del complejo nucleoproteico C1, aún a bajas concentraciones (10 ng) del oligonucleótido frío. Esta inhibición es superior incluso a la que se encuentra utilizando el oligonucleótido homólogo, por lo que se determinó que el factor estudiado se trataba de una proteína con afinidad por secuencias octaméricas (5'-ATTGCAT-3') (Figura 8).

Una vez determinado que el factor era una proteína de tipo Oct, se procedió a determinar si el complejo nucleoproteico que se observaba en HeLa era el mismo, debido a que en HeLa se había reportado la existencia del factor de transcripción ubicuo Oct-1. De ésta manera, de encontrar el mismo patrón de competencias en HeLa que en hígado de rata, se entrevería la posibilidad de que el factor Oct-1 estuviese interviniendo en los complejos nucleoproteicos.

Como se mencionaba arriba, al realizar ensayos de retardo en HeLa se obtenían dos complejos DNA-proteína con migración electroforética distinta. Se decidió investigar la especificidad de ambos complejos, mediante ensayos de competencia. Un ensayo previo, sin embargo, pareció indicar que el complejo C2 era inespecífico; en la figura 9 se observa que, al cambiar el orden de interacción usual, de: acarreador inespecífico-extracto nuclear-oligonucleótido marcado, por el de: acarreador inespecífico-oligonucleótido marcado-extracto nuclear, se obtiene un claro cambio en la intensidad del complejo C2; esto se debe a que, en el primer caso,

Fig. 8. Interacción específica de una secuencia octamérica con el factor celular VI. Todos los carriles tienen 1 ng de oligonucleótido VI marcado. Carril 1, oligonucleótido VI en ausencia de proteína; carriles 2-8, oligonucleótido VI + 10 ug extracto nuclear de hígado de rata; 3-4: + 10-50 ng oligonucleótido VI frío; 5-6: + 10-50 ng oligonucleótido E2 + AP-1 frío; 7-8: + 10-50 ng oligonucleótido SV40-oct frío. C1, complejo específico; L, DNA libre.

Fig. 9. Efecto del acarreador inespecífico sobre los complejos DNA-proteína en HeLa e hígado de rata. Todos los carriles tienen 1 ng de oligonucleótido VI marcado. Carriles 1,6: oligonucleótido VI en ausencia de proteína; carriles 2-5, mezcla de acarreador inespecífico y extracto antes del oligonucleótido VI; carriles 7-10, mezcla de acarreador inespecífico y oligonucleótido VI antes del extracto; 2-3 y 7-8: + 4-8 ug extracto nuclear HeLa; 4-5 y 9-10: + 4-8 ug extracto nuclear de hígado de rata. C1, complejo específico; C11, complejo inespecífico; L, DNA libre.

Fig. 8

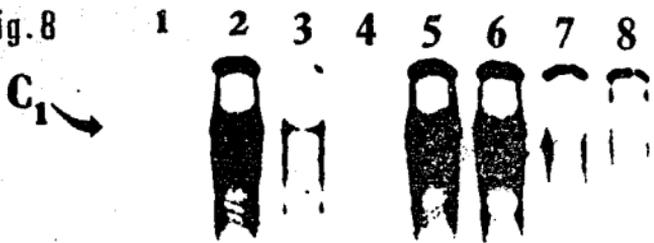
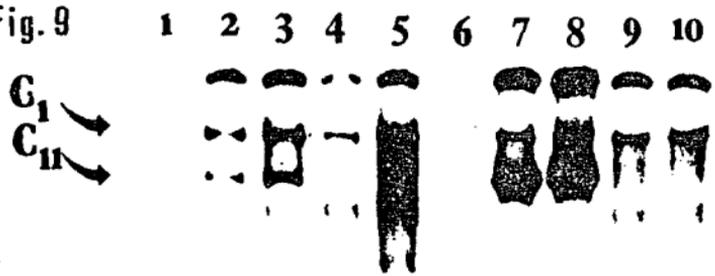


Fig. 9



el extracto tiene que interactuar con el acarreador antes de poder interactuar con el oligonucleótido marcado, y las proteínas con afinidades poco específicas tienden a unirse al acarreador, eliminando la posibilidad de que interactúen de manera inespecífica con el oligonucleótido marcado; en el segundo caso, el extracto interactúa con el acarreador y el oligonucleótido marcado al mismo tiempo, permitiendo que factores con baja o ninguna especificidad se unan a los oligonucleótidos. Complejos específicos, sin embargo, no se ven afectados por el cambio de orden en las interacciones, y éste es el caso del complejo C1, como se observa en la misma figura.

A continuación, se realizaron ensayos de competencia con oligonucleótidos homólogos y heterólogos. En este caso, se utilizó una cantidad de extracto nuclear de células HeLa menor a la utilizada con anterioridad (0.5 ug), en presencia del oligonucleótido VI marcado, de manera que sólo se observa la banda correspondiente al complejo C2 (figura 10). Como se observa, existe una inhibición parcial de la formación del complejo al utilizar bajas concentraciones (10 ng) de cualquier oligonucleótido competidor, tanto homólogo como heterólogo, y la inhibición es total a concentraciones altas (50 ng) de todos los oligonucleótidos. De ésta manera, se observa que el complejo nucleoproteico C2 en HeLa es inespecífico.

Finalmente, se incubaron 10 ug de extracto nuclear de HeLa en presencia del oligonucleótido VI marcado, en presencia de cantidades crecientes de oligonucleótidos homólogos y heterólogos

en exceso. Como se observa en la figura 11, a concentraciones altas (50 ng) de competidor frío, tanto el oligonucleótido homólogo como el heterólogo que contiene la secuencia octamérica inhiben totalmente la formación del complejo nucleoproteico C1; a bajas concentraciones (10 ng), el oligonucleótido homólogo inhibe parcialmente; el oligonucleótido con secuencia octamérica inhibe totalmente la formación del complejo. Ningún otro oligonucleótido heterólogo utilizado inhibe la formación del complejo C1, por lo que el complejo C1 parece formarse por la interacción entre el oligonucleótido VI y una proteína de tipo Oct.

Fig. 10. Interacción inespecífica del complejo 2. Todos los carriles tienen 1 ng del oligonucleótido VI marcado radioactivamente + 0.5 ug extracto nuclear de línea celular HeLa. Carriles 2 y 6: + 10 y 50 ng oligonucleótido VI frío; carriles 3 y 7: + 10 y 50 ng oligonucleótido E2 + AP-1 frío; carriles 4 y 8: + 10 y 50 ng oligonucleótido SV40-oct frío; carriles 5 y 9: + 10 y 50 ng oligonucleótido E2 + K frío. C11, complejo inespecífico; L, DNA libre.

Fig. 11. Interacción específica del complejo 1. Todos los carriles tienen 1 ng del oligonucleótido VI marcado radioactivamente. Carril 2: + 10 ug extracto nuclear de línea celular HeLa; carriles 3-4: igual que 2 + 10-50 ng oligonucleótido VI frío; carriles 5-6: igual que 2 + 10-50 ng oligonucleótido E2 + AP-1 frío; carriles 7-8: igual que 2 + 10-50 ng oligonucleótido SV40-oct frío; carriles 9-10: igual que 2 + 10-50 ng oligonucleótido E2 + K frío. C1, complejo específico; L, DNA libre.

Fig. 10

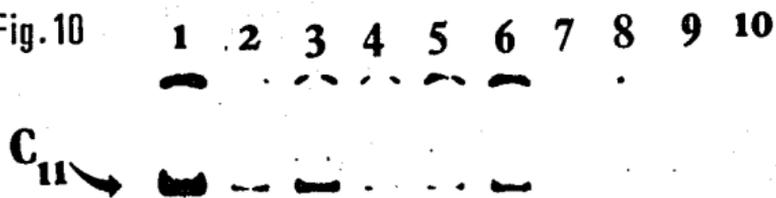
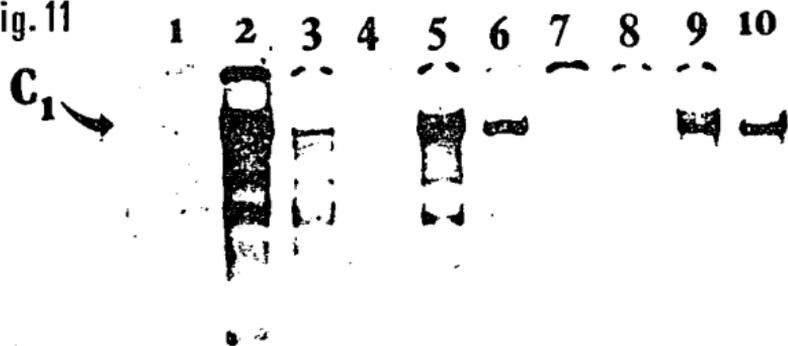


Fig. 11



DISCUSION

En este trabajo se mostró que un factor proteico de origen celular de tipo Oct, es decir, con capacidad de reconocer una secuencia octamérica consenso 5'-ATTGCAT-3', existe en el núcleo de células HeLa y de hepatocitos de rata. Este factor interactúa con una región de la LCR del HPV-18, la correspondiente a los nucleótidos 7639-7652 (secuencia publicada por Cole y Danós, 1986). En ésta región existen dos secuencias con extrema similitud al octámero: la secuencia 5'-AATTGCTT-3', con 6/8 bases idénticas a las de la secuencia octamérica, y la secuencia 5'-TTGCATAA-3', con 5/8 bases idénticas; ambas secuencias se sobrelapan en dos bases (ver tabla 2), y en teoría, ambas podrían ser reconocidas por una proteína de tipo Oct.

Esta sobrelapación de dos secuencias similares a la octamérica, ocurre de manera similar en dirección 3' de la región mencionada anteriormente, en la región correspondiente a los nucleótidos 7815-7824 (Cole y Danós, 1986). Aquí existe una secuencia 5'-GGTTGCAT-3', con 6/8 bases idénticas al consenso, así como la secuencia 5'-TTGCATAA-3', con 5/8 bases idénticas, y exactamente idéntica en su conjunto a una de las secuencias de la región antes mencionada. Esta región, al igual que la anterior, se encontró protegida por factores celulares en un ensayo de footprint realizado con anterioridad (García-Carrancá et al, 1988), por lo que existe la posibilidad de que se trate de un segundo sitio de reconocimiento para algún factor Oct. Un trabajo reciente encontró

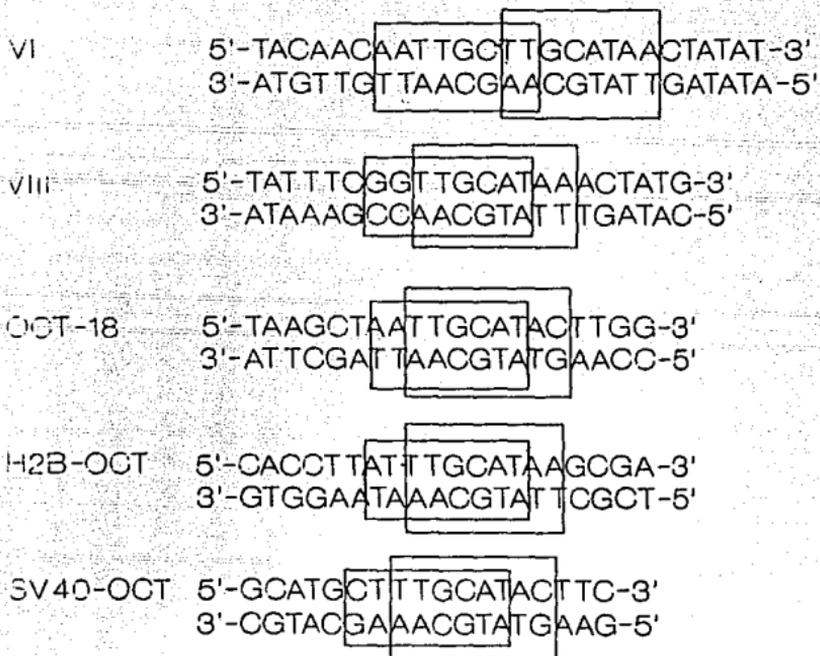


Tabla 2. Regiones del LCR que guardan similitud con secuencias octaméricas. VI y VIII corresponden a sitios en el LCR del HPV-18 donde se han detectado huellas; oct-18 es un sitio dentro del mismo LCR al cual se une Oct-1; H2B-oct corresponde a un sitio dentro del promotor de la histona H2B que es reconocido por Oct-1, y que posee la secuencia octamérica consenso. En los recuadros están los sitios con por lo menos 5/8 bases idénticas a las del octámero consenso.

un tercer sitio de interacción Oct-DNA sobre las bases 7721-7728 del LCR del HPV-18; aquí, existe un sitio 5'-AATTGCAT-3' con 7/8 bases idénticas al octámero consenso, el cual aparentemente es reconocido por Oct-1 (Hoppe-Sleyer et al, 1991).

Los factores de transcripción conocidos como Oct, o bien OBP (siglas que significan proteínas de unión a octámero) constituyen una familia de factores cuyo común denominador es la capacidad de reconocer y unirse a la secuencia octamérica 5'-ATTGCAT-3'. Estas proteínas poseen una región conservada conocida como dominio POU, la cual comparten con la proteína Pit-1, un factor de transcripción específico para pituitaria descubierto en rata (Ingraham et al, 1988), y con el producto del gen unc-86, involucrado en el desarrollo de linajes neurales en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Finney et al, 1988); por lo mismo, a todas éstas se les conoce como proteínas POU. Las proteínas Oct poseen dominios POU extremadamente conservados entre ellas (87% de similitud), además de poseer otras regiones conservadas entre ellas que no comparten con Pit-1 y unc-86.

El dominio POU es un elemento de 150 aminoácidos que, a su vez, contiene un sub-elemento de 75 aa denominado caja homeótica, originalmente descrito para un grupo de genes cuyos mutantes producían serias alteraciones en el desarrollo de *Drosophila* sp (Ghering, 1987; Scott y Carroll, 1987). En las proteínas codificadas por estos genes es justamente la caja homeótica, a través de estructuras secundarias conocidas como hélice-vuelta-hélice, la responsable de la unión entre la proteína que lo posee y secuencias

específicas de DNA. Aparentemente, las cajas homeóticas de las proteínas POU también son esenciales en su unión al DNA; sin embargo, a diferencia de otras proteínas con cajas homeóticas, las proteínas POU poseen un segundo sub-elemento dentro del dominio POU que también parece jugar un papel en la unión DNA-proteína (ver figura 12); la alta conservación de este subdominio sugiere que la caja homeótica no es suficiente para que estas proteínas se unan al DNA debido, posiblemente, a que su estructura es distinta a las de otras proteínas con cajas homeóticas (Sturm and Herr, 1988).

La región 5' de la secuencia octamérica es idéntica a la secuencia que reconocen otras proteínas homeóticas (5'-ATTT-3'); muy posiblemente, la caja homeótica del elemento POU esté reconociendo esta región de la secuencia. Existen ciertas diferencias entre los cajas homeóticas de las proteínas Oct y aquellas que forman parte de las demás proteínas homeóticas, con las cuales las primeras comparten cuando mucho 21 de 60 aa; en cambio, las cajas homeóticas de las proteínas Oct son muy parecidas entre sí (53 de 60 aa son compartidos por Oct-1 y Oct-2) (Herr, et al, 1988). Existe evidencia de que las diferentes proteínas homeóticas pueden reconocer una variedad de secuencias relacionadas con una secuencia de 10 pb rica en AT: 5'-TCAATTAAAT-3' (Levine y Hoey, 1988). En todo caso, existen secuencias aledañas con un cierto grado de conservación que podrían auxiliar a la unión entre el DNA y las proteínas.

Aparentemente, las proteínas Oct poseen, como las demás proteínas homeóticas, una marcada flexibilidad en su reconocimiento

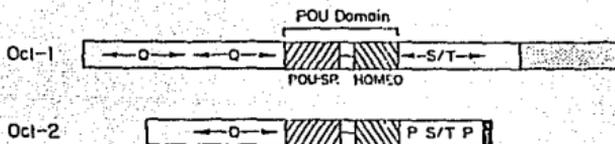


Fig. 12. Dominios POU en Oct-1 y Oct-2. POU-SP: sub-elemento específico a POU; HOMEO: caja homeótica. En: Sturm y Herr, 1988.

GCTACAACAATTGCTTGCATAACTATATCCACT
 CGATGTTGT TAACGAACGTAT TGATATAGGTGA

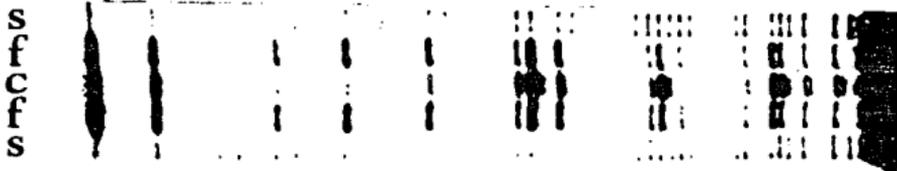


Fig. 13. Puntos de contacto sobre el DNA del factor que forma el complejo C1 en los ensayos de retardamiento con el oligonucleótido VI. Los puntos bajo la secuencia corresponden a las bases que no fueron cortadas por estar protegidas por el factor; el punto atravesado por una línea diagonal representa un contacto parcial; la barra corresponde a la huella que se observa en el footprint. C=banda retardada (correspondiente al complejo C1); f= banda libre; s= secuencia del oligonucleótido.

a la secuencia determinada como consenso: en este caso, con respecto a la secuencia octamérica. Estudios previos han examinado la capacidad de unión de una de éstas proteínas, Oct-1, a una serie de variantes octaméricas naturales y sintéticas dentro del enhancer de SV40 y dentro de los enhancers de los genes tempranos inmediatos del herpesvirus (HSV-1). Uno de los dos sitios de interacción de Oct-1 con el enhancer del SV40 poseía únicamente 5 bases idénticas a las del consenso, y se demostró que la interacción de Oct-1 con ese sitio dependía de la integridad de las secuencias aledañas al octámero degenerado. Cuando las bases internas eran cambiadas de manera que quedasen equivalentes a las del octámero consenso, las secuencias aledañas podían ser cambiadas sin afectar la interacción entre Oct-1 y el sitio (Baumruker et al, 1988).

Esta marcada flexibilidad en el reconocimiento de secuencias aparentemente se debe a la naturaleza del dominio POU. No sólo es flexible la caja homeótica de POU; el segundo subelemento, presente sólo en proteínas POU y presumiblemente responsable del contacto entre Oct y la región 3' de la secuencia octamérica (5'-GCAT-3') también contribuye con una cierta flexibilidad de reconocimiento de secuencia. Además, los diferentes subelementos de POU se influyen mutuamente y modifican el tipo de secuencia que reconocería cada uno de los subelementos en ausencia de los otros (Aurora y Herr, 1991). En estudios detallados que compararon la especificidad del dominio POU de Pit-1 y el de la caja homeótica de POU en ausencia del resto del dominio, se encontró que la caja homeótica hace contacto con bases enteramente distintas a las que contacta el

dominio POU completo (Ingraham et al, 1990); es muy probable que esto se aplique igualmente al dominio POU de Oct-1. (Fig. 12).

Así, la capacidad de una proteína Oct de reconocer secuencias octaméricas degeneradas le permitiría, en principio, interactuar con sitios de la LCR del HPV que guardan una cierta similitud, aunque no identidad, con la secuencia octamérica consenso. De hecho, ensayos de interferencia por metilación realizados paralelamente a este trabajo, han demostrado que existe una interacción DNA-proteína en un sitio aledaño a la secuencia octamérica degenerada (ver figura 13), lo cual puede ser explicado de distintas maneras. Una de éstas es que Oct pueda contactar con bases aledañas, estabilizando su unión con una secuencia octamérica imperfecta. Otra posibilidad es que la interacción de Oct con un octámero degenerado sea estabilizada por otro factor o factores, los cuales a su vez tendrían especificidad por las secuencias aledañas al octámero. Un ejemplo de lo anterior es el promotor del virus tumoral mamario del ratón (MMTV), en donde otro factor con afinidad por secuencias específicas de DNA, el receptor de progesterona, estabiliza o facilita la unión de Oct-1 a secuencias octaméricas; en éste caso, las secuencias son idénticas o casi idénticas (7/8 bases) al consenso, pero el receptor de progesterona promueve la unión de oct-1 al promotor a concentraciones muy bajas de éste último, con las cuales la unión no ocurría cuando el promotor se hallaba en presencia sólo de Oct-1 (Bruggemeier et al, 1991).

La existencia de múltiples proteínas Oct que reconocen

secuencias idénticas hace difícil definir con exactitud la naturaleza de la proteína responsable de la formación de los complejos específicos que se observan en los resultados. Sin embargo, de las 5 proteínas Oct caracterizadas hasta ahora, tres no han sido halladas aún en tejidos adultos: Oct-3 fue localizada en células de carcinoma embrionario (Okamoto et al, 1990), y Oct-4 y 5 en células germinales, oocitos no fertilizados y blastocitos de ratón (Scholer et al, 1990). Oct-2, ha sido hallada únicamente en linfocitos B (Scheidereit et al, 1987), y se piensa que es tejido-específico, ya que no ha sido encontrada aún en otros tipos celulares. La única proteína Oct detectada en células HeLa hasta la fecha ha sido Oct-1, la cual ha sido hallada prácticamente en todos los tejidos adultos, por lo que se le considera ubicua; consideramos, probable, por lo tanto, que éste sea el factor que forma el complejo específico en nuestros experimentos; sin embargo, no descartamos que pueda tratarse de otro miembro aún no caracterizado de la familia Oct.

El papel que pudiese jugar Oct-1 en la regulación de los genes del papilomavirus no está claro. La región del enhancer constitutivo de la LCR que reconoce Oct ha sido caracterizada como responsable del epiteliotropismo del HPV-18 (García-Carrancá et al, 1988); como no ha sido reportada aún la existencia de un factor epitelio-específico que interactúa con ésta región, se pensó en un principio que el factor responsable de la huella VI era tejido-específico. En caso de ser Oct-1 el que produce la huella, su ubicuidad podría tomarse como un argumento en contra de un papel

definitorio en cuanto a la especificidad tisular del HPV-18. Sin embargo, dos posibilidades permitirían involucrar a Oct-1 en éste sentido. En primer lugar, Oct-1 podría estar actuando como un intermediario o estabilizador entre algún otro factor tejido-específico y el LCR, o bien, como intermediario entre éste mismo factor tejido-específico y un factor de transcripción general. Este tipo de interacción, que implicaría un control combinatorio de la transcripción, ha sido observada en la regulación de los genes tempranos inmediatos del herpesvirus; en éste caso, Oct-1 funciona cooperativamente con una proteína viral, Vmw65, en la activación de la expresión de los genes virales (Goding y O'Hare, 1989). Una interacción similar, pero involucrando un factor celular tejido-específico en lugar de la proteína viral, podría postularse para el caso del HPV-18.

Una segunda posibilidad es que la especificidad tisular está determinada no por uno o dos factores especializados, sino por distintas combinaciones y/o concentraciones de factores ubicuos. Por ejemplo, no se ha encontrado algún factor que interactúe con el LCR del HPV-16 que se halle presente en células donde el enhancer está activo y que no se encuentre en aquellas células donde el mismo enhancer no es activo (Chong et al, 1991). En particular, se ha reportado que la concentración diferencial de Oct puede determinar la especificidad o ubicuidad en la función de distintos promotores (Kemler et al, 1991).

La posible participación de Oct-1 en el epiteliotropismo de los HPV no excluye otro tipo de funciones. Así, se ha encontrado

que Oct-1 es capaz de activar la transcripción de una gran variedad de genes que se transcriben de manera ubicua, incluyendo a la histona H2B (Fletcher et al, 1987) y algunos U snRNA (Mattaj et al, 1985); también está involucrado en la iniciación de la replicación del adenovirus (O'Neill et al, 1988). Una vez más, sin embargo, el contexto en el que se encuentra ayuda a determinar la función que realizará: en el caso del HPV-18 se ha encontrado que Oct-1 podría estar actuando como represor transcripcional (Hoppe-Sleyer et al, 1991), en vez de activador, como en los casos anteriores, pero sin necesidad de unirse al DNA. Esto podría explicarse aduciendo un secuestro por parte de Oct-1 de una proteína activadora, o, alternativamente, de una interacción entre Oct-1 y una proteína represora que actuaría a través de éste último. Cualquiera de estas dos alternativas apoyarían la tesis de que Oct-1 regula transcripción mediante interacciones con otros factores; en particular, se ha sugerido que Oct-1 podría activar la transcripción de H2B mediante una interacción con el factor de transcripción general TFIID (Tanaka y Herr, 1990).

Una tercera alternativa, sin embargo, es que Oct-1 esté compitiendo con algún otro factor activador por sitios sobrelapantes, en cuyo caso estaría funcionando como inhibidor competitivo de la transcripción. Recientemente, se ha reportado que Oct-1 estaría compitiendo con un nuevo factor epitelio específico, KRF-1, en el LCR del HPV-18, inhibiendo el aumento de actividad del enhancer del HPV mediado por éste último factor (Mack, D. H., y Laimins, L., 1991). Nosotros no pudimos detectar la presencia de éste factor,

pero si se confirma la existencia de KRF-1, el balance existente entre éste y Oct-1 podría determinar la permanencia de las células epiteliales en un estado diferenciado o su transformación mediante la activación de los oncogenes virales E6 y E7; un mecanismo más general diferenciación-división involucrando regulación a un nivel transcripcional por equilibrio entre diferentes factores que compitiesen por sitios similares podría, por lo tanto, ser postulado.

Estudios recientes han conectado la regulación transcripcional de algunos genes con el ciclo celular, a través justamente de Oct-1. Se ha encontrado que Oct-1 se puede hallar en distintos estados de fosforilación, dependientes de la fase del ciclo en el que se encuentra la célula; aparentemente, el tipo de residuos de aa en los que se fosforile a Oct-1 y el número de sitios fosforilados determinan el que Oct sea capaz de unirse al DNA, y de que esté o no transcripcionalmente activo una vez que se una al mismo. La enzima P34cdc2, una cinasa que aparentemente funciona como reguladora general del ciclo celular, fosforila a una serie de proteínas, entre ellas a Oct-1, modificando su actividad y provocando toda una batería de respuestas que inducen a la célula a pasar a la siguiente fase del ciclo (Roberts et al, 1991). De esta manera, se podría postular a Oct-1 como un intermediario clave entre la proliferación de las células del epitelio del cérvix y la expresión de los oncogenes del HPV-18, para el caso particular del CaCU; y como elemento clave de un control determinante en la decisión de una célula entre dividirse o diferenciarse, en términos

generales.

CONCLUSIONES

Este trabajo mostró que existe un factor celular de tipo Oct que interactúa específicamente con la región correspondiente a los nucleótidos 7639-7652 de la región larga de control (LCR) del papilomavirus humano tipo 18 (HPV-18) (ver Fig. 14). Se demostró la existencia de este factor tanto en núcleos de células HeLa, de origen epitelial, como en núcleos de hepatocitos de rata. La presencia de este factor en estos dos tipos de células de naturaleza distinta y el hecho de que no se ha demostrado la existencia de factores Oct distintos a Oct-1 en células HeLa, son argumentos que apoyan el que sea Oct-1 el factor que esté interactuando con la región antes mencionada. La ubicuidad de este factor es un apoyo a la teoría que propone que la especificidad tisular de la transcripción está determinada por diferentes combinaciones de factores universalmente localizados.

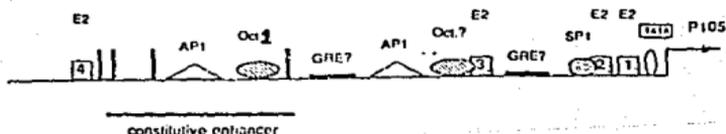


Fig. 14. Representación esquemática del LCR del HPV-18. Se indican los sitios de interacción con los factores de transcripción celulares y virales. La barra horizontal representa la región del enhancer constitutivo que se activa únicamente en células epiteliales. Se indica la localización del sitio que reconoce Oct-1 dentro del enhancer, y la posible presencia en el LCR de un segundo sitio de reconocimiento del mismo Oct-1 en una región localizada en dirección 3' con respecto al primer sitio. Se indican, además los sitios de interacción de factores ya caracterizados o posibles dentro del mismo LCR.

REFERENCIAS

Amtmann, E. y Sauer, G. (1982). Bovine papilloma virus transcription: polyadenylated RNA species and assessment of the direction of transcription. *J. Virol.* 43:59.

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

Aurora, R. y Herr, W. (1992). Segments of the POU domain influence one another's DNA-binding specificity. *Mol. Cell. Biol.* 12:455.

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

Barbosa, M.S. y Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. *Oncogene* 4:1529.

Baumruker, T., Sturm, R.A., y Herr, W. (1988). OBP100 binds remarkably degenerate octamer motifs through specific interactions with flanking sequences. *Genes Dev.* 2:1400.

Bernard, B.A., Bailly, C., Darmon, M., Thierry, F. y Yaniv, M. (1989). The intact HPV-18 E2 gene product is a transcriptional repressor of the homologous E6 promoter in human keratinocytes. *J. Virol.* 63:4317.

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.

Bravo, C. (1990). Análisis de interacciones ADN-proteínas en la región larga de control del papilomavirus humano tipo-18. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala, UNAM. Pp 1-70.

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

Bruggemeier, U., Kalff, M., Franke, S., Scheidereit, C., y Beato, M. (1991). Ubiquitous transcription factor OTF-1 mediates induction of the MMTV promoter through synergistic interaction with hormone receptors. *Cell* 64:565.

Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L. y Sharp, P. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56:549.

Cereghini, S. (1988). Detection and characterization of DNA-binding proteins by in vitro approaches: Practical Course. Institut Pasteur, Biologie Moleculaire.

Chen, S.L., y Mounts, P. (1990). Transforming activity of E5a protein of human papillomavirus type 6 in NIH 3T3 and C127 cells. *J. Virol* 64:3226.

Chong, T., Chan, W.K., y Bernard, H.U. (1990). Transcriptional activation of human papillomavirus 16 by nuclear factor I, AP1, steroid receptors and a possibly novel transcription factor, PVF: a model for the composition of genital papillomavirus enhancers. *Nucleic Acids Res.* 18: 465.

Chong, T., Apt, D., Gloss, B., Isa, M., y Bernard, H.U. (1991). The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF-1 and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J. Virol.* 65:5933.

Cole, S. T., y Danos, O. (1987). Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. *J. Mol. Biol.* 193:599.

Corden, J.L. (1990). Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 15:383.

Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore. D. (1990). Gene control and the molecular biology of development in eukaryotes. En: *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books. New York, N.Y. Pp 391.

Dartmann, K., Schwarz, E., Gissmann, L., y zur Hausen, H. (1986). The nucleotide sequence genome organization of human papillomavirus type 11. *Virology* 151.

Dent, C.L., McIndoe, G.A.J. y Latchman, D.S. (1991). The constitutively expressed octamer binding protein OTF-1 and a novel octamer binding protein expressed specifically in cervical cells bind to an octamer-related sequence in the human papillomavirus 16 enhancer. *Nucleic Acids Res.* 19:4531.

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

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

Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K., y Harlow, E. (1989). The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243:934.

Engel, L.W., Heilman, C.A. y Howley, P.M. (1983). Transcriptional organization of the bovine papillomavirus type 1. *J. Virol.* 47:516.

Finney, M., Ruvkun, G. y Horvitz, R.H. (1988). The *C. elegans* cell lineage and differentiation gene *unc-86* encodes a protein with a homeodomain and extended similarity with transcription factors. *Cell* 55:757.

Fletcher, C., Heintz, N., y Roeder, R.G. (1987). Purification and characterization of OTF-1, a transcription factor regulating cell cycle expression of a human histone H2B gene. *Cell* 51:773.

Fromental, C., Kanno, M., Nomiyama, H. y Chambon, P. (1988). Cooperativity and hierarchical levels of functional organization in the SV40 enhancer. *Cell* 54:943.

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

García-Carrancá, A., Alvarez-Salas, L., Bravo, C., Yaniv, M. y Gariglio, P. (1989). A nuclear factor from epithelial cells binds to conserved "TTGGCTT" motifs on the long control region of human papillomavirus type 18 (HPV-18). 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. y Saucedo, R. (1987). Human papillomavirus DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine cervix carcinoma. *Cancer Cells.* 5:343.

Garner, M. M. y 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. *Nucleic Acids Res.* 9:3047.

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

Gehring, W.J. (1987). Homeoboxes in the study of development. *Scienza* 236:1235.

Giri, I. y Danós, O. (1986). Papillomavirus genomes: from sequence data to biological properties. *Trends Genet.* 2:227.

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

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Goding, C.R. y O'Hare, P. (1989). Herpes simplex virus Vmw65-octamer binding protein interaction: a paradigm for combinatorial control of transcription. *Virology* 173:363.

Guido, M.C. (1990). Análisis funcional de elementos reguladores de la transcripción temprana en el papilomavirus humano tipo 18 (HPV-18). Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Guido, M.C., Zamorano, R., Garrido-Guerrero, E., Gariglio, P. y García-Carrancá, A. (1992). Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product. *J. General Virology* 73:1395.

Herr, W., Sturm, R.A., Clerc, R.G., Corcoran, L.M., Baltimore, D., Sharp, P.A., Ingraham, H.A., Rosenfeld, M.G., Finney, M., Ruvkun, G., and Horvitz, H.R. (1988). The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1 and Caenorhabditis elegans unc-86 gene products. *Genes Develop.* 2:1513.

Hirochika, H., Hirochika, R., Broker, T.R. y Chow, L.T. (1988). Functional mapping of the human papillomavirus type 11 transcriptional enhancer and its interaction with the transacting E2 protein. *Genes Develop.* 2:54.

Hoey, T., y Levine, M. (1988). Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature* 322:858.

Hoppe-Sleyer, F., Butz, K., y zur Hausen, H. (1991). Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor oct-1. *J. Virol* 65:5613.

Ingraham, H. A., Chen, R., Mangalam, H.J., Elsholtz, H.P., Flynn, S.E., Lin, C.R., Simmons, D.M., Swanson, L. y Rosenfeld, M.G. (1988). A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55:519.

Johnson, P.F., y McKnight, S.L. (1989). Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 58:799.

Kemler, I., Bucher, E., Seipel, K., Muller-Immergluck, M. M., y Schaffner, W. (1991) Promoters with the octamer DNA motif (ATGCAAAT) can be ubiquitous or cell type-specific depending on binding affinity of the octamer site and oct-factor concentration. *Nucleic Acids Res.* 19:237.

Kryszke, M.-H., Piette, J., y Yaniv, M. (1987). Induction of a factor that binds to the polyoma virus A enhancer on differentiation of embryonal carcinoma cells. *Nature* 328:254.

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

Levine, M. y Hoey, T. (1988). Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell* 55:537.

Lewin, B. (1990). Building the transcription complex. *En: Genes IV*. Cell Press, Cambridge, Mass. Pp 543-577.

Liao, S.M., Taylor, I.C.A. y Young, R.A. (1991). RNA polymerase II carboxy-terminal domain contributes to the response to multiple acidic activators in vitro. *Genes Develop.* 5:2431.

Mack, D., y Laimins, L.A. (1991). A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP-1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:9102.

Martin, P., Vass, W.C., Schiller, J.T., Lowy, D.R. y Velu, T.J. (1989). The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1 receptors. *Cell* 59:21.

Massing, A.M. y Epstein, W.L. (1963). Natural history of warts: a two-year study. *Arch. Dermatol.* 87:306.

Mattaj, I.W., Lienhard, S., Jiricny, J. y DeRobertis, E.M. (1985). An enhancer-like sequence within the *Xenopus* U2 gene promoter facilitates the formation of stable transcription complexes. *Nature* 316:163.

Matthews, R.E.F. (1982). Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the international committee on taxonomy of viruses. *J.N.C.I.* 79:671.

Mitchell, P.J. y Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245:371.

Munger, K., Phelps, W.C., Bubb, V., Howley, P.M. y Schlegel, R. (1989a). 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.

Munger, K., Werness, B.A., Dyson, N., Phelps, W.C., Harlow, E. y Howley, P.M. (1989b). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8:4099.

Murphy, S., Moorefield, B. y Pieler, T. (1989). Common mechanisms of promoter recognition by RNA polymerases II and III. *Trends Gen.* 5:122.

Nasseri, M., Wettstein, F.O. y Stevens, J.G. (1982). Two colinear and spliced viral transcripts are present in non-virus-producing benign and malignant neoplasms induced by the Shope (rabbit) papillomavirus. *J. Virol.* 44:263.

Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., y Hamada, H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60:461.

Ondek, B., Gloss, L., y Herr, W. (1988). The SV40 enhancer contains two distinct levels of organization. *Nature* 333:40.

O'Neill, E.A. y Kelly, T.J. (1988). Purification and characterization of nuclear factor III (origin recognition protein C), a sequence specific DNA binding protein required for efficient initiation of adenovirus DNA replication. *J. Biol Chem.* 263:931.

Orth, G., Favre, M., Breitburd, F., Croissant, O., Jablonska, S., Obalek, S., Jarzabek-Chorzelska, M. y Rzeska, G. (1980). Epidermodysplasia verruciformis: a model for the role of papillomaviruses in human cancer. En: *Viruses in naturally occurring cancers* (M. Essex, G. Todaro y H. zur Hausen, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. Pp 259-264.

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

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

Pfister, H. (1984). Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 99:111.

Pfister, H. (1987). Human papillomaviruses and genital cancer. *Adv. Cancer Res.* 48:113

Pfister, H. (1990). General introduction to papillomaviruses. En: *Papillomaviruses and human cancer.* CRC Press. Pp 2-7.

Phelps, W.C. y Howley, P.M. (1987). Transcriptional transactivation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product. *J. Virol.* 61:1630.

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

Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335:683.

Ptashne, M. y Gann, A.F. (1990). Activators and targets. *Nature* 346:329.

Roberts, S.B., Segil, N., y Heintz, N. (1991). Differential phosphorylation of the transcription factor Oct1 during the cell cycle. *Science* 253:1022.

Roggenbuck, B., Mose Larsen, P., Fey, S.J., Bartsch, D., Gissman, L. y Schwarz, E. (1991). Human papillomavirus type 18 E6*, E6, and E7 protein synthesis in cell-free translation systems and comparison of E6 and E7 in vitro translation products to proteins immunoprecipitated from human epithelial cells. *J. Virol.* 65:5068.

Rulison, R.H. (1942). Warts: a statistical study of nine hundred twenty-one cases. *Arch. Dermatol. Syphilol.* 46:66.

Saxon, P.J., Srivivatsan, E.S., y Stanbridge, E.J. (1986). Introduction of human chromosome 11 via microcell transfer controls tumorigenic expression of HeLa cells. *EMBO J.* 5:3461.

Schaffner, W. (1989). How do different transcription factors binding the same DNA sequence sort out their jobs? *Trends Genet.* 5:37.

Scheidereit, C., Heguy A., y Roeder, R.G. (1987). Identification and purification of a human lymphoid-specific octamer-binding protein (OTF-2) that activates transcription of an immunoglobulin promoter in vitro. *Cell* 51:783.

Scholer, H.R., Rupper, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., y Gruss, P. (1990). New type of POU domain in germ line-specific protein oct-4. *Nature* 344:435.

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

Scott, M.P. y Carroll, S.B. (1987). The segmentation and homeotic gene network in early *Drosophila* development. *Cell* 51:689.

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

Shapiro, D.J., Sharp, P.A., Wahli, W.W. y Keller, M. 1988. A high efficiency HeLa cell nuclear transcription extract. *DNA* 7:47.

Sousa, R., Dostatni, N. y Yaniv, M. (1990). Control of papillomavirus gene expression. *Biochem. Biophys. Acta* 1032:19.

Sturm, R.A. y Herr, W. (1988). The POU domain is a bipartite DNA-binding structure. *Nature* 336:601.

Swift, F.V., Bhat, K., Younghusband, H.B., y Hamada, H. (1987) Characterization of a cell type-specific enhancer found in the human papilloma virus type 18 genome. *EMBO J.* 6:1339.

Tanaka, M., y Herr, W. (1990). Differential transcriptional activation by oct-1 and oct-2: interdependent activation domains induce oct-2 phosphorylation. *Cell* 60:375.

Tanaka, M., Lai, J.S. y Herr, W. (1992). Promoter-selective activation domains in Oct-1 and Oct-2 direct differential activation of an snRNA and mRNA promoter. *Cell* 68:755.

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

Thierry, F., Heard, J.M., Dartmann, K. y Yaniv, M. (1987b). 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.

Van Dyke, M.W., Roeder, R.G. y Swadogo, M. (1988). Physical analysis of transcription preinitiation complex assembly on a class II gene promoter. *Science* 241:1335.

Von Knebel Doeberitz, M., Oltersdorf, T., Schwarz, E. y Gissmann, L. (1988). Correlation of modified human papilloma virus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells. *Cancer Res.* 48:3780.

Werness, B.A., Levine, A.J. y Howley, P.M. (1990). Association of human papillomaviruses types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248:76

Woychik, N.A. y Young, R.A. (1990). RNA polymerase II: subunit structure and function. *Trends Biochem. Sci.* 15: 347-351.

Zur Hausen, H., Gissmann, L., y Schlehofer, J.R. (1984). Viruses in the etiology human genital cancer. *Prog. Med. Virol.* 30:170.

Zur Hausen, H. y Schneider, A. (1987). The role of papillomaviruses in human anogenital cancer. En: *The Papovaviridae, Vol. 2: The Papillomaviruses* (Salzman, N.P. y Howley, P., eds.). Plenum Press, NY. Pp 245-263.

Zur Hausen, H. (1987b). Papillomaviruses in human cancer. *Cancer* 59:1692.

ABREVIATURAS

APS.- Persulfato de Amonio

CaCU.- Cáncer cérvico-uterino

DNA.- Acido 2'-desoxirribonucleico

DTT.- Dithiothreitol

EDTA.- Acido etilén-diaminotetraacético

Hepes.- N-2 hidroxietil-piperazina-N'-2-ácido etano sulfónico

HPV.- Papilomavirus humano

LCR.- Región larga de control

ORF.- Marco de lectura abierto

NP-40.- Nonidet-P-40

PMSF.- Fluoruro de fenilmetil sulfonilo.

TBE.- Tris-Boratos-EDTA

TE.- Tris-EDTA

Tris.- Hidroximetil-aminometano