



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

"ESTUDIO DE LA PARTICIPACION DEL PRODUCTO
DEL ANTI-ONCOGEN RB EN LA TRANSCRIPCION
DE GENES CELULARES Y VIRALES"

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 :

MARIA CRISTINA CASTAÑEDA PATLAN

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. J. EFRAIN GARRIDO GUERRERO

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MEX. 1994



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.

DEDICATORIA

A mis padres **Mucio** y **Tere**, por su apoyo incondicional en el andar de mi profesión, por su valioso amor y comprensión que me han permitido creer en lo que soy. Gracias toda la vida.

A mis hermanos **Tere**, **Marce**, **Alberto** y **César** por compartir nuestra niñez en las buenas y en las malas; por continuar en nuestro camino con los frutos futuros: **Anaíris**, **Ivonne**, ...

A **Miguel** por la libertad de pensar y de sentir hacia mí. Porque estaré contigo en todo momento.

A **Efraín** por confiar en mí, por sus aciertos consejos en la vida y en nuestra profesión.

AGRADECIMIENTOS

A los Jefes de los laboratorios donde se realizó el trabajo de tesis: Dr. Patricio Gariglio, Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN y Dr. Rafael Jiménez, Lab. de Inmunología UMF., Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM .

A J. Efraín Garrido Guerrero por su valiosa colaboración en la dirección y asesoría del trabajo de tesis, en la elaboración del proyecto de tesis, en las asesorías continuas de los métodos y técnicas aplicadas en el trabajo experimental, en las observaciones del trabajo escrito, en la organización y presentación de los seminarios, en el apoyo económico que desinteresadamente brindó durante la tesis, en su entusiasmo para continuar con la verdadera investigación científica.

A mis amigos de diferentes generaciones, con los que he compartido momentos agradables y difíciles de la vida y que aun en la distancia logramos conservar nuestra amistad: Sara Avila, Raúl Chávez, Rene Villegas, Eva Rodriguez, Rosario Chalte, Graciela Arroyo, Irene Goyenechea, Ela Martínez, Andrés Cruz y Bertha Pérez.

A mis amigos y compañeros de los laboratorios con quienes compartí momentos importantes y con los que aprendí que la investigación es un estilo de vida: Julia, Rafael, Efraín, Salvador, Enrique, Rocio, Pedro, Elba, Adriana AA, Adriana, Araceli, Marco, Mauricio, Luis, Esther, Tere, Irma, Genaro, Alfonso.

A Gerardo y Lupita por su ayuda en diferentes actividades.

A Luis Jave por su especial colaboración en la realización de los mapas y gráficos de la tesis.

A la música cualquiera que sea su origen, siga teniendo fieles admiradores.

Un agradecimiento especial a Dios, a mi Patria y a la vida misma porque me permiten esforzarme por ser feliz.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
GENES SUPRESORES DE TUMOR:.....	10
El gen del tumor de Wilms (WT-1).....	10
El gen de Neurofibromatosis (NF-1).....	11
El gen de Poliposis Adenomatosa de Colon (APC).....	12
El gen DCC.....	13
El gen p53.....	14
El gen de Retinoblastoma (RB).....	16
ANTECEDENTES.....	21
CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DEL PRODUCTO	
DEL GEN RB (p105 ^{RB}).....	21
p105 ^{RB} Y CICLO CELULAR.....	22
FOSFORILACION DE p105 ^{RB}	23
INTERACCION CON PROTEINAS VIRALES.....	27
p105 ^{RB} Y MECANISMOS DE ACCION.....	31
INTERACCION CON FACTORES DE TRANSCRIPCION.....	32
OBJETIVO GENERAL.....	35
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	35
METODOLOGIA.....	37
CARACTERIZACION DEL ADN.....	37
Digestión del ADN con enzimas de restricción.....	37
Electroforesis en geles de agarosa.....	40
Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles.....	40
LINEAS CELULARES.....	43
Pasaje y mantenimiento de líneas celulares.....	43
PLASMIDOS.....	44
A. Plásmidos del grupo 1.....	44
B. Plásmidos del grupo 2.....	45
Preparación de plásmidos.....	47
A. Bacterias competentes.....	47
B. Transformación de bacterias <u>Escherichia coli</u>	48
TRANSFECCION Y ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	49
Ensayos de transfección transitoria.....	50
Obtención de extractos celulares.....	53
Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	54
Ensayo de actividad de β -galactosidasa.....	54
Ensayo de actividad de cloranfenicol acetil-transferasa.....	55

RESULTADOS.....	58
CARACTERIZACION DEL PLASMIDO pCMV-RB.S.....	58
ENSAYOS DE TRANSFECCION TRANSITORIA Y ENSAYOS ENZIMATICOS... 67	
A. Eficiencia de transfección.....	70
B. Efecto de pCMV-RB.S en la transcripción de genes celulares y virales.....	75
DISCUSION.....	96
CONCLUSIONES.....	110
GLOSARIO.....	112
BIBLIOGRAFIA.....	117

RESUMEN

El gen de retinoblastoma (RB) es un anti-oncogen o gen supresor de tumor que actúa como regulador negativo de la proliferación celular.

El producto de RB, p105^{RB}, es una fosfoproteína que tiene afinidad al ADN y cuya actividad funcional es determinada por su nivel de fosforilación. La forma desfosforilada está involucrada en restringir a la célula en la fase G1 del ciclo celular, mientras que las formas fosforiladas inducen la transición a la fase S.

La participación de p105^{RB} en el control de la transcripción se debe a la formación de un complejo con el factor transcripcional E2F que se une a la secuencia consenso TTTGGCGG. Este factor es esencial para la transcripción de genes que regulan el ciclo celular y la síntesis de ADN.

Los productos de oncogenes virales como E1A de adenovirus, el antígeno T grande de SV40 y E7 de papilomavirus humano tipos 6b, 11, 16 y 18, interactúan físicamente con p105^{RB}. La región de interacción de estas proteínas virales con p105^{RB} es esencial para su actividad de transformación celular.

En el desarrollo de este trabajo, inicialmente se caracterizó el plásmido pCMV-RB.S mediante digestiones con enzimas de restricción, determinando el tamaño del ADNc del gen RB clonado dentro del vector de expresión pCMV4-RS, obteniendo el mapa físico de pCMV-RB.S. Este plásmido expresó eficientemente el producto del gen RB en células de mamífero, lo cual fue importante en los ensayos de actividad "in vivo".

Mediante ensayos de cotransfección transitoria en la línea celular C-33A, con construcciones plasmídicas que poseen promotores clonados frente al gen reportero CAT (Cloranfenicol acetil-transferasa), se analizó la participación del producto de RB en la regulación de la transcripción de los genes celulares (c-myc humano y albúmina de rata) y virales (Temprano de SV40, TK de HSV y HPV-18).

De esta manera, se determinó que p105^{RB} (pCMV-RB.S) reprime la actividad transcripcional de los promotores celulares estudiados, c-myc de humano y albúmina de rata. El mecanismo de regulación por p105^{RB} que se propone es mediante la presencia de sitios E2F en el promotor de estos genes.

Por otra parte p105^{RB} no afecta la actividad transcripcional del promotor temprano de SV40 ni de la timidina cinasa del virus herpes simple, TK-HSV (pTKm), mientras que reprime la actividad transcripcional de la región control (LCR) del papilomavirus humano tipo 18 (p18/42).

En la LCR de HPV-18 se localizaron dos posibles sitios de reconocimiento al factor de transcripción E2F en los nucleótidos 7568 y 7580, lo que sugiere que el mecanismo de represión por p105^{RB} es por E2F.

Uno de los elementos regulatorios importantes para la expresión de los genes con actividad oncogénica (E6 y E7) de Papilomavirus, es AP-1. Para analizar la posible participación

de este factor en la regulación por p105^{RB} en HPV-18, se utilizó una construcción en la que se clonó el sitio AP-1 de la LCR de HPV-18 (pAP1), y se sometió a la presencia de p105^{RB}, demostrándose que la actividad transcripcional de esta construcción es reprimida. Cuando se utilizó el plásmido pSG5c-FOS, que expresa el gen c-fos (uno de los componentes del complejo proteico AP-1), se recuperó la actividad transcripcional de esta construcción.

Esto sugiere otro mecanismo de regulación de p105^{RB} sobre HPV-18: la proteína Rb reprime la expresión de c-fos endógeno e impide a c-jun formar el complejo proteico AP-1, disminuyendo así su actividad transcripcional.

El conocimiento de los mecanismos moleculares de represión por p105^{RB} permite entender su función en la regulación de la proliferación celular y comprender que la inactivación del gen RB o de su producto p105^{RB}, es un evento importante durante el proceso de carcinogénesis.

INTRODUCCION

El cáncer es en este momento uno de los objetivos de investigación más importantes tanto para la Medicina moderna como para la Biología Molecular.

La relevancia de tales investigaciones se debe a que el cáncer ocupa uno de los primeros cinco lugares como causa de defunción en muchos países. En países subdesarrollados, aproximadamente el 10% de muertes es debida al cáncer (Fernández, 1983), y se espera que este porcentaje se incremente debido a la erradicación de algunas enfermedades infecciosas y al aumento del promedio de vida de la población.

En términos biológicos el cáncer es la manifestación de alteraciones en los mecanismos básicos de control de la regulación metabólica, división y diferenciación celular en los organismos superiores (Bravo, 1990).

El cáncer se origina a través de la acumulación de una serie de eventos resultado de procesos múltiples que involucran daños al ADN, principalmente de genes que poseen un papel vital en la regulación de señales positivas o negativas en el crecimiento celular (Lee, 1993).

Los factores ambientales son también parte importante del proceso de carcinogénesis, ya que la mayoría de los agentes carcinogénicos físicos o químicos, endógenos o exógenos, inducen mutaciones en el ADN (Weinberg, 1984).

Las alteraciones que pueden afectar al genoma incluyen a las

mutaciones, pérdida cromosómica, rearrreglos en la secuencias de ADN e integración de secuencias virales, etc. Otros cambios incluyen la asociación estable de proteínas específicas con el ADN modificando la expresión de algunos genes celulares (Knudson, 1991).

Actualmente el conocimiento de la Biología Molecular de los virus que inducen tumores en animales y de las técnicas de Ingeniería Genética, han conducido a la identificación de los genes que contribuyen a la tumorigénesis: los oncogenes y los genes supresores de tumor. Este avance permite comprender algunos de los mecanismos por los cuales una célula normal se vuelve cancerosa y se multiplica en forma descontrolada.

Los oncogenes son versiones alteradas de genes normales, conocidos como proto-oncogenes, cuyas funciones son importantes dentro del crecimiento y proliferación celular (Weinberg, 1984).

Actualmente se conocen mas de 30 proto-oncogenes celulares; las proteínas codificadas por estos proto-oncogenes realizan funciones específicas tales como factores de crecimiento (c-sis), receptores a factores de crecimiento (c-erbB, erbB2, c-fms), transductores intracelulares de señal (c-ras, gsp, c-abl, c-mos) y factores de transcripción (c-myc, c-fos, c-jun, c-erbA) (Lewin, 1994).

Son varios los mecanismos por los cuales los proto-oncogenes se transforman en oncogenes (Adame y Gariglio, 1989; Cooper, 1992) entre los cuales se pueden mencionar los siguientes:

- a) Amplificación génica: Comúnmente en las células

tumorales, se encuentran múltiples copias de un gen y en consecuencia, existe un incremento en los niveles de ARNm así como de la proteína. Por ejemplo, se ha observado que el gen c-myc está amplificado en muchos tumores y líneas tumorales humanas, incluyendo leucemias, cáncer mamario y cáncer cérvico uterino (CaCU) (Nowell et al., 1983; Bonilla et al., 1988; Ocadiz et al., 1987, respectivamente)

b) Rearreglo génico: Las células cancerosas frecuentemente presentan translocaciones cromosómicas y en consecuencia, la pérdida de la regulación normal del gen afectado. Un ejemplo claro es el linfoma de Burkitt, donde el gen c-myc se transloca de su locus normal en el cromosoma 8 a uno de los loci del cromosoma 14 donde se localiza el gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (Hayday et al., 1984). Por otra parte, en leucemia mieloide crónica, ocurre la recombinación entre el proto-oncogen abl y el gen bcr, codificando así una proteína de fusión estructuralmente diferente (Shtivelman et al., 1985).

c) Mutaciones puntuales: Estas alteraciones pueden ser el resultado de la interacción con algún carcinógeno. Por ejemplo, la substitución de un solo aminoácido en una posición crítica del sitio catalítico de GTPasa (generalmente en el aminoácido 12), hace que la proteína ras permanezca funcional y constitutivamente activa (Reddy et al., 1982).

d) Participación viral: Los virus desempeñan un papel relevante dentro de la carcinogénesis en combinación con otros eventos. Se conocen algunos de los aspectos moleculares de los

virus claramente asociados a cáncer, en particular, la relación entre HTLV-I con la leucemia (Poiesz et al., 1980), el virus de la hepatitis B con el cáncer hepático (Ganem y Varmus, 1987), el virus Epstein-Barr con el linfoma de Burkitt (Facer y Playfair, 1989) y algunos papilomavirus humanos (HPVs) con el cáncer cérvico uterino (zur Hausen, 1977).

La actividad de los oncogenes conducen a la célula a proliferar y a adquirir otras características de las células transformadas (Hu et al., 1990), tales como la inmortalización, liberación de factores de crecimiento transformantes (TGF), pérdida de la dependencia de anclaje para el crecimiento, cambio de la morfología celular, entre otros.

Es evidente que los oncogenes celulares han atraído la atención para entender el funcionamiento de la célula y los orígenes moleculares del cáncer. Sin embargo, a fines de la década pasada, se descubrió una segunda clase de genes involucrados en estos mecanismos, los genes supresores de tumor, anti-oncogenes u oncogenes recesivos, que promueven la formación de un tumor cuando existe una pérdida o inactivación de éstos o de sus productos génicos (Hu et al., 1990; Weinberg, 1991).

Hay evidencias que sugieren que la función normal de estos genes es prevenir o suprimir la oncogénesis, además de que juegan un papel en la regulación negativa de la proliferación celular (Stanbridge y Nowell, 1990; Marshall, 1991).

La pérdida de anti-oncogenes se revela en varios tipos de tumor por aberraciones cromosómicas, como la pérdida de un

segmento específico de algún cromosoma, o por una mutación puntual (Weinberg, 1988). De esta manera, la inactivación de estos genes está implicada en la generación de diferentes tumores humanos.

Existen tres evidencias que apoyan la idea de que la transformación neoplásica involucra alteraciones de los genes supresores de tumor: 1) Híbridos celulares, 2) Cáncer familiar y 3) Pérdida de heterocigosis en tumores.

1. Híbridos celulares. Los híbridos celulares generados por fusión entre células tumorigénicas y no tumorigénicas, no originan tumores cuando se inyectan a un hospedero apropiado, aun expresando las características de un fenotipo transformante en cultivo. Este fenómeno de supresión que se observa en una variedad de combinaciones de células tumorales y normales, puede deberse a cambios genéticos recesivos, responsables del fenotipo tumoral y complementados por los alelos normales (Marshall, 1991; Levine, 1993).

En híbridos celulares también ha sido posible identificar experimentalmente cual es la localización cromosómica de algunos de los genes supresores de tumor por los siguientes métodos: a) Análisis citogenéticos, b) Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) y c) Experimentos de transferencia usando microcélulas (en las cuales llevan o transfieren un solo cromosoma derivado de una célula normal a una célula cancerosa). Estos resultados revelaron esencialmente que estos genes se localizan en diferentes cromosomas (Tabla 1), además de demostrar

REGION CROMOSOMICA	LINEA CELULAR TUMORIGENICA
11p13 y 11p15 (WT-1)	Carcinoma cervical (HeLa) Carcinoma cervical (SiHa) Tumor de Wilms Carcinoma de mama
13q (RB)	Retinoblastoma Carcinoma de próstata Carcinoma de vejiga
5q (APC), 17p (p53)	Carcinoma colo-rectal (SW480 y COKFu) Neurofibromatosis (NGP)
17q (NF-1)	Carcinoma colo-rectal Neurofibromatosis

Tabla 1. Regiones cromosómicas asociadas a genes supresores o anti-oncogenes en diferentes líneas celulares derivadas de tumor, las cuales se establecieron por el método de fusión microcelular, por análisis citogenéticos o RFLP.

por transferencia de un cromosoma, que pueden suprimir la formación de un tumor dependiendo del origen del tejido (Marshall, 1991; Levine, 1993; Anderson y Stanbridge, 1993).

2. Cáncer familiar. En general, la proporción de este tipo de cánceres es bastante bajo. Sin embargo, en ciertas ocasiones tales como retinoblastoma, la forma heredable constituye el 40% de los casos.

De Mars (1970) y Knudson (1971) sugieren que la forma autosómica dominante en la herencia de cáncer familiar es más susceptible a mutaciones recesivas (una heredada y otra adquirida) debido a la alteración de los dos alelos silvestres y en consecuencia, a la pérdida de función a nivel celular. Lo anterior ha originado estudios sobre enfermedades con un patrón hereditario tales como retinoblastoma, neurofibromatosis, tumor de Wilms, poliposis adenomatosa familiar (FAP) y múltiples neoplasias endócrinas, cuyo objetivo principal ha sido aislar el gen responsable de estos cánceres familiares (Marshall, 1991).

3. Pérdida de heterocigosis. En formas heredables, la ausencia del material genético heredado de uno de los padres por mutación recesiva causada por la pérdida de un fragmento de un cromosoma, hace imposible la heterocigosis de determinado locus, lo cual puede ser indicador de la presencia de un gen supresor de tumor tanto en formas familiares como en cánceres esporádicos (Ponder, 1988).

GENES SUPRESORES DE TUMOR

El gen del tumor de Wilms (WT-1)

El tumor de Wilms es un nefroblastoma que afecta aproximadamente uno de cada 10,000 niños. Puede presentarse en las formas esporádica unilateral (+95%) o heredada unilateral y bilateral (Anderson y Stanbridge, 1993).

En diferentes tumores de este tipo, en un caso familiar bilateral asociado al síndrome de WARG, se encontró deletada la banda 13p en el cromosoma 11 (Riccardi et al., 1980); los asociados al síndrome de Beckwith-Wiedemann revelan la pérdida de heterocigosis en la región 11p15.5 (Haber y Housman, 1991); sin embargo, en otro tumor de Wilms no involucra ninguno de estos loci lo que sugiere que al menos tres genes distintos estén implicados en el origen de este tumor.

Las mutaciones más comunes en el gen WT-1 implican la pérdida total de ambos alelos, aunque pequeñas deleciones son observadas en las formas heredables.

Housman y col. aislaron el gen denominado WT-1, de la región 11p13. Este gen comprende 10 exones y es transcrito a un ARNm de aproximadamente 3 Kilobases (Kb) con sitios de procesamiento alternativos (Call et al., 1990).

El gen codifica para una proteína de 345 aminoácidos, la cual contiene cuatro dominios conocidos como "dedos de zinc" y una región rica en prolina y glutamina (Gessler et al., 1990). Con base en estas características se sugiere que esta proteína

posee una actividad de regulador transcripcional. Lo anterior se apoya en el hecho de que dos proteínas de mamíferos, EGR1 y EGR2, las cuales se unen al ADN en una secuencia consenso y regulan el crecimiento, muestran homología con la proteína WT-1 (Anderson y Stanbridge, 1993).

El gen WT-1 se expresa en niveles altos en riñón fetal, mientras que en riñón adulto se encuentran niveles bajos. Además se expresa en gónadas, bazo y útero, sugiriendo que es necesario para el desarrollo específico de diferentes tejidos (Gessler et al., 1990).

El gen de Neurofibromatosis (NF-1)

La enfermedad de Neurofibromatosis tipo I o Von Recklinghausen ocurre en aproximadamente 1 de cada 3500 individuos. Se presenta en forma heredable y en forma esporádica con una alta tasa de mutación (1×10^{-4}) (Eng y Ponder, 1993).

Esta enfermedad, que se caracteriza por lesiones en piel, en ojos y en el sistema nervioso central (Riccardi, 1981), se asocia con otros cánceres como leucemias, osteosarcomas, tumor de Wilms, entre otros (Sorenson et al., 1986).

El locus que codifica para el gen de neurofibromatosis (NF-1) se localiza en el cromosoma 17 banda q11.2 (Collins et al., 1989; Wallace et al., 1990). Cawthon y col. (1990), clonaron este gen de 30 Kb, el cual contiene 49 exones que codifican para una proteína de 2818 aminoácidos. Esta proteína tiene un dominio altamente homólogo al de las proteínas activadoras de GTPasa

(GAP) de mamíferos (Xu et al., 1990), que regulan y pueden actuar como efectores del proto-oncogen c-ras, al igual que las proteínas IRA1 e IRA2 de levadura (Buchberg et al., 1990), cuya función es estimular la actividad de GTPasa de la proteína ras de levadura.

Con base en estas homologías se sugiere que la proteína NF-1 actúa como transductor de señales involucrada en proliferación celular.

El gen NF-1 se expresa en todos los tejidos, aunque en los neurofibromas el gen se encuentra alterado por mutaciones puntuales o deleciones (Wallace et al., 1990).

El gen de la Poliposis Adenomatosa de Colón (APC)

La Poliposis adenomatosa familiar de colón (FAP) ocurre en uno de cada 10,000 individuos en Estados Unidos, Europa y Japón (Levine, 1993). Esta enfermedad, se presenta durante la segunda y tercera década de vida y se caracteriza por la presencia de miles de polipos adenomatosos en el colón. Un pequeño porcentaje de estos polipos pueden desarrollar carcinomas en colón, siendo más severos en pacientes no tratados clínicamente (Eng y Ponder, 1993).

El gen APC asociado a FAP se localiza en el cromosoma 5q21. Este gen es de aproximadamente 8.4 Kb y contiene 15 exones (Bodmer et al., 1987). Codifica para una proteína de 2843 aminoácidos, que por secuencia primaria no sugiere alguna función, aunque presenta una pequeña homología con las proteínas

IRA1 e IRA2 de levadura, y con una región de unión a proteína de un receptor acetil colina tipo muscarínico (Grodén et al., 1991).

El ARNm del gen APC es detectado en una amplia variedad de células y tejidos. Un aspecto relevante es el hecho de que, dependiendo la localización de las mutaciones del gen en la forma heredable, parece dictar el número de polipos formados (Nagase et al., 1992).

En carcinomas de colón derivados de FAP, Feron y Vogelstein (1990), han encontrado mutaciones de otros genes como p53, DCC, y K-ras lo que sugiere que éstos son importantes en el desarrollo carcinogénico en el cual participan.

El gen DCC

En cáncer colo-rectal y en adenomas benignos es común encontrar la pérdida de la región cromosómica 18q en un 70% y 50%, respectivamente. Una serie inicial de alteraciones genéticas como mutaciones puntuales en APC y Ki-ras, y posteriormente en p53, contribuyen a la progresión de cánceres de colo-rectal (Vogelstein et al., 1988).

Fearon y col. (1990) localizaron el gen DCC (por Deleted in colorectal carcinomas) en el cromosoma 18 en la banda q21. Este gen es muy grande ya que codifica para un ARNm de 10-12 Kb, que origina una proteína la cual tiene homología con una de las proteínas de adhesión celular neural (N-CAM). La proteína DCC posee un dominio transmembranal, algunos dominios extracelulares

del tipo de las inmunoglobulinas y motivos repetidos de fibronectina tipo II. (Tanaka et al., 1991). Este tipo de estructuras sugieren que la proteína DCC interviene en adhesión y/o invasión metastásica de las células.

La expresión del gen DCC se encuentra en niveles bajos, en una amplia variedad de células y tipos de tejidos, incluyendo al tejido del colón. No obstante, se encuentra reducido o ausente en más de 85% de líneas celulares colo-rectales (Fearon, 1992).

El gen p53

El gen p53 comprende 20 Kb y se localiza en el cromosoma 17 banda p13.1 del genoma humano. Contiene 11 exones y su ARNm es expresado en todas las células del cuerpo, presentándose altos niveles en bazo y timo (Oren, 1985).

La proteína llamada p53, comprende 393 aminoácidos en humano. Es una fosfoproteína nuclear que posee tres dominios estructurales: 1) Una región altamente acídica en el extremo amino terminal, 2) Una región rica en residuos de prolinas altamente hidrofóbica y 3) En la parte carboxilo terminal contiene aminoácidos básicos que le confieren la capacidad de unión al ADN y de oligomerización (ya que esta proteína funcional forma tetrameros), además contiene su principal señal para transporte al núcleo (Shaulsky et al., 1991).

En general la proteína p53 tiene una vida media corta de aproximadamente 20 minutos. Normalmente, suprime el crecimiento de células tumorales e inhibe la transformación reduciendo

eficientemente la cooperación entre oncogenes tales como c-ras y c-myc o E1A (Finlay et al., 1989). Sin embargo, la proteína p53 mutada actúa como un oncogen y coopera con ras activado en la transformación de células en cultivo (Eliyahu et al., 1989). Al parecer, la estabilidad de la proteína p53 mutada es mayor que la de la silvestre, ya que tiene un promedio de vida en horas.

Se sugiere que la proteína p53 actúa supervisando o controlando negativamente el ciclo celular, para permitir la reparación de daños al ADN o errores en las señales de la división celular, ya que se encuentran niveles elevados de esta proteína antes de la fase S del ciclo celular en células irradiadas o mutagenizadas (Lane, 1992). Este fenómeno no ocurre en células en las que p53 está mutado, fijandose así las mutaciones y llevando a la célula hacia transformación o muerte celular.

Recientes evidencias sugieren que la función de p53 es actuar como un factor de transcripción (Fields y Jang, 1990). Se ha observado que p53 silvestre regula positivamente la transcripción de genes que contienen en su promotor una secuencia consenso (CTGCCTCT) que le permite la unión de esta proteína al ADN (Zambetti et al., 1992). Por otra parte, se ha determinado la represión transcripcional de algunos genes mediada por su interacción con factores que se unen a la caja TATA.

Gannon y Lane (1987), demostraron que la replicación del virus SV40 es bloqueada por p53 normal. Esta inhibición es debida a la interacción física de p53 con la ADNpolimerasa α y con el

antígeno T grande del virus. Lo anterior apoya la idea de que p53 pueda unirse al complejo de replicación controlando el inicio de la síntesis del ADN.

La inactivación de la función de p53 puede ocurrir por diferentes mecanismos. El más frecuente es la presencia de mutaciones del gen p53, ya que se han reportado este tipo de alteraciones en una gran variedad de cánceres humanos (Marshall, 1991). La gran mayoría de estas mutaciones se localizan en regiones altamente conservadas (Levine, 1993). Otro mecanismo ocurre cuando alguna de las proteínas virales, antígeno T grande de SV40 (Lane y Crawford, 1979), E1B de adenovirus (Sarnow et al., 1982) o E6 de papilomavirus humano (HPV) tipo 16 y 18 (Werness et al., 1990), se unen a p53 e interfieren con su función (determinando su degradación en el último de los casos). Un tercer camino es la sobreexpresión de la proteína oncogénica codificada por el gen mdm-2, la cual aumenta la formación de tumor y se une a p53 (Momand et al., 1992). El cuarto mecanismo, encontrado en algunos cánceres de mama, es la localización de la proteína p53 normal en el citoplasma celular, impidiendo llevar a cabo su función en el núcleo (Shaulsky et al., 1991).

El gen de Retinoblastoma (RB)

El conocimiento sobre la existencia de los genes supresores de tumor, se inició con los estudios epidemiológicos de Knudson (1971) en tumores de retinoblastoma, así como los primeros mecanismos moleculares de tumorigénesis en formas heredables. Por

ello es el prototipo más estudiado en la categoría de los genes supresores de tumor. Retinoblastoma es un cáncer poco frecuente que afecta uno de cada 20,000 infantes (Weinberg, 1988). Sin embargo es el tumor intraocular más común de la niñez.

Knudson (1971) propuso dos posibles procedencias de los genes mutados involucrados: por herencia de un progenitor o por mutaciones somáticas (Weinberg, 1988).

En retinoblastoma familiar, los individuos afectados heredan un alelo mutante de padres afectados, ocurriendo una segunda mutación en forma somática que inactiva el alelo normal heredado del otro padre. Esta forma ocurre en un 40% de los casos en infantes de alrededor de 14 meses de edad; estos tumores son siempre bilaterales (en ambos ojos al mismo tiempo) y estos niños con frecuencia desarrollan posteriormente una segunda neoplasia, comúnmente un osteosarcoma.

En la forma esporádica (60%), se involucran dos eventos de mutación somática de los cuales, el segundo ocurre en células descendientes que recibieron la primera mutación. Los tumores se detectan en infantes de aproximadamente 30 meses de edad; son unilaterales (un solo ojo) y en estos casos por lo general, ocurre solo este tipo de cáncer.

En algunos casos de tumores de retinoblastoma ya sea unilateral o bilateral, existe una deleción de la banda q14.1 del cromosoma 13 en todas las células somáticas (Francke et al., 1978, Balaban et al., 1982), lo que sugiere la presencia del gen RB en esta región cromosómica. Este locus se localiza junto al

gen para la enzima D esterasa.

El gen de Retinoblastoma (RB) comprende aproximadamente 200 Kb y contiene 27 exones. El transcrito de ARNm es de 4.7 Kb y solo 2.7 Kb del extremo 5' codifican para una proteína, p105^{RB}, de 928 aminoácidos (Lee et al., 1987a) (Fig. 1). Es una proteína nuclear que se encuentra fosforilada o desfosforilada, dependiendo de la fase del ciclo celular, y se expresa en todos los tejidos (Friend, 1986; Lee et al., 1987b).

El gen RB se encuentra mutado o deletado en otros tipos de tumores humanos y líneas celulares establecidas a partir de ellos, que incluyen osteosarcomas (Hansen et al., 1985), sarcomas de tejido blando (Horowitz et al., 1990), carcinomas de células pequeñas de pulmón (Harbour et al., 1988), cánceres de mama (Lee et al., 1988), carcinomas de próstata (Bookstein et al., 1990a) o vejiga (Horowitz et al., 1989), algunas leucemias (Furukawa et al., 1991) y carcinomas cervicales (Scheffner et al., 1991). Lo anterior sugiere que las mutaciones del gen RB están involucradas en la oncogénesis en estos casos y que contribuyen al fenotipo maligno.

Existen diferentes tipos de lesiones que parecen estar involucradas con la inactivación del locus RB: deleciones grandes que abarcan aproximadamente el 30% del gen; alteraciones en el procesamiento del ARNm, resultado de la deleción de algún o algunos exones; mutaciones puntuales y deleciones pequeñas en el promotor (Marshall, 1991) que afectan secuencias posibles de reconocimiento a factores de transcripción.

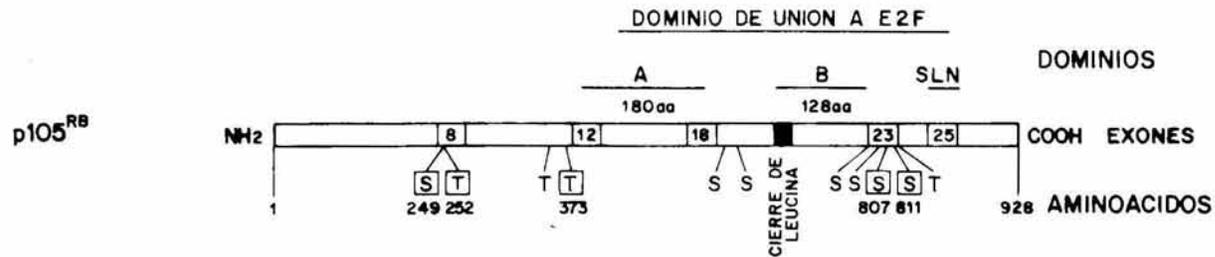
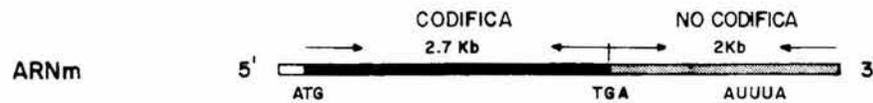
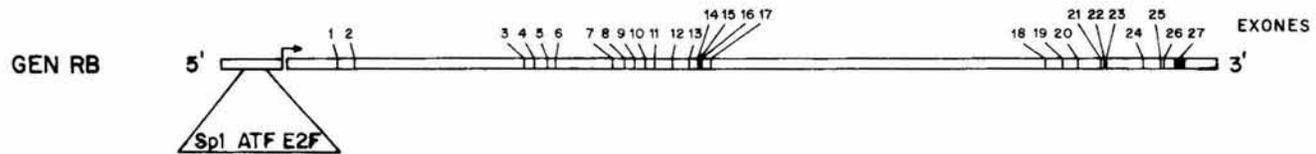


Figura 1. Estructura del gen de retinoblastoma RB, el transcrito de ARNm y de la proteína p105^{Rb}. El gen es de aproximadamente 200 Kb, contiene 27 exones (siendo el último exón el más grande, 1889 pb) y 26 intrones que abarcan de 80 a 70500 pb. En el promotor de RB existe una secuencia rica en nucleótidos GC, y carece de una caja TATA típica; este promotor mínimo posee sitios funcionalmente importantes para la unión a factores de transcripción como Sp1, ATF y E2F.

El ARNm mensajero contiene una región de 2.7 Kb que codifica para el producto del gen RB, p105^{Rb}, que está flanqueada por una secuencia corta no traducida hacia el extremo 5', y por una región larga (2 Kb) hacia el extremo 3', donde se encuentran las señales y sitios de poliadenilación (AUUUA).

La proteína Rb de 928 aminoácidos, contiene cinco sitios de reconocimiento para la cinasa p34cdc2 en los residuos de serina (S) y treonina (T). Existen dos dominios consecutivos denominados A y B (aminoácidos 393 a 572 y 646 a 772), esenciales para la unión con las proteínas oncogénicas E1A de Adenovirus, antígeno T grande de SV40 y E7 de HPV. Estos dominios se encuentran mutados o deletados en una variedad de tumores humanos y líneas celulares derivados de éstos. Los dominios A y B así como la región carboxilo terminal son necesarios para la interacción con el factor E2F. En el exón 25 está una señal de localización nuclear (SLN). La proteína posee una región estructural denominado "cierre de leucina" que se requiere para la interacción estable entre proteínas.

La inactivación del gen RB, por tanto, está asociada con la etiología de muchos tipos de cáncer humano y por consiguiente, con la progresión neoplásica, lo que clasifica a RB como un anti-oncogen, oncogen recesivo o gen supresor de tumor (Lee et al., 1988; Robbins et al., 1990). La introducción y expresión de un gen RB exógeno en líneas celulares con delección o mutaciones en el gen RB, da como resultado una inhibición significativa del crecimiento en cultivo "in vitro" y la supresión de tumor "in vivo" (Banerjee et al., 1992; Bookstein et al., 1990b).

Las características de la proteína Rb y su función son de gran relevancia para este trabajo por lo que se mencionará a continuación con mayor detalle.

ANTECEDENTES

CARACTERISTICAS DEL PRODUCTO DEL GEN RB (p105^{RB})

La proteína p105^{RB} contiene diferentes regiones importantes para su función: 1) exhibe una actividad de unión inespecífica al ADN entre los aminoácidos 612 y 928 (Lee et al., 1987b), 2) dos regiones ricas en residuos de prolina -codificadas en los exones 1 y 23- característico de algunos oncogenes nucleares, 3) dos "dedos de zinc" codificados en los exones 17-18 y 20-21, 4) cinco residuos de serina y treonina fosforilables y 5) una señal de localización nuclear en el exón 25 (Fig. 1).

Existen dos regiones de la proteína Rb necesarias para la interacción estable proteína-proteína. Estas regiones denominadas A y B (aminoácidos 393 a 572 y 646 a 772, respectivamente) son

importantes para la interacción de p105^{RB} con ciertas proteínas celulares y con proteínas de virus oncogénicos (Hu et al., 1990; Huang et al., 1990; Kaelin et al., 1990).

En la mayoría de los tumores, p105^{RB} es afectada en una o en las dos regiones conservadas, principalmente por delección en los exones 13 al 17 (Hu et al., 1990; Zacksenhaus et al., 1993). En otros casos, ocurren mutaciones puntuales en diferentes regiones. Así, Kaye y col. (1990), demostraron que en células pequeñas de pulmón una mutación puntual en el codón 706 dentro del exón 21 de Rb, es suficiente para generar un proteína funcionalmente inactiva.

p105^{RB} es una fosfoproteína nuclear que tiene afinidad al ADN y cuyos estados activos funcionalmente están determinados por el grado de fosforilación durante el ciclo celular.

p105^{RB} Y CICLO CELULAR

En cada división de una célula eucarionte, en la fase G1 del ciclo celular, una señal determina si se continúa a una nueva fase de síntesis o indica la salida del ciclo para entrar a un estado quiescente o de reposo, denominado G0.

Estas señales incluyen a los factores de crecimiento y a otras factores que activan la expresión de genes específicos para promover o restringir la proliferación celular. Una vez que la célula comienza una nueva división, se requiere la activación de otros genes que regulen la progresión a través del ciclo celular. Algunos han sido inicialmente identificados en levaduras y más

recientemente en células de mamíferos. La expresión de proteínas cinasas y una serie de ciclinas están involucradas en la transición de la fase G₀/G₁ a S en células de mamífero, o G₂/M en todas las células eucarióticas (Lees et al., 1991). Tres ciclinas de células de mamífero (C, D y E) se expresan en la fase G₁, mientras que solo una (A) se expresa en la fase de mitosis.

FOSFORILACION DE p105^{Rb}

La fosforilación juega un papel crítico en la regulación de la actividad de la proteína Rb. Varios investigadores han observado que la forma hipofosforilada de p105^{Rb} (estado activo) está involucrada en prevenir o restringir a la célula de la transición de la fase G₁ a S y a división celular (Buchkovich et al., 1989; Chen et al., 1989; Cooper y Whyte, 1989). DeCaprio y col. (1989), han observado en cultivos celulares sincronizados que p105^{Rb} se encuentra hipofosforilada durante la fase G₁, incrementando gradualmente el nivel de fosforilación durante la mitad de esta fase hasta llegar a la fase S, donde se encuentra sólo hiperfosforilada y se mantiene así en G₂/M del ciclo celular. En la fase temprana de G₁ p105^{Rb} se desfosforila y al parecer un estado desfosforilado de p105^{Rb} induce a la célula permanecer en estado G₀ (Fig. 2).

Este patrón de fosforilación cíclica de p105^{Rb}, se debe a la participación de una proteína cinasa, p34 cdc2, cuya actividad es regulada por su estado de fosforilación y por la unión a proteínas accesorias, las ciclinas (Devoto et al., 1992). La expresión de una ciclina en un punto específico del ciclo aumenta

p105^{RB} Y CICLO CELULAR

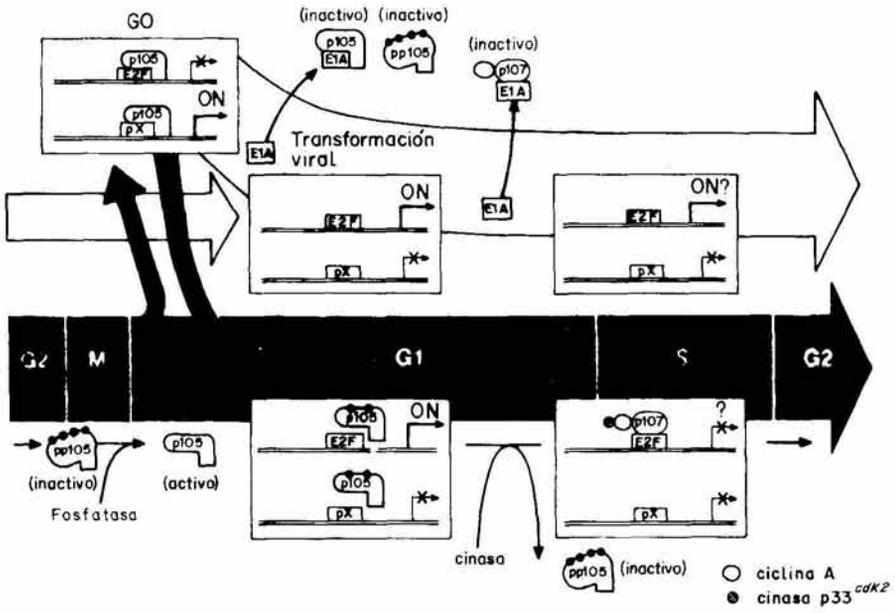


Figura 2. Modelo de regulación de p105^{Rb} en el ciclo celular. El modelo describe las fases del ciclo en células normales (flecha oscura) e infectadas con adenovirus (flecha clara). En la fase G1 del ciclo celular p105^{Rb} se fosforila gradualmente conforme avanza a S, donde se encuentra hiperfosforilada (forma inactiva), manteniéndose así en G2 y M. Después una posible fosfatasa retorna al estado no fosforilado de p105^{Rb}, permitiendo a las células entrar a un estado de reposo (G0). Sólo en la fase G1, la proteína Rb hipofosforilada (forma activa) es capaz de interactuar con el factor de transcripción E2F en células normales, o con la proteína E1A en células infectadas con adenovirus. La interacción de Rb con E2F inhibe la expresión de genes que son regulados por este factor, mientras que una activación sucede por la disociación de este complejo proteico ya sea por la hiperfosforilación de p105^{Rb} (flecha oscura) o por la asociación con E1A (flecha clara). En la fase S/G2, E2F se asocia con otras proteínas celulares (p107, ciclina A, cinasa p33cdk2), desconociendo su efecto en la transcripción. E1A también puede asociarse a p107 modificando la actividad de E2F en células infectadas. Se sugiere p105^{Rb} interactúa con otros factores (pX) inactivando la transcripción de otros genes.

la actividad cinasa cdc que conduce a la fosforilación de sustratos específicos. Estas proteínas fosforiladas son capaces de permitir a la célula progresar a la siguiente fase del ciclo celular. La activación de las cinasas de Rb ocurre justo antes o posiblemente con la replicación del ADN. (DeCaprio et al., 1989). Por otro lado, poco se ha estudiado referente a las proteínas que participan en la desfosforilación de Rb para entrar a la siguiente fase G1, aunque no se descarta la participación de una fosfatasa específica (Hamel et al., 1992).

Por todo lo anterior, es claro que la regulación de la fosforilación de p105^{Rb} pueda actuar por sí misma como un regulador de la transición de G1 a S del ciclo celular. Debido a esto, la forma activa suprime el crecimiento y la inactivación de p105^{Rb} conduce a un descontrol del crecimiento celular.

Interesantemente, p105^{Rb} se asocia a algunas proteínas únicamente en su forma hipofosforilada, como el antígeno T grande de SV40 (Ludlow et al., 1989) lo que sugiere que bloquea la actividad supresora de Rb, en la fase G1.

Se han descrito interacciones de p105^{Rb} con proteínas producidas por virus tumorales de ADN, sugiriendo que los productos de genes supresores de tumor regulan la expresión de genes involucrados en la proliferación o diferenciación celular, o controlando los mecanismos bioquímicos que regulan el inicio de la síntesis del ADN (Marshall, 1991).

INTERACCION CON PROTEINAS VIRALES

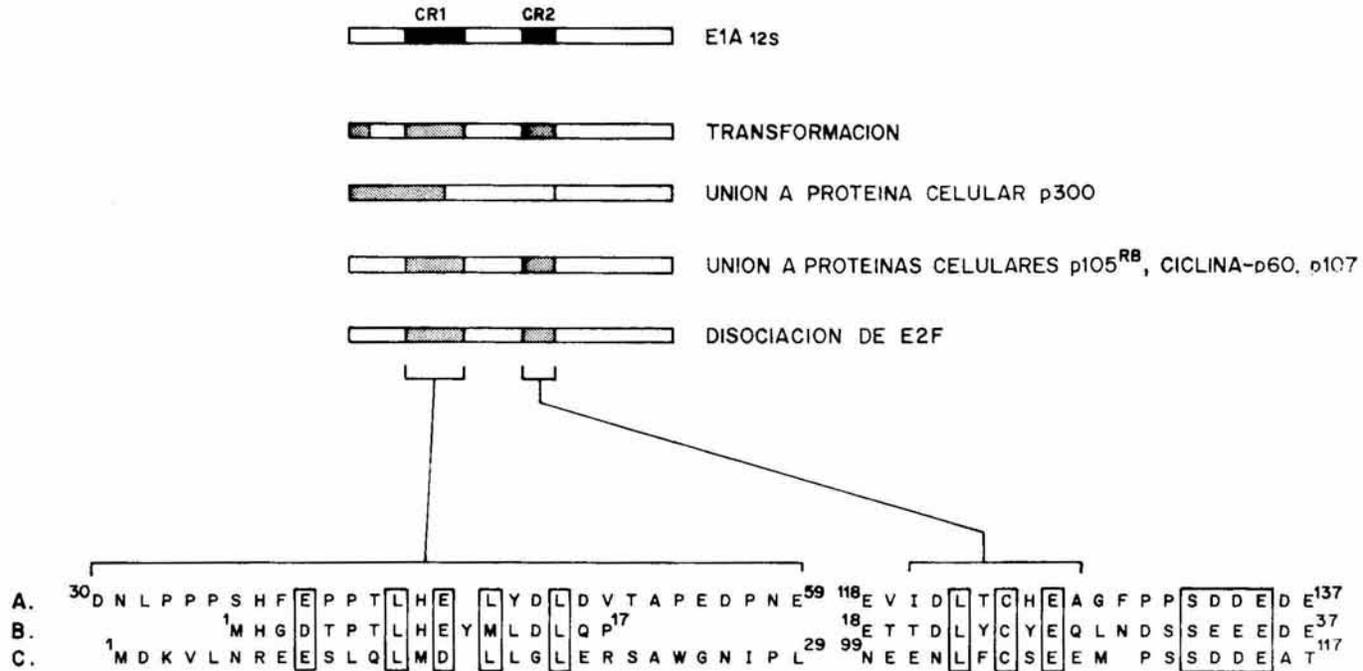
Evidencias recientes muestran que el gen RB y su producto, están involucrados en un segundo mecanismo de la tumorigénesis: oncoproteínas específicas de tres virus tumorales de ADN - adenovirus, virus de simio 40 (SV40) y papilomavirus humano (HPV)-, forman complejos con p105^{RB} (Hu et al., 1990).

Diversos autores han demostrado que p105^{RB} interactúa directamente con las proteínas transformantes E1A de adenovirus (Whyte et al., 1988), el antígeno T grande de SV40 (DeCaprio et al., 1988) y E7 de HPV tipos 6b, 11, 16 y 18 (Gage et al., 1990; Münger et al., 1989).

Actualmente se conoce que estas proteínas virales poseen regiones necesarias considerablemente homólogas, para interactuar con p105^{RB} a través de un motivo LXCXE (donde X es cualquier aminoácido). Los aminoácidos 99 al 117 comprenden la región CR2 en el antígeno T grande de SV40 (Ewen et al., 1989); del aminoácido 37 a 60 y 118 a 137 de la proteína E1A corresponden a los dominios CR1 y CR2, respectivamente (Egan et al., 1988; Dyson et al., 1992); y del aminoácido 18 al 37, en E7 de HPV-16, la región CR2 (Dyson et al., 1989). Estas regiones CR1 y CR2, son también requeridas para la actividad transformante de las oncoproteínas (Fig. 3).

Existen dos regiones de la proteína Rb para una interacción estable proteína-proteína (Hu et al., 1990; Huang et al., 1990; Kaelin et al., 1990). Una de estas regiones predice un posible "cierre de leucina" (Fig. 1), una estructura que está implicada

SECUENCIAS HOMOLOGAS ENTRE LAS ONCOPROTEINAS E1A, E7 y T GRANDE



- A. E1A DE ADENOVIRUS
- B. E7 DE HPV-16
- C. ANTIGENO T GRANDE DE SV40

Figura 3. Regiones homólogas entre las proteínas de virales E1A de adenovirus, antígeno T grande de SV40 y E7 de Papilomavirus humano (HPV). Las regiones de la proteína E1A (denominadas CR1 y CR2), son necesarias para diferentes funciones: a) la unión a p105^{Rb} y otras proteínas celulares que participan en la regulación del ciclo celular; b) la actividad transformante de la proteína viral y c) la disociación del factor de transcripción E2F en los complejos proteicos p105^{Rb}-E2F y Ciclina A-E2F. Los aminoácidos relacionados entre las tres proteínas oncogénicas se localizan en regiones conservadas (principalmente el dominio LXCXE en CR2, donde X es cualquier aminoácido) para la interacción con la proteína Rb como se indican en los recuadros.

en la capacidad de algunas proteínas para formar hetero- u homodímeros.

Probablemente los virus infecten células en estado de reposo y durante las primeras fases infectivas es posible que estimulen a la célula a entrar en un estado proliferativo que les permita llevar a cabo su replicación. A pesar de que cada virus codifica para proteínas que permiten ciertos aspectos de su replicación, se requiere en general de la maquinaria celular de síntesis de ADN. Lo mismo ocurre durante la infección por los virus tumorales de ADN (Adenovirus, SV40 y HPV).

La actividad transformante de los virus mencionados ocurre en cooperación con algunos oncogenes celulares como *c-ras* o *c-myc*. No obstante, un evento importante de esta actividad consiste en que los productos proteicos de genes transformantes al formar un complejo con la proteína Rb únicamente en su forma hipofosforilada, antagonizan su función supresora del ciclo celular, permitiendo a la célula infectada entrar a la fase S e iniciar la replicación del ADN viral (Ludlow et al., 1989).

Experimentalmente se ha demostrado que el complejo con p105^{RB} es esencial en la capacidad de estas oncoproteínas para transformar cultivos celulares primarios (Horowitz et al., 1990) e iniciar tumores en animales.

Este mecanismo se observa claramente en líneas celulares de carcinoma cervical de humano que poseen HPV, en las cuales p105^{RB} se expresa normalmente, mientras que en aquellas que no poseen HPV, se han encontrado mutaciones en el gen RB que afectan la

fosforilación y la unión de las oncoproteínas virales a las que se une p105^{RB} (Scheffner et al., 1991).

Al parecer las proteínas virales actúan como inhibidores competitivos bloqueando la interacción entre p105^{RB} y un sustrato importante (proteína celular). Esta hipótesis es comprobada por la unión de E2F con Rb.

p105^{RB} Y MECANISMOS DE ACCION

Varios grupos de investigadores han demostrado e identificado al menos 8 proteínas celulares con las que interactúa p105^{RB}. Algunas de estas proteínas interactúan con los dominios A y B de Rb con los que se unen el antígeno T grande y E1A, lo que puede inactivar su función por alteraciones en dicho dominio o por la unión a un pseudoestrato (Kaelin et al., 1991; DeFeo-Jones et al., 1991; Huang et al., 1991).

Al respecto, sólo se han clonado tres ADNc que codifican para proteínas RBP1, RBP2 y RBP3 que son capaces de unirse a p105^{RB} "in vitro" únicamente. Aunque estas proteínas poseen propiedades similares entre sí, aún se desconoce su función (Kaelin et al., 1992).

Para algunos investigadores, la asociación "in vitro" de p105^{RB} y la proteína c-myc, sugiere que ambas proteínas cooperan para controlar el ciclo celular (Rustgi et al., 1991). Sin embargo, sigue siendo desconocida la relación y la interacción entre estas proteínas "in vivo".

Existen evidencias que han demostrado que la proteína Rb

interactúa con proteínas celulares que regulan la transcripción de genes implicados en el control del crecimiento (Chellappan et al., 1991).

INTERACCION CON FACTORES DE TRANSCRIPCION

La regulación de la expresión de los genes eucarióticos está determinada principalmente por la unión de ciertas proteínas a secuencias específicas del ADN (potenciadoras o "enhancer") dentro de la región promotora de determinado gen. Estas proteínas de unión al ADN se denominan factores de transcripción.

La proteína Rb forma un complejo con un factor transcripcional que se une al ADN celular, E2F (Chellappan et al., 1991) o DRTF (Bandara y La Thangue, 1991). Este factor se asocia a una o más proteínas celulares y puede unirse directa o indirectamente con p105^{RB}, lo que sugiere que el producto del gen RB está involucrado en la regulación de la transcripción de genes celulares.

DRTF fue definido como un factor de transcripción desregulado durante la diferenciación de células F9 de carcinoma embrionario (La Thangue y Rigby, 1987), mientras que E2F fue definido con una actividad inducida en células HeLa después de la infección con adenovirus (Kovesdi et al., 1986). Estas proteínas se unen al ADN en secuencias muy similares (secuencia consenso: TTTGCGGCC) y además forman complejos con las mismas proteínas. Si bien E2F y DRTF pueden estar muy relacionadas, los conocimientos sobre su función se han enfocado mayoritariamente

a E2F.

E2F fue identificado originalmente como un factor necesario para la transcripción del gen E2 de adenovirus (Bagchi et al., 1989). Actualmente se sabe que E2F está involucrado en la regulación de la expresión de genes celulares que controlan el crecimiento celular, posiblemente en las fases G1 y S del ciclo celular (Helin et al., 1992).

El factor de transcripción E2F posee un dominio de unión al ADN que comprende del aminoácido 89 al 191. Por otro lado, la asociación de E2F con p105^{Rb} abarca una región cercana a su extremo carboxilo terminal entre los aminoácidos 409 y 426 (Helin et al., 1992).

Un posible mecanismo de la regulación por E2F es mediante la interacción con p105^{Rb}. A este respecto, E2F forma un complejo con p105^{Rb} exclusivamente en la fase G0/G1 y desaparece conforme sucede la fosforilación de Rb (Chellapan et al., 1991; Mudryj et al., 1991). La interacción de E2F con otras proteínas celulares tales como ciclina A dependiente de cinasa cdk2, p107, cinasa p33cdk2 ocurre sólo en la fase S (Shirodka et al., 1992). Probablemente todo el complejo esté participando en eventos de replicación del ADN, sin embargo no se ha demostrado con certeza esta posibilidad (Mudryj et al., 1991; Devoto et al., 1992).

Interesantemente, las proteínas oncogénicas E1A (Bagchi et al., 1990), antígeno T grande o E7 pueden disociar los complejos E2F-Rb (Chellappan et al., 1992) y E2F-Ciclina A (Mudryj et al., 1991), secuestrando a Rb en G1 o a ciclina A en S y liberando a

E2F del complejo (Fig. 2).

Por lo tanto, Rb es capaz de modular la acción de este factor en una célula normal inactivando su función cuando se encuentra formando el complejo Rb-E2F (Weintraub et al., 1992), lo cual es un importante evento en la proliferación celular.

Mediante ensayos de transfección transitoria se ha observado que la proteína Rb puede reprimir la transcripción de genes celulares importantes asociados con la proliferación, como c-fos (Robbins et al., 1990) y c-myc (Pietenpol et al., 1990).

La expresión de otros genes que codifican para el Factor B de crecimiento transformante (TGF- β 1), también se ve afectada por p105^{Rb}. Kim y col. (1991) proponen que la regulación por Rb incluyendo a c-fos, es a través de un elemento control de retinoblastoma (RCE) en los promotores. En estos sistemas, se sugiere que la regulación de la transcripción por la proteína Rb no involucra al factor E2F, y que el efecto de p105^{Rb} pueda ocurrir de manera indirecta o previniendo la unión de otros factores celulares (Hamel et al., 1993).

Es significativamente más apoyada la idea de que el mecanismo de regulación negativa de la expresión de genes por p105^{Rb} sea mediante la interacción con E2F, posiblemente debido a que el complejo E2F-Rb inhibe la transcripción (Hiebert et al., 1992).

Nevins y col. (1992) indican que E2F es importante para la regulación de la transcripción de varios genes virales así como algunos genes celulares involucrados en la replicación del ADN

y proliferación celular, los cuales poseen sitios de unión a E2F en su promotor. Estos genes se incluyen en la Tabla 2 (Hiebert et al., 1991). Sin embargo, sólo se ha demostrado activación transcripcional por E2F en los genes c-myc y DHFR (Hamel et al., 1992; Hiebert et al., 1992). Es posible que p105^{RB} controle la expresión de c-myc a través de los sitios de unión a E2F. (Bagchi et al., 1991).

El mecanismo de la regulación de la transcripción por p105^{RB} aún no se conoce totalmente. No obstante, es de gran interés demostrar si realmente p105^{RB} pueda actuar como regulador negativo de la transcripción en otros genes virales o celulares importantes mediante ensayos de expresión "in vivo".

OBJETIVO GENERAL

Demostrar la participación del producto del gen RB en la regulación de la transcripción de genes celulares y virales.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Caracterizar el plásmido pCMV-RB.S.

Analizar el efecto de Rb sobre la actividad transcripcional de promotores celulares (albúmina y c-myc) y virales (Temprano de SV40, TK de HSV y HPV-18).

GEN	SECUEN CIA	POSI CION	ACTI VIDAD
Dihidrofolato reductasa (DHFR)	TTTCGCGC TTTGGCGC	+2/+9 +13/+6	*b*
Timidina cinasa	TTTGCCGC	-105/-112	*b*
ADN polimerasa α	TTTGGCGC	-128/-135	*b*
c-myb	TTTGGCGG	-278/-271	*a*
c-myc	TTTCCCGC	-58/-65	*a*
N-myc	TTTCGCGC TTTGGCGC TTTCGCGC	-130/-137 -142/-134 -126/-119	*a*
cdc2	TTTGGCGC	-128/-121	*a*
RB	TTTCCCGC	-186/-179	*a*
E2 de Adenovirus	TTTCGCGC TTTCGCGC	-67/-60 -36/-43	*c*

Tabla 2. Sitios de unión al factor E2F en promotores de genes celulares que participan en el control del crecimiento (*a*) y síntesis del ADN (*b*), además de promotores virales (*c*). La posición de estos sitios se localizan cerca del inicio de la transcripción, excepto c-myb.

METODOLOGIA

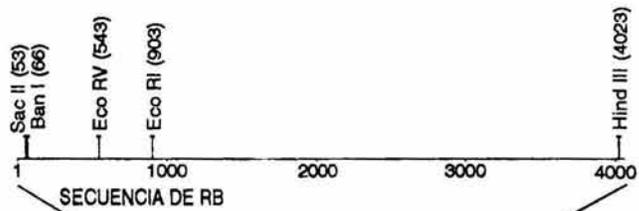
La primera parte de este trabajo fue la caracterización del plásmido pCMV-RB.S (Fig. 4). Esta caracterización consistió en realizar cortes con endonucleasas de restricción para delimitar el tamaño del fragmento de ADN (ADNc) correspondiente al gen de RB dentro del plásmido. Lo anterior se realizó con la finalidad de determinar si este ADN clonado, permite la expresión de la proteína p105^{RB} con los sitios importantes para llevar a cabo su función biológica.

CARACTERIZACION DEL ADN

Digestión del ADN con enzimas de restricción

El ADN se puede fragmentar previamente al corrimiento electroforético empleando endonucleasas de restricción, las cuales cortan en un sitio y secuencia específica. Las condiciones óptimas de reacción son la temperatura de incubación y la composición de la solución tampon o amortiguador (adecuado al tipo de enzima), que tienen que ser controladas estrictamente.

El plásmido pCMV-RB.S se digirió con diferentes enzimas de restricción determinando el número de sitios de corte para cada una de ellas. Después el fragmento del ADNc de RB clonado, se separó del vector (pCMV4-RS) cortando con la enzima Hind III. Estos fragmentos linearizados se purificaron y se cortaron nuevamente con las enzimas anteriormente usadas (Fig. 4). De esta manera se indicó la longitud exacta del ADN digerido y separado



ESTRATEGIA DE CLONACION DE pCMV-RB.S

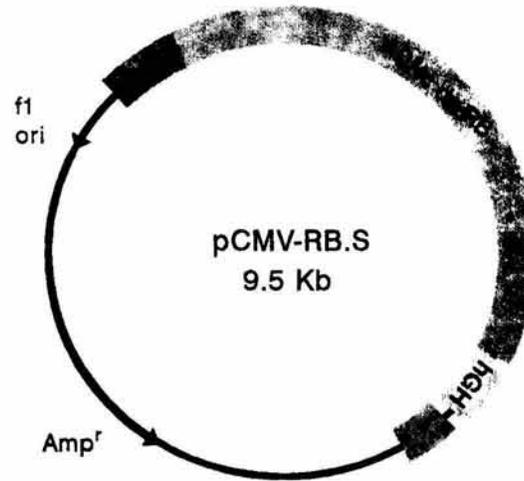
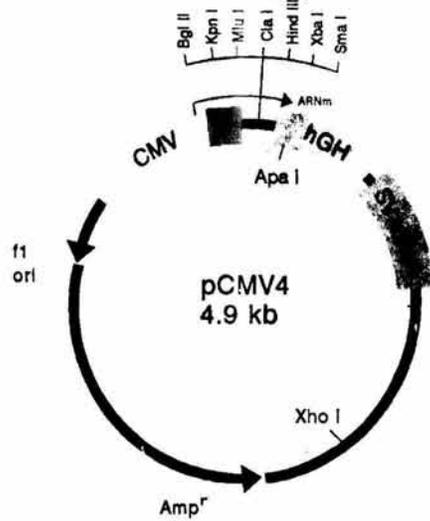


Figura 4. Estrategía de clonación del plásmido pCMV-RB.S realizada por Efraín Garrido G. y Nobuo Horikoshi en 1991. El ADNc del gen RB fue clonado en el sitio Hind III del vector pCMV4-RS, el cual se caracteriza por tener el promotor de Citomegalovirus (CMV) que se expresa eficientemente en células eucariontes, un potenciador o "enhancer" transducional del virus del mosaico 4 de alfalfa (A), una región con múltiples sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, señales de poliadenilación y terminación de la transcripción del gen para la hormona del crecimiento (hgH), los orígenes de replicación del virus SV40 y del bacteriófago f1 y el gen de resistencia a ampicilina (Amp^r). En pCMV4-RS y en el ADNc de RB se señalan los sitios que se conocen para algunas enzimas de restricción.

de acuerdo al tamaño por electroforesis en geles de agarosa.

Electroforesis en geles de agarosa

La separación de moléculas a través de un soporte inerte como la agarosa, se realiza al someterla a un campo eléctrico en donde la migración depende de la masa y la carga de la misma molécula. El corrimiento de la muestra se puede visualizar en el gel de agarosa empleado un colorante como bromuro de etidio al colocarlo en una fuente de luz ultravioleta.

De acuerdo a la concentración deseada, se pesa una cantidad de agarosa (Sigma) y se agrega a un volumen determinado de tampón de TBE (Tris-HCl 89mM pH 7.9, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM). Posteriormente se disuelve en una fuente de calor, dejándose gelificar (con 0.05 µg/ml de bromuro de etidio) en un carro para electroforesis con un peine formador de pozos; después se retira el peine y el gel se coloca en una cámara de electroforesis horizontal que contiene TBE.

Las muestras de ADN se colocan con una mezcla de colorantes indicadores de corrida (Azul de bromofenol 0.02%, xilen-cianol 0.02%, glicerol 50%) en los pozos y se aplica un voltaje constante que depende de la concentración y tamaño del gel; después se visualizan las bandas exponiendo el gel en una fuente de luz ultravioleta de onda larga.

Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles

Como paso inicial se realiza la digestión del ADN utilizando enzimas de restricción para separar el fragmento de interés. Después se realiza la electroforesis en geles de agarosa en

tampon de TAE; la extracción de fragmentos de ADN se lleva a cabo por el método "Gene Clean" (extracción por perlas de vidrio) (Fig. 5).

Se prepara un gel de agarosa al 1.0% en tampon de TAE (Tris-base 40mM pH 7.9, acetato de sodio 20mM, EDTA 1mM) y se corre electroforéticamente en el mismo tampon. Se cortan los fragmentos deseados colocándolos en un tubo estéril para microfuga con 1 ml de solución Ioduro de sodio (NaI 6.06M saturada con NaSO₃) y se incuban a 37°C hasta que se disuelva la agarosa. Se agrega 1 µl de perlas de vidrio por cada µg de ADN y se resuspende con vortex incubándose en hielo durante 20 min; se centrifuga a velocidad máxima (13,000 revoluciones por minuto [rpm]) durante 30 seg y se retira el sobrenadante con trampa al vacio. Después se agrega 1 ml de solución de NaI saturada agitándose con vortex y se centrifuga durante 30 seg; se elimina el sobrenadante y se repiten los tres pasos anteriores con 1 ml de etanol al 70%. Posteriormente se agregan 10 µl de tampon TE (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM), se incuban a 37°C durante 30 min, centrifugando 30 seg para recuperar el TE que contiene el ADN de interés.

La segunda parte del desarrollo experimental consistió en la siguiente estrategia:

Se realizaron ensayos de cotransfección en una línea celular de mamífero con una construcción que permitió obtener niveles elevados del producto de RB y utilizando como blanco de su actividad construcciones que poseen los promotores mencionados regulando la expresión del gen reportero CAT (Cloranfenicol

SEPARACION DE BANDAS EN GELES DE AGAROSA

RESTRICCIÓN DEL PLASMIDO pCMV-RB.S CON LA ENZIMA HIND III

37°C, 2 HRS.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1%

20 VOLS 12 HORAS

CORTAR FRAGMENTOS DE ADN ESPECIFICOS

PURIFICACION DEL ADN POR EL METODO DE EXTRACCION CON PERLAS DE

VIDRIO ("GENE CLEAN")

DIGESTION DE LOS FRAGMENTOS DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

ESPECIFICAS

Figura 5. Protocolo de separación de fragmentos de ADN específicos (ADNc del gen RB y el vector pCMV4-RS) del plásmido pCMV-RB.S con la enzima Hind III. A partir de un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1%, se separan las bandas de ADN y se purifican por el método de "Gene Clean".

acetil-transferasa).

LINEAS CELULARES

Para los ensayos de transfección se utilizó la línea celular C-33A (establecida a partir de un carcinoma cervical de humano). Esta línea celular crece en monocapa y se cultiva en un medio Eagle modificado por Dulbecco y medio de cultivo F12 (proporciones 1:1), suplementado con 10% de suero fetal de ternera.

Pasaje y mantenimiento de líneas celulares

Se elimina el medio de las cajas de cultivo y se lavan las monocapas dos veces con 5 ml de PBS (NaCl 137mM, KCl 3mM, Na₂PO₄ 2mM, KH₂PO₄ 2mM, pH 7.4). Se les añaden 7 ml de solución de tripsina (Tripsina 0.05%, NaCl 0.8%, KCl 0.04%, Dextrosa 0.1%, NaHCO₃ 0.058%, EDTA 0.02%) y se incuban a 37°C por 5 minutos para permitir el desprendimiento de las células. La suspensión celular se coloca en un tubo falcon conteniendo 1 ml de suero fetal, y se centrifuga por 5 minutos a 3,000 rpm para empastillar las células. Se retira el sobrenadante y la pastilla se resuspende en medio Dulbecco-F12 con antibióticos (Penicilina 50 unidades por ml, Estreptomicina 100 µg por ml, Gentamicina 50 µg por ml), suplementado con glutamina 2mM y con 10% de suero fetal de ternera.

A las cajas nuevas se les colocan 10 ml de medio completo y se siembran las células a una densidad de 3 a 4 x 10⁶ por cada caja de cultivo p-100 (100 mm diámetro). Las cajas sembradas se

mantienen en incubación a 37 C con 5% de CO₂ durante cinco o seis días hasta que la monocapa alcance la confluencia deseada, ya sea para ser utilizadas en algún experimento o bien para continuar con los pasajes de mantenimiento.

Para cajas p-60 (60 mm de diámetro) se utiliza la mitad del volumen de los medios y soluciones y se siembran a una densidad de 1 a 2 x 10⁶ células por caja, las cuales son utilizadas para ensayos de transfección.

PLASMIDOS

A. Plásmidos del grupo 1.

Este grupo tiene en común el poseer regiones de algún gen que codifica para algún producto proteico, bajo el control de promotores fuertes y/o secuencias potenciadoras ("enhancer") que permiten obtener una elevada expresión de éstos en células eucarióticas.

El plásmido pCMV-RB.S posee el ADN complementario del gen de retinoblastoma, el cual fue clonado (en sentido 5'-3') dentro del sitio Hind III del vector pCMV4-RS (por Efraín Garrido G. y Nobuo Horikoshi en 1991). Este vector contiene el promotor temprano de Citomegalovirus, una copia de un segmento de ARN del virus de mosaico 4 de alfalfa que contiene un "enhancer" transduccional, una región con múltiples sitios de corte para enzimas de restricción ("polylinker"), señales de poliadenilación y terminación transcripcional del gen para la hormona del crecimiento y el origen de replicación de ADN del virus SV40 y

secuencias "enhancer" de la región temprana. Además contiene un gen de resistencia a ampicilina de Escherichia coli y el origen de replicación de ADN del bacteriofago f1 (Andersson et al., 1989) (Fig. 4).

El plásmido pRSV β -gal contiene el gen que codifica para la enzima β -galactosidasa teniendo como promotor el LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) (Gorman et al., 1982b). Este plásmido sirvió como indicador de la eficiencia de transfección para normalizar los ensayos de CAT.

El plásmido pSG5c-FOS contienen el gen que codifica para la proteína c-fos, clonado en un vector de expresión eucariótico (Green et al., 1988).

B. Plásmidos del grupo 2.

Este grupo consiste en construcciones que poseen el promotor de algún gen eucariótico, ya sea celular o viral, clonados al frente del gen reportero CAT que codifica para la enzima cloranfenicol acetil-transferasa.

Este gen reportero codifica para una actividad enzimática única que se distingue de la mezcla de proteínas intra o extracelulares.

La capacidad transcripcional de los promotores probados es estimada cuantitativamente de la actividad "in vitro", generalmente de manera proporcional, del producto del gen reportero en un medio de cultivo o derivado de un extracto celular mediante un ensayo rápido, sensible y muy estable. Por lo tanto, la actividad del producto del gen reportero comprueba

el efecto de elementos de control regulatorio o elementos potenciadores transcripcionales de los ADN a estudiar (Alam y Cook, 1990).

La región promotora de los plásmidos del grupo 2, es considerada como posible blanco del producto del gen de retinoblastoma.

El plásmido pE, contiene la región de -156 a +16 (Eco RI-HincII) del promotor del gen que codifica para la albúmina de rata (Heard et al., 1987).

El pMYC-CAT, contiene el fragmento de -100 a +71 con respecto al sitio de inicio de transcripción P1 del gen de c-myc humano (Pietenpol et al., 1990).

El plásmido pGC9, construido por Sonogosti y col. en 1982 (Takahashi et al., 1986), posee el sitio de poliadenilación y el intrón del antígeno t pequeño de SV40.

El p18/42, contiene como promotor a la Región Larga de Control (LCR) natural del papilomavirus humano tipo 18, que abarca la región de -6929 a +124 (fragmento HindIII-BamHI) (Thierry et al., 1987).

El plásmido pTKm, contiene las secuencias que abarcan un fragmento de -109 a +55 (Sau 3A-BglI) del promotor de la timidina cinasa del virus herpes simple (TK-HSV), clonado en el vector de expresión pSB1 (Thierry et al., 1990).

El pAP1, es una construcción en la que utilizando como base el plásmido pTKm, se clonó un sitio AP1 (5'-TGACTGA-3') del LCR de HPV-18 en el extremo 5' del promotor TK (Thierry et al.,

1992).

La construcción básica de estos plásmidos fueron descritos por Gorman y col. (1982a), que incluyen tanto el intrón del antígeno t pequeño de SV40 situado en el extremo 3' de CAT como el origen de replicación y el gen de resistencia a ampicilina de pBR322.

Como plásmido acarreador, se utilizó pGEM-4Z o pUC 19 para completar la cantidad total de ADN en μg a transfectar. El pGEM-4Z posee 2800 pb, contiene el gen de resistencia a ampicilina y un sitio de restricción múltiple al igual que el plásmido pUC 19, el cual posee 2686 pb. (Yanish-Perron et al., 1985).

Preparación de Plásmidos.

A. Bacterias competentes

La preparación de bacterias competentes, así como su transformación con ADN plasmídico y la purificación de éste, se realiza esencialmente como lo describen Maniatis y col. (1982). Todos los plásmidos se mantienen en bacterias Escherichia coli de la cepa DH5 α . Previamente a la transformación, es necesario la preparación de bacterias competentes, ya que E. coli no es normalmente permisiva a la entrada de ADN extraño y requiere para ello un tratamiento con iones como Ca⁺⁺ o Mg⁺⁺. De esta manera, las bacterias se precultivan toda la noche a 37°C en medio SOB (Bacto-triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.05%, pH 7.5) en presencia de MgSO₄ 10mM. Posteriormente se inoculan 500 μl de este precultivo a 50 ml de medio SOB en presencia de MgSO₄,

10mM, continuandose la incubación en agitación a 37°C hasta alcanzar la densidad óptica de 0.5 a 550 nm. Luego se transfiere el cultivo a tubos estériles tipo falcon y se refrigeran un mínimo de 10 minutos. Se empastillan las bacterias a 2500 rpm durante 12 min. a 4°C y se elimina totalmente el sobrenadante. La pastilla se resuspende en 16 ml de amortiguador RF1 (KAc 30mM, RbCl₂ 100mM, CaCl₂ 10mM, MnCl₂ 50mM, glicerol 15%, pH 5.8) y se incuba por 15 min en hielo. Se vuelve a empastillar a las mismas condiciones anteriores y se resuspende la pastilla en 4 ml de amortiguador RF2 (MOPS (3-[N-Morfilino] ácido propano sulfónico) o PIPES (piperazina-N, N'-bis [2-ácido etanosulfónico]; 1,4-ácido piperazina dietanosulfónico) 10mM, CaCl₂ 75mM, RbCl₂ 10mM, glicerol 15%, pH 5.0), incubándose nuevamente a 4°C por 15 min y se distribuyen en alícuotas de 200 µl, en tubos estériles preenfriados almacenándolos a -80°C.

La preparación de soluciones y la realización de este método se llevan a cabo en condiciones estrictas de esterilidad.

B. Transformación de bacterias E. coli

A una alícuota de 200 µl de suspensión de bacterias competentes, se añaden 1 a 10 ng del ADN plasmídico y se incuba en hielo durante 20 min. La mezcla se incuba a 42°C por 90 seg, e inmediatamente se regresa al hielo dejándolo por 2 min. Se le adicionan 800 µl de medio SOC (SOB complementados con glucosa 0.4% y MgSO₄ 10mM) y se incuba en agitación durante 50 min a 37°C. Se espatula directamente con 50 µl este cultivo en cajas con medio agar-luria con el antibiótico correspondiente (para el

que le proporcione resistencia la presencia del plásmido); el resto del cultivo se centrifuga durante 3 min y la pastilla se siembra de igual manera. Se incuban las cajas por un mínimo de 10 horas a 37°C y se seleccionan las colonias transformantes.

De las bacterias transformadas, se crecen minicultivos y se realiza la extracción de ADN, purificándolo con extracciones fenólicas y etanólicas y realizando digestiones con enzimas de restricción para corroborar la presencia del plásmido empleado para la transformación.

Una vez seleccionadas las colonias transformantes se realizan cultivos en gran escala para obtener la mayor cantidad de ADN plasmídico. Este ADN debe tener la mayor pureza posible para los ensayos de transfección de células eucarióticas, por lo cual se someten a una doble purificación en un gradiente isopícnico de Cloruro de cesio (CsCl). La cuantificación de ADN se realiza por espectrofotometría a una densidad óptica de 260 nm según Maniatis y col. (1982).

TRANSFECCION Y ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA

El desarrollo reciente de técnicas para transfección de ADN de cultivos celulares ha contribuido a examinar la función de varios genes de mamíferos. Esto ha sido posible debido al desarrollo de vectores de expresión adecuada que permiten el correcto procesamiento de proteínas para su función.

La capacidad de examinar la actividad transcripcional de secuencias de ADN después de la introducción de estos elementos

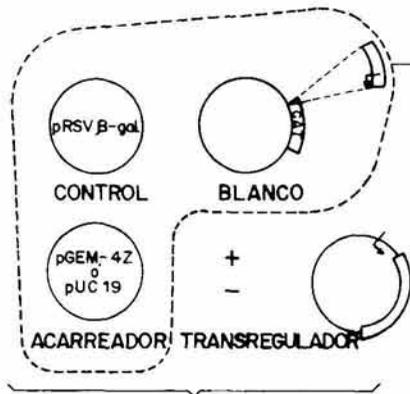
a células apropiadas, permiten entender la regulación de la transcripción de genes de mamífero.

Ensayos de Transfección Transitoria

Las transfecciones se efectuaron en células C-33A, sembradas 24 horas antes a una densidad de 5×10^5 por caja p-60 en 5 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco y F12 (1:1), suplementado con 10% de suero fetal de ternera. Dos horas antes de la transfección se retira el medio de las cajas sembradas y se agrega medio fresco para mantener un pH neutro que se requiere para la formación del precipitado. La cantidad de ADN total a transfectar es de 10 μ g siguiendo la metodología de precipitación con Fosfato de Calcio (Wigler et al., 1977).

La cantidad total de ADN antes mencionada incluye alguno de los plásmidos con promotores celulares o virales clonados frente a CAT, como indicador de la eficiencia de transfección al pRSV β -gal, en los casos indicados los posibles transreguladores pCMV-RB.S y pSG5c-FOS; como plásmido acarreador pUC19 o pGEM 4Z si es necesario (Fig. 6).

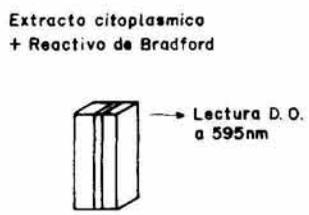
Los plásmidos se colocan en el fondo de un tubo poliestireno estéril y se les adiciona 425 μ l de tampón HeBS (NaCl 137mM, KCl 5mM, Na_2HPO_4 0.7mM, glucosa 6mM, HEPES 21mM, pH 7.05) y se agita con vortex 3 a 4 veces y manteniendo en reposo hasta llegar a los 10 min; posteriormente se agregan 25 μ l de CaCl_2 2M por goteo lento, agitando con vortex continuo durante 10 min. Una vez realizado lo anterior, se deposita lentamente el precipitado formado, tratando de que se distribuya homogéneamente en las



- Promotores celulares (●) ó virales (○)**
- c-myc (pMYC-CAT)
 - Albúmina de rata (pE)
 - Temprano de SV40 (pGC9)
 - Papilomavirus humano tipo 18 (p18/42)
 - Timidina cinasa del virus herpes simple (pTKm)
 - Sitio AP1 de HPV-18 sobre pTKm (pAP1)
- Diferentes genes de factores reguladores**
- pCMV-RB.S
 - pSG5c-FOS



CUANTIFICACION DE PROTEINA



ENSAYO β-GALACTOSIDASA (β-Gal)



ENSAYO CLORANFENICOL ACETIL-TRANSFERASA (CAT)

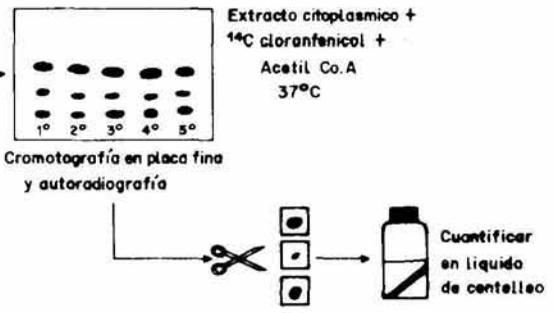


Figura 6. Protocolo de Transfección transitoria en células eucarióticas mediante fosfato de calcio. La cantidad total de ADN a transfectar incluye a los plásmidos con promotores celulares y virales frente a CAT (blanco de actividad de la proteína Rb), al indicador de la eficiencia de transfección (control), a los transreguladores y a los acarreadores cuando es necesario.

El protocolo de transfección por fosfato de calcio y la obtención de extracto citoplasmático (48 hrs post-transfección) se realizan de acuerdo a Wigler y col. (1977). La cuantificación de proteína (Bradford, 1976) se realiza antes de ensayo β -galactosidasa (Herbomel, et al., 1984) para normalizar el volumen de extracto citoplasmático en los ensayos de Cloranfenicol acetil-transferasa (Kingston, 1991). La cuantificación de la actividad de CAT (formas mono- y di-acetiladas del ^{14}C -cloranfenicol) se determina a partir de un contador en líquido de centelleo (cpm).

cajas. Después de incubar por 16 hrs a 37°C en un ambiente del 3% CO₂, las monocapas se lavan dos veces con PBS y se les adiciona medio completo manteniéndolas por 24 hrs más en incubación a 37°C con 5% CO₂.

En ensayos de transfección transitoria la expresión de los elementos genéticos se analizan entre 48 y 72 hrs post-transfección ya que el ADN transfectado no se integra al genoma celular.

Obtención de Extractos celulares

Tanto la obtención de extractos celulares como la evaluación de las actividades de β-galactosidasa y Cloranfenicol acetil-transferasa, se realizaron por las metodologías descritas por Herbomel y col. (1984) y Kingston (1991), respectivamente (Fig. 6).

48 hrs después de la transfección, las monocapas celulares se lavan dos veces con 5 ml de PBS a temperatura ambiente y se adiciona 1 ml de solución TEN (Tris-HCl 40mM, EDTA 1mM, NaCl 150mM), manteniendo las cajas durante 5 min en hielo. Posteriormente se cosechan las células con la ayuda de un fragmento de hule estéril y se transfieren a un tubo estéril para microfuga. La suspensión celular se centrifuga (13,000 rpm) por un minuto a 4°C y se elimina el sobrenadante para resuspender la pastilla en 100 µl de Tris-HCl 0.25M pH 7.5. Luego se obtiene el lisado celular por tres ciclos de congelamiento (5 min en hielo seco) y descongelamiento (5 min en baño a 37°C). El lisado se coloca en hielo para enfriarse, se centrifuga durante 5 min a 4°C

y se rescata el sobrenadante dejándolo almacenado a -20°C hasta el momento de llevar a cabo la cuantificación de proteína, los ensayos de β -galactosidasa y Cloranfenicol acetyl-transferasa.

Una vez realizado lo anterior, se requiere que todos los extractos de un protocolo contengan la misma concentración de proteína para poder realizar los ensayos enzimáticos.

Cuantificación de Proteína por el Método de Bradford

El método (Bradford, 1976) (Fig. 6) permite determinar entre 1 y 100 μg de proteína en un volumen menor de 0.1 ml.

Se toman 5 μl del extracto celular y se ajusta a 0.1 ml con el tampon Tris-HCl 0.25M pH 7.5, en el que se encuentra este extracto celular. Se adiciona 1 ml del reactivo de Bradford (Azul brillante de Coomassie G-250 0.01%, etanol 4.7% 50 ml, ácido fosfórico 8.5%), se agita con vortex y después de 2 min de reposo, se lee a 595 nm en cubetas para espectrofotómetro de 1 ml, teniendo como blanco de reacción 0.1 ml del tampon mas 1 ml del reactivo. Para determinar los valores de concentración de proteína se usa una curva estándar de concentración de albúmina sérica bovina como referencia.

Ensayo de actividad de β -Galactosidasa

Este ensayo se realiza para determinar la eficiencia de transfección en cada caja de células transfectadas, y obtener un valor confiable en el ensayo de CAT.

β -galactosidasa es una enzima que hidroliza los β -D-galactosidos, como sustratos incoloros, los cuales al hidrolizarse producen productos coloreados (Miller, 1974).

Se toman 25 μ l del extracto celular ajustado por proteína mas 50 μ l de tampón de fosfatos (KCl 10mM, Mg₂Cl 1mM, Na₂HPO₄ 60mM, NaH₂PO₄ 40mM, pH 7.0). Se le agregan 1 μ l de β -mercaptoetanol 50mM y 200 μ l de ONPG (Ortonitrofenil-tiogalactosido 4 mg por ml en tampon de fosfatos pH 7.0) como sustrato de la enzima. Esta mezcla se incuba a 37°C hasta la aparición de un color amarillo, adicionando 500 μ l de NaCO₃ 1M para detener la reacción ya que este reactivo eleva el pH de la reacción a 11, en el cual es inactiva la enzima. Posteriormente se lee en espectrofotómetro a 420 nm y se calcula la actividad de β -galactosidasa (unidades de β -gal) del extracto por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad} = \frac{\text{D.O.} \times \text{Factor de dilución} \times 100}{\text{tiempo en hrs.}}$$

Ensayo de actividad Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT)

El volumen de extracto a usar en estos ensayos, está en función de la actividad de β -galactosidasa observada.

En un tubo de microfuga se coloca el extracto ajustando a un volumen de 120 μ l con tampon Tris-HCl 0.25M pH 7.5 y se añade secuencialmente 5 μ l de una solución de 20mM de Acetil coenzima A (Sigma, almacenada a -20°C durante una semana como máximo) y 2 μ l de ¹⁴C-Cloranfenicol (0.5 μ ci), mezclando suavemente e

incubando durante una hora a 37°C (estando en el tiempo de la fase lineal de la reacción). Es esta reacción la enzima CAT cataliza la acetilación del cloranfenicol en posición 1,3 usando la acetil CoA como sustrato. Al término de este tiempo, se adicionan 500 µl de acetato de etilo para detener la reacción y se agita vigorosamente con vortex durante un minuto. Se centrifuga a máxima velocidad en la microfuga por 5 min a 4°C y se recupera la fase orgánica, la cual se pasa a otro tubo (teniendo extremo cuidado de no extraer la fase acuosa), dejando evaporar el acetato de etilo por dos horas en un desecador al vacío (Speedvac). Posteriormente la pastilla se resuspende en 30 µl de acetato de etilo agitando vigorosamente, se centrifuga unos segundos y se resuspende con micropipeta (5 veces). Cada muestra se aplica en una placa de sílica gel (fase fija) en puntos trazados previamente (1.5 cm de distancia entre cada uno y 2 cm del extremo inferior); esta placa se coloca en un tanque para cromatografía, el cual contiene una mezcla de cloroformo y metanol en proporción 19:1 equilibrada 24 horas antes (fase móvil), se corre la cromatografía por espacio de 1.5 hrs y se expone en una placa radiográfica por 24 hrs mínimo.

Después se revela la placa, en la cual se observan las formas acetiladas y no acetiladas del ¹⁴C-Cloranfenicol debido a sus diferentes solubilidades en estos solventes orgánicos. Se marcan y se cortan las manchas en la placa de sílica gel correspondientes a dichas formas del ¹⁴C-Cloranfenicol; se coloca cada muestra en un vial con 5 ml de líquido de centelleo (PPO

{2,5-Difeniloxasol} 0.02M, POPOP (1,4-bis-2-[5-feniloxasolil]-Benceno) 8×10^{-6} M) para cuantificarlo en un contador de centelleo y obtener el porcentaje de acetilación. Esta actividad de la enzima CAT refleja la actividad basal del promotor así como el efecto del transregulador sobre éste.

RESULTADOS

CARACTERIZACION DEL PLASMIDO pCMV-RB.S

El plásmido pCMV-RB.S tiene un tamaño de aproximadamente 9220 pares de bases y contiene el ADNC del gen de retinoblastoma, clonado frente al promotor de Citomegalovirus, lo que permite una alta eficiencia de expresión del producto proteico en células de mamífero. Esta característica fue sumamente importante para el desarrollo de este trabajo.

Este plásmido fue construido por Efraín Garrido y Nobuo Horikoshi en el Instituto Wistar de Philadelphia, Pensylvania U.S.A., en 1991 y la estrategia de clonación se muestra en la figura 4.

El plásmido pCMV-RB.S se caracterizó mediante digestiones con enzimas de restricción, determinando así el tamaño del fragmento del ADNC insertado. Este ADNC está clonado en sentido 5'-3', dentro del vector de expresión pCMV4-RS que posee todas las características (señales de expresión) necesarias para replicar, transcribir y traducir un gen clonado de interés en una célula eucariótica (ver Metodología).

Con el programa de computadora PC GENE se obtuvo de la base de datos "GenBank", la secuencia del gen RB humano reportada por Lee y col. (1987a), además de la representación de sitios de corte para diferentes endonucleasas de restricción señalados a lo largo de la secuencia. Este ADNC se obtuvo a partir del ARNm completo del gen RB que comprende 4600 pb aislado de una genoteca

de retina fetal o placenta.

El vector pCMV4-RS posee una región con múltiples sitios de clonación ("polylinker") y se cuenta con un mapa que presenta los sitios únicos de corte para diferentes enzimas.

Para digerir el pCMV-RB.S se usaron diferentes endonucleasas de restricción, evitando utilizar aquellas que generaban gran número de bandas (Acc I, Alu I, Dde I, Pac I), debido a que poseen múltiples sitios de reconocimiento en la secuencia del gen RB, y aquellas que cortan el ADN en secuencias diferentes de reconocimiento.

El ADN se incubó con las diferentes enzimas bajo las condiciones óptimas de reacción durante dos horas, se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se tomó una fotografía instantánea en blanco y negro. Posteriormente, se midió la distancia de corrimiento de cada banda (cm) y tomando como referencia las distancias de corrimiento de un patrón de restricción ya conocido, se graficaron e interpolaron los datos para obtener el tamaño (pb) de cada banda.

En la figura 7 se observa el patrón de restricción de pCMV-RB.S con las endonucleasas de restricción Cla I, Sac II, Eco RV, Xho I, Kpn I, Apa I, Hind III, Xba I, Sma I, Eco RI, Pst I, Bgl II y Ban I.

La digestión con las enzimas Cla I, Sac II, Eco RV, Xho I y Kpn I generan una sola banda de aproximadamente 9200 pb (Fig. 7 carriles 2 al 7, respectivamente). Esto significa que cortan en un sólo sitio por lo que con estas enzimas de restricción, es

PATRON DE RESTRICCION DEL PLASMIDO pCMV-RB.S

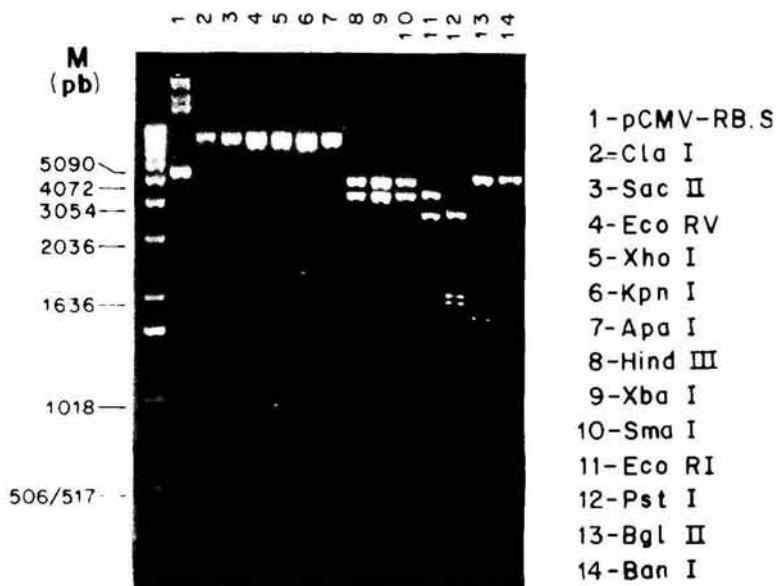


Figura 7. Patrón de restricción del plásmido pCMV-RB.S con diferentes endonucleasas. La fotografía del gel de agarosa al 1%, muestra los fragmentos de ADN obtenidos de pCMV-RB.S (carril 1) para cada una de las enzimas de restricción que se indican en la lista presente (correspondientes a los carriles 2 al 14). En el extremo izquierdo del gel se muestra el corrimiento del marcador de peso molecular (M de 1 Kb) con sus respectivos tamaños (pb).

posible linearizar el pCMV-RB.S (comparando con el carril 1 no digerido), lo cual es una condición esencial para determinar el tamaño de cualquier ADN plasmídico. Sin embargo, al menos en esta fotografía no fue posible señalar el tamaño de este ADN por el corrimiento estrecho de los fragmentos de mayor peso molecular del marcador de peso (1Kb DNA Ladder de GIBCO BRL).

Con la enzima Hind III se observan dos bandas de aproximadamente 4900 y 4317 pb (Fig. 7 carril 8) que corresponden al vector pCMV4-RS y al fragmento del ADNc del gen RB, respectivamente. De acuerdo con la estrategia de clonación para obtener el plásmido pCMV-RB.S (Fig. 4), el vector se linearizó con la enzima Hind III, mientras que en el extremo 5' del ADNc de RB se adiciona una secuencia de ADN de reconocimiento para varias enzimas de restricción ("polylinker") de aproximadamente 35 pb, dejando extremos cohesivos para su ligación.

Por otra parte, en el plásmido pCMV-RB.S, de acuerdo a los resultados del patrón de restricción, se obtuvo un fragmento de 4317 pb aproximadamente, contrario al tamaño del ADNc completo de 4600 pb que es lo que se esperaría.

En la posición 4023 del fragmento de RB se señala un sitio de corte para Hind III (Fig. 4). Es posible suponer que probablemente exista una mutación puntual en este sitio que impide el reconocimiento para esta enzima.

Haciendo un análisis detallado de la secuencia del gen RB, se denota que en el sitio 4313 existe una secuencia similar a la secuencia consenso de reconocimiento para Hind III (cambio de una

A por un G en la tercera posición), lo que permite sugerir que probablemente este sitio es el extremo 5' del gen RB clonado.

Cuando el plásmido se digiere con las enzimas Xba I y Sma I, se obtienen dos bandas de aproximadamente 5000 - 4200, y 4950 - 4320 pb, respectivamente (Fig. 7 carriles 9 y 10) mostrando el mismo patrón de bandas que con Hind III.

Al respecto, es posible suponer que en el "polylinker" de 35 pb arriba mencionado, se encuentren secuencias de reconocimiento para estas dos enzimas. Además en la región "polylinker" del vector se encuentran los sitios de corte para Xba I y Sma I cercanos al sitio Hind III, quedando hacia el lado 3' del fragmento de ADNc de RB cuando éste ha sido clonado. De esta manera, se sugiere que también se separan el vector y el fragmento cuando se digiere pCMV-RB.S con Xba I y Sma I.

La digestión con Eco RI, genera tres fragmentos de aproximadamente 4340, 3650 y 1260 pb. Este patrón sugiere que existe un sitio único de corte dentro de la secuencia del gen RB y dos en el vector.

El resto de las enzimas generan cuatro fragmentos de peso molecular aproximados de: 3900, 2100, 1980 y 1230 pb para Pst I; 5500, 1750, 1300 y 850 pb para Bgl II; y 5800, 1220, 1150 y 1060 pb para Ban I (Fig. 7 carriles 12, 13 y 14). De estas tres enzimas se desconocen sus sitios de restricción dentro del plásmido completo.

Para conocer específicamente el patrón de restricción para las enzimas Eco RI, Pst I, Bgl II y Ban I dentro del fragmento

clonado o del vector, se prosiguió a separar el fragmento del ADNc del gen RB del vector pCMV4-RS mediante la digestión con la enzima Hind III.

Una vez purificados estos fragmentos de ADN por el método de purificación con perlas de vidrio ("Gene Clean"), se sometieron a la digestión con las mismas endonucleasas para determinar el sitio de corte posible para estas enzimas y el tamaño de los fragmentos generados en el ADNc de RB, principalmente.

En la figura 8 se muestra el patrón de restricción del fragmento de ADNc del gen RB y del vector pCMV4-RS. El fragmento purificado se digirió con las enzimas Sac II, Eco RV, Xba I, Eco RI, Pst I y Bgl II; mientras que el vector, con las enzimas Xho I, Kpn I, Apa I, Xba I, Sma I, Eco RI, Bgl II, Ban I y Cla I. Esta distribución de enzimas se realizó de acuerdo a la posición de los sitios de restricción mencionados.

La digestiones del fragmento con Sac II y Xba I (Fig. 8 carriles 3 y 5 respectivamente) muestran una sola banda que corresponde al corrimiento del fragmento sin digerir (carril 1). El sitio de restricción para Sac II se localiza en el nucleótido 53 de la secuencia de RB y para Xba I se localiza en el "polylinker" de 35 pb añadido al extremo 5' del fragmento.

Con lo anterior se sugiere que: 1) Bajo las condiciones de corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% no es posible distinguir fragmentos de ADN menores de 100 pb, que se supone se generan de la digestión con estas enzimas, y 2) Es

**PATRON DE RESTRICCION DEL FRAGMENTO
DE ADNC DEL GEN RB Y DEL VECTOR
pCMV4-RS**

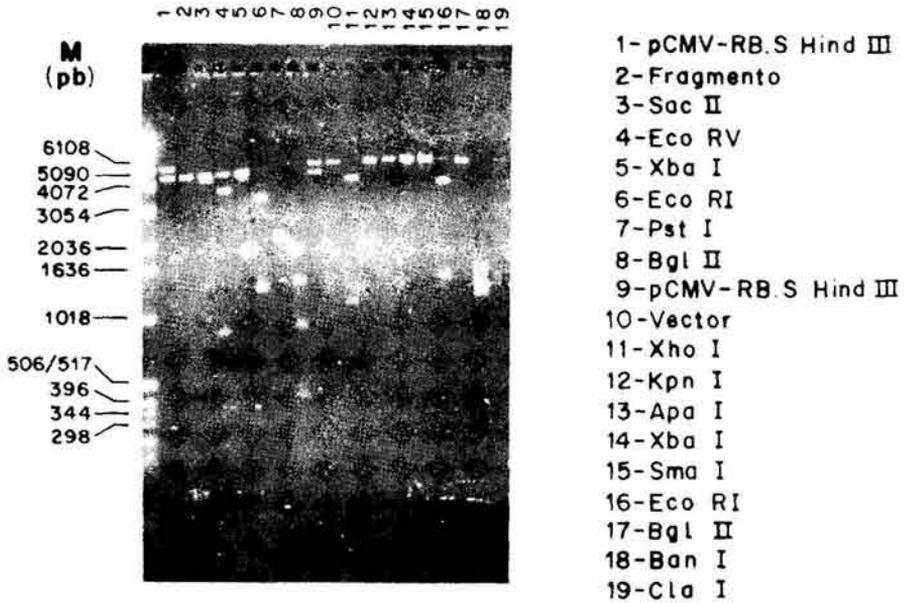


Figura 8. Patrón de restricción del fragmento de ADNc del gen RB y del vector pCMV4-RS. La fotografía del gel de agarosa al 1%, muestra los fragmentos de ADN obtenidos del ADNc de RB (carril 2) y de pCMV4-RS (carril 10) para cada una de las enzimas de restricción que se indican en la lista presente (carriles 3 al 8 y 11 al 19, respectivamente). La obtención de ambos fragmentos a partir de la digestión de pCMV-RB.S con la enzima Hind III, se señalan en los carriles 1 y 9. En el extremo izquierdo del gel se muestra el marcador de peso molecular (M de 1 Kb) con sus respectivos tamaños (pb).

necesario utilizar geles de agarosa de otra concentración o geles de acrilamida para ADN que permitan lograr mejor y mayor resolución de bandas de bajo peso molecular. Por lo tanto, a pesar de los resultados, no se descarta la presencia de los sitios de restricción para Sac II y Xba I.

En la figura 8 (carriles 4 y 6) se observan dos bandas del tamaño esperado de acuerdo a los sitios de corte para Eco RV y Eco RI que se localizan respectivamente en los nucleótidos 543 y 903 de la secuencia del gen.

Con la enzima Pst I (carril 7) se observan dos bandas de aproximadamente 2280, 2200. Ya que se esperaban fragmentos de 2280, 1860 y 260 pb de acuerdo a los sitios de restricción de la secuencia de RB localizados en los nucleótidos 1805 y 2065, el resultado sugiere que se trata de una digestión parcial, y que la enzima sólo cortó en un sitio (posiblemente en el 2065).

Con la enzima Bgl II, se obtienen 4 bandas de aproximadamente 1980, 1400, 790 y 250 pb. Con ello se deduce que existen tres secuencias de reconocimiento de esta enzima dentro del fragmento, las cuales se presentan en los nucleótidos 990, 1834, y 3631 de la secuencia del ADNc del gen RB.

Por otra parte, las digestiones del vector con las enzimas Kpn I, Apa I, Xba I, Sma I, Bgl II y Cla I (Fig. 8 carriles 12 al 15, 17 y 19, respectivamente) generan un patrón de restricción similar al vector sin restringir (carril 10). No obstante, los sitios de restricción de estas enzimas se localizan a pocos nucleótidos del sitio Hind III flanqueando hacia el lado 5' (957

Bgl II, 963 Kpn I, 975 Cla I, y hacia el 3' (1005 Xba I, 1016 Sma I, 1180 Apa I) y formando parte del "polylinker" del vector (Fig. 4).

La digestión con la enzima Eco RI (Fig. 8 carril 16), genera dos bandas de aproximadamente 3600 y 1300 pb. El fragmento más grande es resultado de una digestión parcial, ya que se esperarían tres bandas de acuerdo al patrón de restricción del plásmido completo obtenido con esta misma enzima. Tomando en cuenta además el tamaño de las bandas obtenidas del fragmento de RB cortado con Eco RI, se sugiere que los dos sitios de restricción se localizan aproximadamente en los nucleótidos 1252 y 2512 del vector.

La enzima Xho I también genera dos bandas (carril 11) que coinciden con el sitio de restricción localizado en el nucleótido 2007 del vector.

Por último, la restricción con Ban I genera cuatro bandas de peso aproximado de 1600, 1400, 1350 y 1280 pb. Considerando el patrón de restricción del plásmido completo, se esperarían únicamente tres bandas para el vector; sin embargo debido a los tamaño cercanos de las bandas, es probable que hubiera ocurrido una digestión parcial correspondiente a cualquiera de estas bandas. Por ello es recomendable analizar en detalle la secuencia del vector y determinar los sitios de restricción que por el momento no sería correcto inferir.

Con base en los patrones de restricción anteriormente descritos y tomando el sitio 1 a partir del origen de

replicación de ADN del bacteriofago f1 dentro del vector pCMV4-RS (Fig. 4), se determinó y elaboró el mapa de restricción de pCMV-RB.S que se muestra en la figura 9.

Si bien es necesario encontrar aun más sitios de corte para diferentes endonucleasas de restricción, es importante también determinar su posición en el mapa que permita usar posteriormente este plásmido para subclonaciones que consigan introducir algunas deleciones o mutaciones puntuales localizadas que alteren el producto del gen de retinoblastoma dentro de algunos de los dominios importantes para su función.

ENSAYOS DE TRANSFECCION TRANSITORIA Y ENSAYOS ENZIMATICOS

Para demostrar la participación del producto del gen RB en la regulación de la transcripción de genes celulares y virales, se realizaron ensayos de transfección transitoria por el método de fosfato de calcio en la línea celular C-33A. Esta metodología permite examinar la actividad transcripcional de secuencias de ADN después de la introducción de estos elementos a células apropiadas.

C-33A es una línea celular derivada de un carcinoma cervical humano, que expresa una proteína Rb mutada. Mediante un análisis de los productos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para esta línea celular a partir del ADNc del gen RB, se encontró una deleción de 12 pares de bases en el extremo 5' del exón 20 (Scheffner et al., 1991). Este exón se localiza dentro de la región de la proteína Rb necesaria para unirse a la proteína E1A

MAPA DE RESTRICCIÓN DEL PLASMIDO pCMV-RB.S

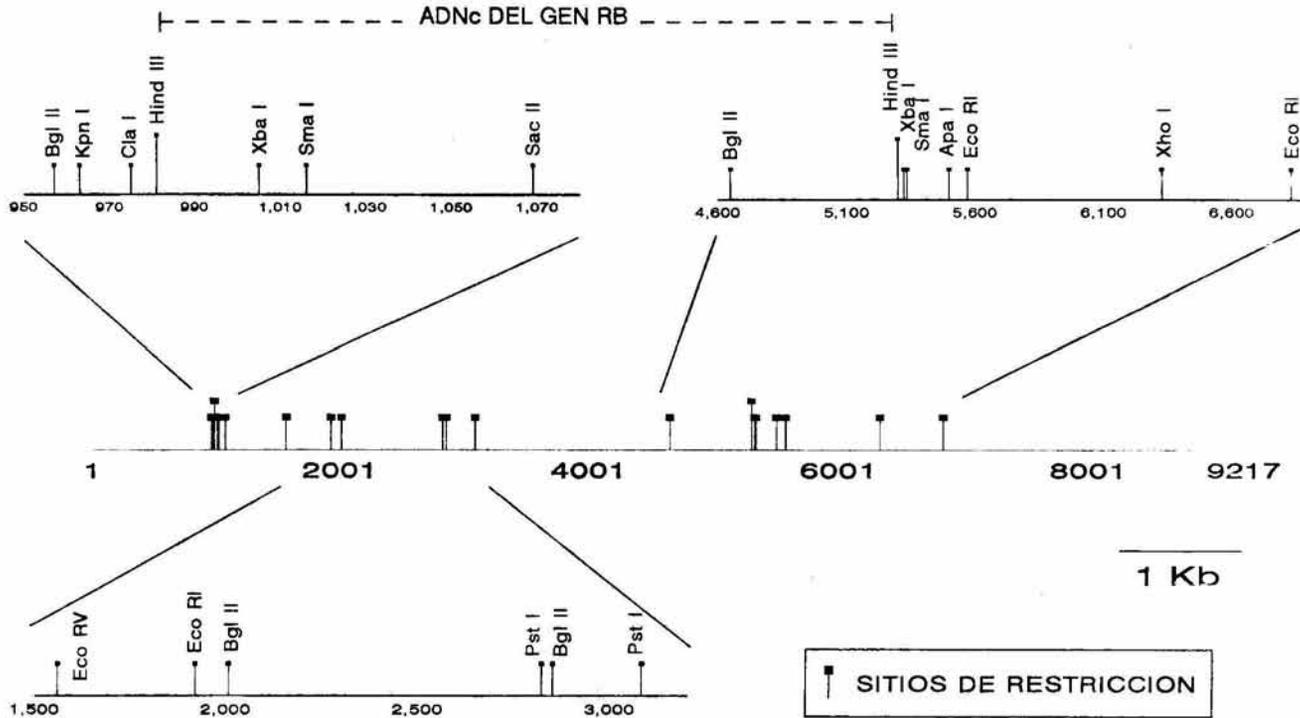


Figura 9. Mapa de restricción del plásmido pCMV-RB.S. El mapa central muestra la representación lineal de pCMV-RB.S donde en sitio 1 corresponde al origen de replicación del bacteriofago f1, e indicando el ADNc del gen RB dentro del vector pCMV4-RS (barras grandes). A partir del sitio 1 y de acuerdo a los sitios de restricción del ADNc de RB y de pCMV4-RS ya establecidos, se señalan la posición para cada una de las enzimas de restricción en pCMV-RB.S.

de Adenovirus.

A) Eficiencia de Transfección

La eficiencia de transfección de cada caja de cultivo celular es variable dependiendo de la concentración de ADN plasmídico que haya entrado a la célula como precipitado de fosfato de calcio.

El plásmido pRSV β -gal que posee el gen que codifica para la enzima de β -galactosidasa, sirvió como marcador de la eficiencia de transfección detectando la actividad de su producto proteico 48 horas post-transfección mediante un ensayo enzimático.

Para determinar la cantidad óptima de plásmido pRSV β -gal que se debe utilizar en cada transfección en la línea celular C-33A, se realizaron ensayos de transfección en cultivos en cajas de 60 mm de diámetro (p60) utilizando concentraciones crecientes de pRSV β -gal (1, 2, 3 y 5 μ g de ADN) y completando a una concentración final de 10 μ g de ADN totales con el plásmido pUC 19 para completar por cada caja de cultivo. Se realizaron tres repeticiones de este protocolo.

En este ensayo, los extractos celulares se ajustaron a la misma concentración de proteínas totales entre las muestras transfectadas con la misma cantidad de ADN. Para monitorear la actividad enzimática de β -galactosidasa, resultante de la degradación del ONPG en galactosa y orto-nitrofenol, se midió la densidad óptica a 420nm. Con estos valores junto con el tiempo de incubación (2.5 hrs.) y el factor de dilución de la reacción

(10), se calculó la actividad en unidades de β -gal (ver Metodología).

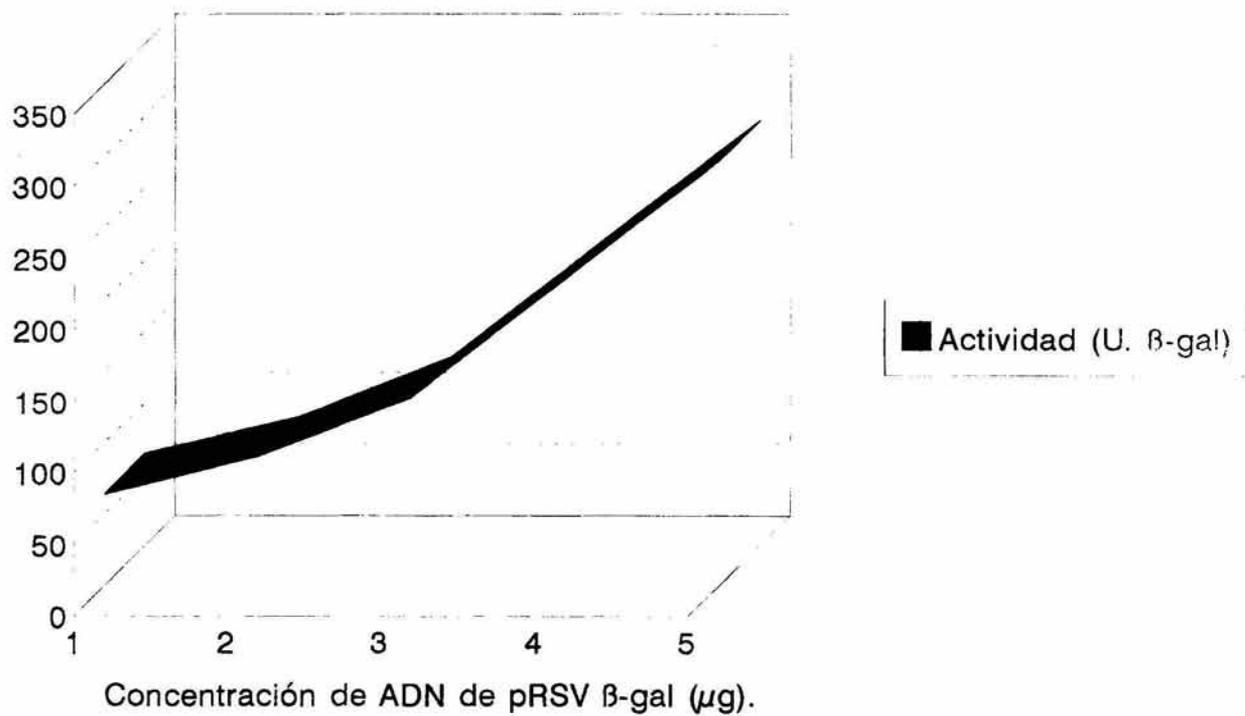
En la gráfica 1 se observa la expresión del plásmido pRSV β -gal transfectado en células C-33A. El gráfico ilustra que los valores de actividad enzimática de β -galactosidasa aumentan proporcionalmente con la concentración de ADN transfectado. Así, las unidades de β -gal resultantes son de 64, 90, 132 y 297 con 1, 2, 3 y 5 μ g de ADN transfectados, respectivamente (Tabla 3).

A pesar de que se esperaría obtener un pico de actividad enzimática con cantidades bajas de pRSV β -gal, como se ha observado transfectando otras líneas celulares tales como COS y SW13 (Guido, 1991), en la línea C-33A aún es posible utilizar hasta 5 μ g de ADN sin observar un decaimiento en la actividad de β -galactosidasa.

Para los posteriores ensayos de transfección transitoria, se usaron 2 μ g de ADN de pRSV β -gal siendo la concentración menor que permitió detectar una apreciable actividad enzimática bajo las condiciones de reacción realizadas (ver Metodología). Esta actividad no se encuentra afectada cuando se cotransfectan otro grupo de plásmidos (ver más adelante), incluyendo a pUC19 que se utilizó en todos los ensayos como plásmido acarreador para completar 10 μ g de ADN totales.

De esta manera, midiendo la concentración de proteínas totales y con los valores de actividad β -galactosidasa, se normalizaron los volúmenes de extractos utilizados en el ensayo CAT, reflejando así las diferencias en la expresión de promotores

EXPRESION DEL PLASMIDO pRSV β -gal TRANSFECTADO EN CELULAS C-33A.



Gráfica 1. Expresión del plásmido pRSV β -gal transfectado en células C-33A. El pRSV β -gal que contiene el gen que codifica para la enzima de β -galactosidasa, se utiliza como control para determinar la eficiencia de transfección. La gráfica indica que la concentración de ADN transfectada (μ g de ADN) está en relación con la actividad de la enzima (unidades β -gal).

CONCENTRACION ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	DENSIDAD OPTICA (420 nm)	ACTIVIDAD (U. β -gal)
1	0.160	64
2	0.225	90
3	0.330	132
5	0.742	297

Tabla 3. Obtención de la concentración óptima necesaria del plásmido pRSV β -gal para utilizar como control de la eficiencia de la transfección en la línea celular C-33A. La cantidad de pRSV β -gal se completó con el plásmido pUC19 a una concentración de ADN total de 10 μg por caja de cultivo p-60 (60mm) transfectada. Para monitorear la actividad enzimática de β -galactosidasa (unidades de β -gal), se midió la densidad óptica a 420 nm, tomando en cuenta además, el factor de dilución de la reacción (10) y el tiempo de incubación ((2.5 hrs) (ver metodología)).

de los genes estudiados.

B) Efecto de pCMV-RB.S en la transcripción de genes celulares y virales.

La participación de la proteína de retinoblastoma (p105^{RB}) en la regulación de la transcripción de genes celulares se ha demostrado básicamente por dos evidencias: 1) Mediante ensayos de transfección transitoria se observó que p105^{RB} reprime la transcripción de genes celulares como c-fos (Robbins et al., 1990) y c-myc (Pietenpol et al., 1990), y 2) En ensayos de interacción de proteínas "in vitro" e "in vivo", se demostró la interacción de la proteína Rb con el factor de transcripción E2F (Chellappan et al., 1991).

Es probable que p105^{RB} esté regulando algunos otros genes importantes para el crecimiento celular. Cuando una célula ha sido infectada por un virus, es posible que p105^{RB} también regule la expresión de los genes virales en el hospedero apropiado.

Para demostrar la función regulatoria de la proteína Rb sobre la expresión transcripcional de genes celulares y virales, se realizaron cotransfecciones en la línea celular C-33A. Para ello, se utilizaron construcciones plasmídicas que poseen promotores de interés clonados frente al gen reportero CAT, con el plásmido pCMV-RB.S que expresa en altas concentraciones a la proteína de retinoblastoma.

En la figura 6 se muestra la lista de los plásmidos empleados con sus correspondientes promotores clonados.

Inicialmente para determinar la concentración óptima de los

plásmidos (pMYC-CAT, pE, pGC9, p18/42, pTkm y pAP1) a utilizar para obtener una actividad detectable de cada promotor, se cotransfectaron en la línea celular C-33A con 3, 4 y 5 μ g de cada ADN plasmídico, junto con 2 μ g de pRSV β -gal y para completar a 10 μ g totales con pUC 19.

En este ensayo se ajustaron los valores para el ensayo CAT únicamente midiendo la eficiencia de la transfección (Ensayo β -gal).

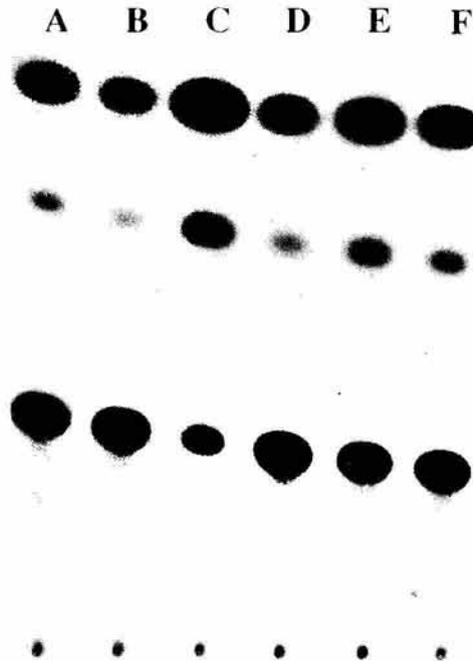
Los resultados mostraron que con 5 μ g de ADN de pMYC-CAT, pE y p18/42 y con 3 μ g de pGC9, pTkm y pAP1 transfectados son necesarios y suficientes para observar una actividad transcripcional basal (Fig. 10). Esta actividad se determinó monitoreando la actividad de la enzima CAT, la cual transforma el cloranfenicol (14 C-Cm) en derivados mono y di-acetilados, que se distinguen fácilmente en una cromatografía de placa fina en sílica gel.

Al cuantificar la radiactividad (cpm) de las formas acetiladas con respecto a la forma no acetilada del cloranfenicol, se calcularon los valores de porcentaje de acetilación de la actividad enzimática de CAT, lo que permitió comparar cuantitativamente sobre la actividad transcripcional de los promotores.

Posteriormente se realizaron los ensayos de cotransfección con el transregulador pCMV-RB.S, con los plásmidos que poseen los promotores celulares y los virales.

En un ensayo de transfección transitoria en células C-33A,

ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL BASAL DE PROMOTORES CELULARES Y VIRALES



A.- pMYC-CAT 5ug

B.- pE 5ug

C.- pGC9 3ug

D.- p18/42 5ug

E.- pTKm 3ug

F.- pAP1 3ug

Figura 10. Actividad transcripcional basal de los promotores celulares y virales. La cantidad de ADN transfectado en células C-33A para observar una actividad transcripcional basal son de 5 μ g para pMYC-CAT, pE y p18/42 y 3 μ g para pGC9, PTKm y pAP1. Esta actividad se determina monitoreando la actividad de la enzima CAT, la cual transforma el cloranfenicol (14 C-Cm) en derivados mono- y di-acetilados. Cada construcción plasmídica posee los promotores de interés clonados frente al gen reportero CAT (Cloranfenicol acetiltransferasa).

se cotransfectaron 5 μ g de ADN del plásmido pM/C-CAT (el cual posee el promotor celular del gen c-myc), sin y con 3 μ g de ADN del plásmido transregulador pCMV-RB.S, que como ya se mencionó posee el gen de RB.

Los resultados de los ensayos de la actividad enzimática de CAT en pMYC-CAT demostraron que cuando se cotransfecta junto con pCMV-RB.S se abate la actividad de CAT (comparada con pMYC-CAT únicamente), visualizada por una disminución en la proporción de cloranfenicol mono-acetilado (Fig. 11). Estos resultados se representan cuantitativamente en la gráfica 2, donde el 20.55% y el 4.7% de acetilación corresponden a la actividad de CAT en ausencia y presencia de pCMV-RB.S transfectado (Tabla 4).

Este resultado sugiere que p105^{RB}, la cual se expresa con alta eficiencia por pCMV-RB.S, disminuye eficientemente la transcripción de ese promotor y por tanto, la expresión de la enzima CAT. Además es probable que p105^{RB} por algún mecanismo regule la expresión en el promotor de c-myc.

Este ensayo resultó ser un control positivo, ya que Pietenpol y col. (1990) observó que p105^{RB} reprime la transcripción de c-myc en ensayos de transfección transitoria.

Cuando se cotransfectaron 5 μ g del plásmido pE (promotor del gen de la albúmina de rata) junto con 3 μ g de pCMV-RB.S, también se observó una disminución de la actividad de CAT (Fig. 11). Los valores de acetilación correspondientes son de 8.60 y 3.98 sin y con pCMV-RB.S (Gráfica 2, Tabla 4).

Estos resultados sugieren que la proteína Rb actúa sobre el

**EFFECTO DE pCMV-RB.S SOBRE LA ACTIVIDAD
TRANSCRIPCIONAL DE PROMOTORES
CELULARES**

pMYC-CAT

pE



-

+

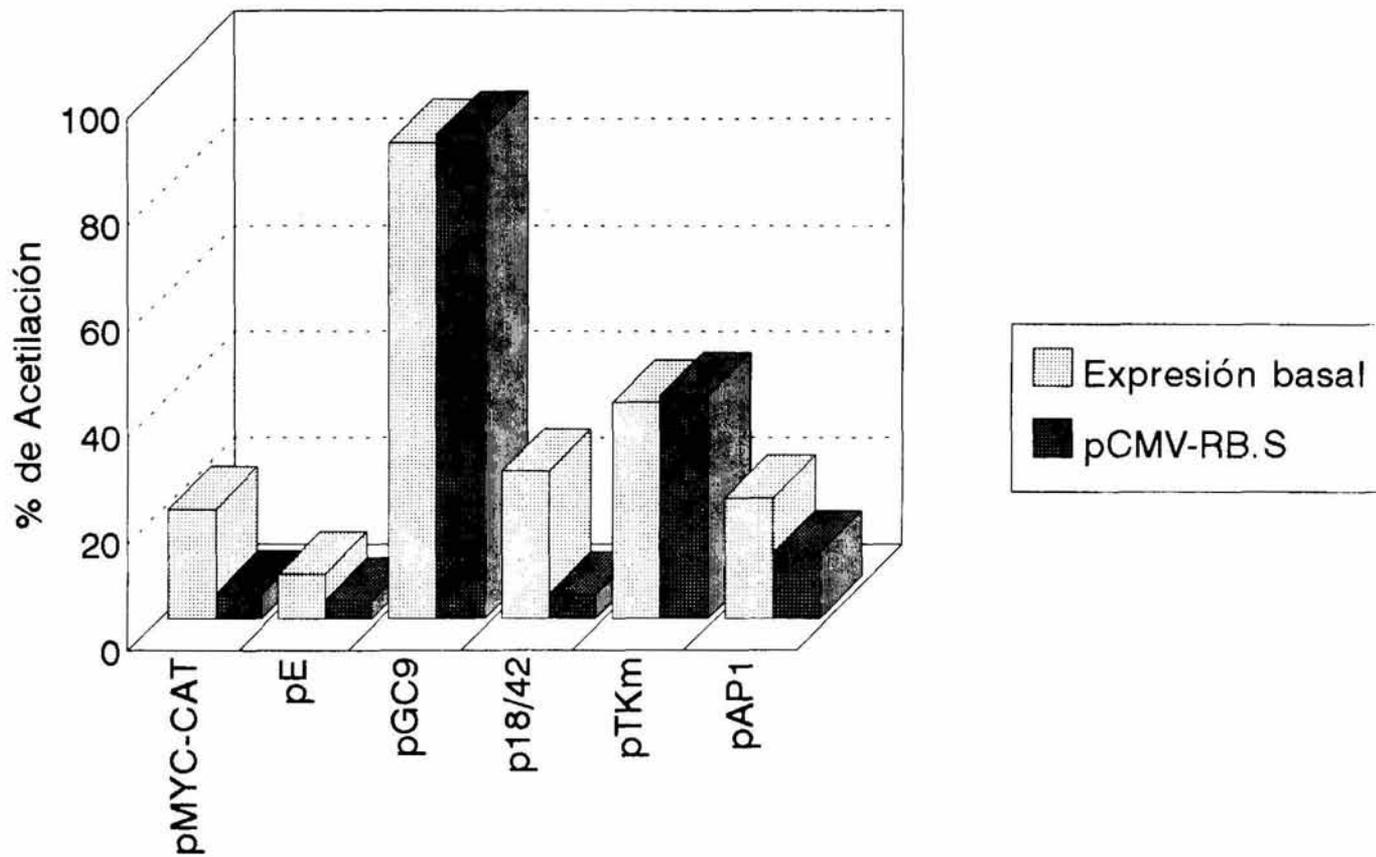
-

+

3 ug ADN pCMV-RB.S

Figura 11. Efecto de pCMV-RB.S sobre la actividad transcripcional de los promotores celulares. p105^{RB} (3 μ g de ADN de pCMV-RB.S), reprime la transcripción del promotor c-myc humano (pMYC-CAT) y el de albúmina de rata (pE). Esta represión se determinó monitoreando la actividad de la enzima CAT.

EFFECTO DE pCMV-RB.S SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE PROMOTORES CELULARES Y VIRALES.



Gráfica 2. Efecto de pCMV-RB.S sobre la actividad transcripcional de promotores celulares y virales. La gráfica muestra los valores de actividad de CAT (% de acetilación) obtenidos de la actividad de los promotores celulares de c-myc humano (pMYC-CAT) y de albúmina de rata (pE), así como del promotor temprano de SV40 (pGC9), de la región control de HPV-18 (p18/42), del promotor de la timidina cinasa de HSV sin y con el sitio AP-1 de HPV-18 (pTKm y pAP1, respectivamente). Esta actividad se compara en ausencia (expresión basal) o en presencia (pCMV-RB.S) de p105^{RB}.

PLASMIDOS CAT	PROMOTOR	pCMV-RB.S	% ACETILACION
pMyc-CAT	c-myc	-	20.5
		+	4.7
pE	albúmina de rata	-	8.3
		+	3.5
pGC9	LTR temprano SV40	-	89.0
		+	91.0
p18/42	LCR HPV-18	-	27.6
		+	4.5
pTKm	LTR TK de HSV	-	40.6
		+	42.2
pAP1	AP1 de HPV-18 en pTKm	-	22.7
		+	12.3

Tabla 4. Valores de actividad de CAT obtenida de extractos citoplasmáticos de células C-33A cotransfectadas con plásmidos cuyas construcciones poseen promotores celulares o virales frente al gen reportero CAT, sin (-) y con (+) el plásmido tranregulador pCMV-RB.S, que expresa con alta eficiencia el producto del gen de RB. El % de acetilación se obtiene de la relación de la radiactividad (cpm) de ¹⁴C-cloranfenicol en su forma acetilada entre el total de radiactividad (que incluye tanto las formas acetiladas y no acetiladas del cloranfenicol), multiplicado por 100.

promotor del gen de albúmina de rata regulando la actividad transcripcional.

Por otro parte, se realizaron los ensayos de cotransfección transitoria en las células C-33A con los plásmidos pGC9, p18/42, pTKm y pAP1, cuyas construcciones poseen regiones regulatorias virales (Tabla 4) sin y con el plásmido transregulador pCMV-RB.S.

En la Figura 12 se observa que cuando se cotransfectan 3 μ g de ADN de este plásmido transregulador con 3 μ g de pGC9 o con 3 μ g de pTKm, no afecta la actividad transcripcional de los promotores, comparando con la expresión basal (sin pCMV-RB.S).

Mientras que, una disminución de la actividad CAT se observa con el plásmidos p18/42 (5 μ g) y pAP1 (3 μ g) cuando se cotransfectan con pCMV-RB.S (3 μ g). Los valores cuantitativos de la actividad CAT se muestran en la tabla 4 y se representan en la gráfica 2.

El plásmido pGC9 posee el promotor temprano (LTR) del virus SV40. Weintraub y col. (1992) demostraron que la actividad transcripcional de pSVCAT (Promotor/"enhancer" de SV40) no se ve alterada por p105^{RB} en las líneas celulares CCL64 (de epitelio de pulmón de visón) y L (de ratón).

Este resultado es importante ya que sirvió como control negativo del efecto de p105^{RB} sobre la actividad transcripcional del promotor temprano de SV40 en estos ensayos de funcionalidad.

En el laboratorio donde se realizó este trabajo, se realizan estudios con el HPV tipo 18 de alto riesgo. Este virus se encuentra relacionado con el cáncer cérvico uterino.

Figura 12. Efecto de pCMV-RB.S sobre la actividad transcripcional de promotores virales. p105^{RB} (pCMV-RB.S) abate la actividad transcripcional de la región control del papilomavirus tipo 18 (p18/42) y de AP-1 de HPV-18 en el promotor de la timidina cinasa del virus herpes simple (pAP1), mientras que no afecta la actividad de promotor temprano de SV40 (pGC9) ni del promotor de la timidina cinasa únicamente (pTKm), comparada con la expresión basal.

Uno de los principales temas de investigación ha sido entender la regulación transcripcional por los productos de sus propios genes (E2) (Guido et al., 1992) así como por factores celulares (AP-1, NF1). Por ello se ha tomado como modelo al plásmido p18/42 que posee la Región Larga de Control (LCR) natural del HPV-18, que regula la expresión de los oncogenes del virus.

En la figura 12 se observa el abatimiento de la actividad de la enzima CAT de p18/42 cuando p105^{RB} se expresa en las células C-33A. Los valores de actividad de CAT correspondientes al porcentaje de acetilación son de 27.60 y 4.50 cuando se transfecta sin y con pCMV-RB.S (Gráfica 2, Tabla 4)

Estos resultados sugieren que p105^{RB} afecta negativamente la expresión génica viral, actuando como un regulador transcripcional sobre la Región Larga de control del HPV-18.

Para entender un poco más acerca del efecto de la proteína Rb sobre HPV-18, se utilizó el plásmido pAP1 que fue construido insertando un sitio AP-1 en el extremo 5' de la región regulatoria del gen de Timidina cinasa del Virus de Herpes simple (TK-HSV). También se uso el plásmido pTKm que únicamente posee esta región regulatoria frente al reportero CAT.

Cuando se cotransfecta 3 μ g del el plásmido transregulador pCMV-RB.S con 3 μ g pAP1 se observa una disminución de la actividad transcripcional, comparado con la expresión basal. Sin embargo, cuando se cotransfecta con 3 μ g del pTKm, no se observa ningún efecto sobre la actividad transcripcional sin y con 3 μ g

de pCMV-RB.S, lo cual resultó ser un buen control para comparar el efecto de p105^{Rb} solamente sobre la secuencia AP-1 en este promotor.

Esta comparación se observa claramente cuando se cuantifica la actividad de CAT obteniendo un 40.60 y 42.20% de acetilación resultado de la actividad del promotor de TK-HSV en ausencia y presencia de p105^{Rb}. En cambio los valores de actividad de CAT disminuyen del 27.70 al 12.30% cuando la proteína Rb afecta la actividad del mismo promotor con una secuencia AP1 (Gráfica 2, Tabla 4).

Con lo anterior se sugiere que la proteína Rb afecta la actividad transcripcional de AP1 en las células C-33A.

El sitio AP-1 es una secuencia de ADN de reconocimiento para los factores de transcripción c-fos y c-jun, que se localiza en muchos promotores de genes celulares eucarióticos.

Para entender el mecanismo de represión de p105^{Rb} sobre HPV-18, se realizaron ensayos de transfección utilizando además el plásmido transactivador pSG5c-FOS, el cual expresa eficientemente la proteína celular c-fos.

En células C-33A se cotransfectaron 5 μ g de ADN del plásmido pMYC-CAT y 3 μ g de pAP1, cada uno con 5 μ g del transregulador pCMV-RB.S y con 5 μ g de este último mas el plásmido pSG5c-FOS.

Los resultados se muestran en la figura 13. En estos se observa que p105^{Rb} reprime la transcripción de TK-HSV que posee el sitio AP-1 del HPV-18 (plásmido pAP1). Sin embargo, la expresión del producto de c-fos estimula la actividad

EFFECTO DE pSG5c-FOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE pCMV-RB.S EN PROMOTORES CELULARES Y VIRALES

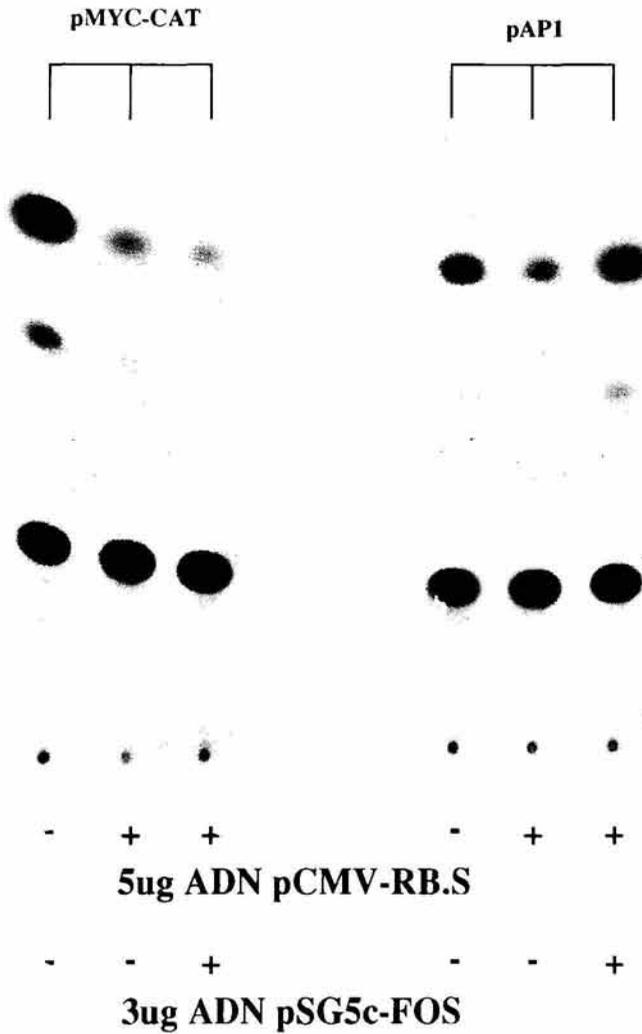


Figura 13. Efecto de pSG5c-FOS sobre la actividad de pCMV-RB.S en promotores celulares y virales. La expresión de c-fos (pSG5c-FOS) estimula la actividad transcripcional de AP-1 de HPV-18 aun en presencia de p105^{RB} (pCMV-RB.S), mientras que no se recupera la actividad transcripcional en el promotor celular de c-myc (pMYC-CAT).

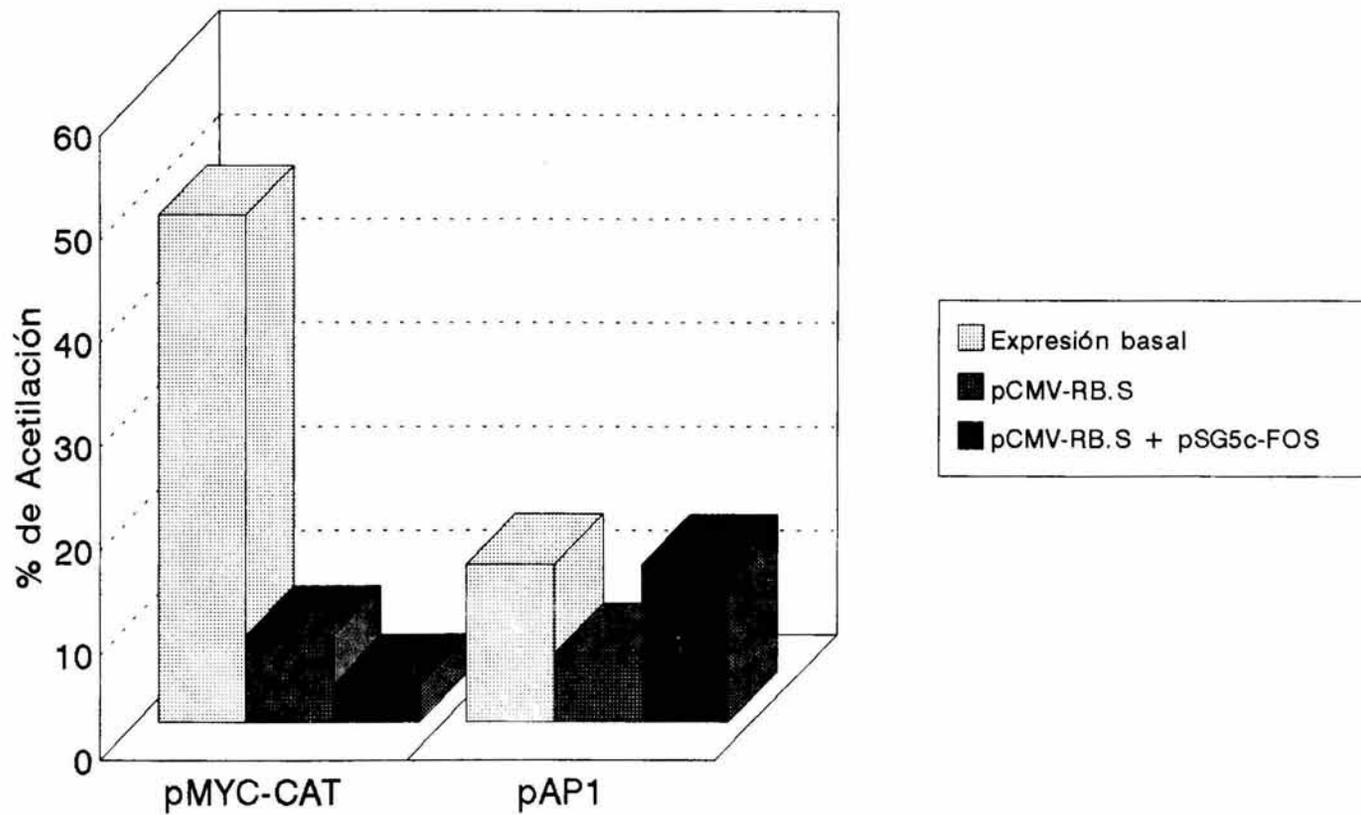
transcripcional de AP-1 muy similar al estado de expresión basal, como se determina con los valores de porcentaje de acetilación de 15.12 y 15.11, respectivamente en los ensayos de CAT (Gráfica 3, Tabla 5).

Estos resultados sugieren que posiblemente exista una inhibición de la expresión del gen c-fos endógeno por p105^{RB}, y que esto sea un resultado de la disminución en el nivel de actividad de AP1, que se recupera cuando hay suficiente c-fos endógeno.

En cambio, la sobreexpresión de c-fos no altera la actividad transcripcional del promotor celular c-myc (Fig. 13), lo cual es esperado ya que no posee secuencias AP-1 capaces de estimular su actividad.

Como ya se ha demostrado p105^{RB} reprime considerablemente el promotor de c-myc en las células C-33A (Gráfica 2). De acuerdo a los valores de actividad de CAT obtenidos en este protocolo (Gráfica 3, Tabla 5), se observa una ligera reducción cuando se co-expresan p105^{RB} y c-fos. Probablemente la presencia de otros factores de transcripción estimulados por c-fos alteren la expresión del promotor de c-myc, aun en presencia de la proteína Rb.

EFFECTO DE pSG5c-FOS SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE pCMV-RB.S EN DIFERENTES PROMOTORES.



Gráfica 3. Efecto de pSG5c-FOS sobre la actividad transcripcional de pCMV-RB.S en diferentes promotores. La gráfica muestra los valores de actividad de CAT (% de acetilación) obtenidos de la actividad del promotor c-myc (pMYC-CAT) y de AP-1 de HPV-18 en TK-HSV (pAP1) en ausencia y presencia de p105^{RB} (pCMV-RB.S) y de c-fos (pSG5c-FOS).

PLASMIDOS CAT	pCMV-RB.S	pSG5c-FOS	% ACETILACION
pMyc-CAT	-	-	48.81
	+	-	8.26
	+	+	3.60
pAP1	-	-	15.12
	+	-	6.58
	+	+	15.11

Tabla 5. Valores de actividad de CAT obtenida de extractos citoplasmáticos de células C-33A cotransfectadas con plásmidos cuyas construcciones poseen promotores celulares (c-myc) o virales (TK de HSV) frente al gen reportero CAT, sin (-) y con (+) el plásmido transregulador pCMV-RB.S, que expresa con alta eficiencia el producto del gen de RB. y el pSG5c-FOS que expresa el producto del gen c-fos. El % de acetilación se obtiene de la relación de la radiactividad (cpm) de ¹⁴C-cloranfenicol en su forma acetilada entre el total de radiactividad (que incluye tanto las formas acetiladas y no acetiladas del cloranfenicol), multiplicado por 100.

DISCUSION

El ADN complementario (ADNc) de un gen eucariótico contiene solo las secuencias de nucleótidos que son traducidas en el producto proteico correspondiente, ya que este es obtenido "in vitro" a partir del ARN mensajero celular.

La Ingeniería Genética ha hecho posible clonar el ADNc específico de un gen en vectores plasmídicos que generalmente están constituidos por elementos que les confieren la capacidad de replicarse en bacterias, por algún promotor viral que les permite transcribir el ADNc en células eucariotas, y señales de expresión necesarias para la traducción correcta a una secuencia de aminoácidos. Este tipo de construcciones han permitido expresar un ADNc específico en células eucarióticas con todas las modificaciones post-traduccionales que se requieren para llevar a cabo su función.

El plásmido pCMV-RB.S posee las características antes mencionadas, y se caracterizó mediante digestiones con endonucleasas de restricción. Con base en el patrón de restricción obtenido del pCMV-RB.S y de los fragmentos purificados correspondientes al ADNc del gen RB y al vector pCMV4-RS, además de la posición conocida de sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción, se obtuvo el mapa de restricción de pCMV-RB.S.

En la figura 9 se muestra el mapa físico de pCMV-RB.S, donde el sitio 1 corresponde al origen de replicación del bacteriófago

f1, localizado dentro del vector. A partir de esta señal, se indican las posiciones de los siguientes sitios de restricción: 963 Kpn I; 957 Bgl II; 975 Cla I; 981 Hind III; 1005 Xba I; 1016 Sma I; 1069 Sac II; 1559 Eco RV; 1919 Eco RI; 2006 Bgl II; 2821 Pst I; 2850 Bgl II; 3081 Pst I; 4647 Bgl II; 5298 Hind III; 5322 Xba I; 5333 Sma I; 5497 Apa I; 5569 Eco RI; 6829 Eco RI; 6324 Xho I.

El plásmido pCMV-RB.S contiene un fragmento de ADNc del gen RB de 4220 pb (el transcrito de ARNm de RB es de 4700 pb) (Lee et al., 1987b). A pesar de ello, con esta construcción fue posible expresar p105^{RB}, y observar sus características funcionales, detectadas mediante ensayos de actividad de Cloranfenicol acetil-transferasa (CAT).

La secuencia de nucleótidos del ADNc de RB completo de células normales, comprende los 27 exones que dan origen a la proteína Rb funcional (Lee et al., 1987b; Hong et al., 1989). Por otra parte, McGee y col. (1989) han descrito la organización genómica del gen RB, que comprende aproximadamente 200 Kb, donde se muestra toda la secuencia del locus de RB, detallándose el tamaño y la posición tanto de los exones y como de los intrones.

Con base en estas dos secuencias de nucleótidos, se encontró que el exón 27 (el exón más grande del gen RB de 1889 pb), posee las secuencias que codifican para los últimos 24 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la p105^{RB}, y una región larga no traducida que incluye los sitios y señales de poliadenilación.

El ARNm de 4.7 Kb, contiene una secuencia corta no traducida hacia el extremo 5', seguida de la región codificadora de 2.7 Kb que da origen a una proteína de 928 aminoácidos, y finalmente, una región grande de 2 Kb no codificadora hacia el extremo 3' (Lee, et al., 1987b).

Con estos datos se determinó que la región codificadora abarca hasta el nucleótido 2789 del ADNc del gen RB, donde se localiza el codón de terminación de la traducción. Por lo tanto, se puede inferir que el fragmento de 4220 pb del ADNc del gen RB clonado en el plásmido pCMV-RB.S incluye toda la secuencia codificadora, sin afectar en absoluto la estructura y expresión de p105^{RB}.

Aunque no se ha discutido claramente la función de la secuencia grande no codificada "in vivo", se sugiere que puede tener un papel importante en la estabilidad del ARNm debido al tamaño tan grande del transcrito, aumentando así la eficiencia de traducción.

Las investigaciones en relación al gen RB se impulsaron de manera sobresaliente con el descubrimiento de los genes supresores de tumor o anti-oncogenes. La inactivación del gen RB por mutaciones o deleciones en ambos alelos y en consecuencia, la pérdida funcional de la proteína Rb como un regulador negativo de la proliferación celular, sugieren que está asociado con el desarrollo de diferentes tumores humanos donde se encuentra frecuentemente alterado.

Actualmente algunos de los aspectos más estudiados de p105^{RB}

es su papel como regulador negativo del ciclo celular.

Los ensayos de transfección transitoria realizados en la línea celular C-33A permitieron analizar algunos de los aspectos moleculares de p105^{RB} como regulador negativo de la transcripción de genes celulares y virales.

La línea celular C-33A derivada de un carcinoma cervical humano, fue un buen sistema de trabajo debido a su alto potencial para ser transfectado por el método de fosfato de calcio y sobre todo, por poseer el gen RB mutado, lo cual favoreció en determinar que el efecto de represión transcripcional de p105^{RB} es debido exclusivamente al ADN introducido a estas células que le permitieron expresar una proteína Rb funcional.

Los resultados obtenidos respecto a la actividad de CAT demostraron efectivamente que p105^{RB} reprime con alta eficiencia la transcripción de los dos genes celulares analizados, el promotor de c-myc y el promotor de la albúmina de rata.

El gen c-myc es un proto-oncogen bien caracterizado que codifica para un factor transcripcional que está involucrado en la activación la proliferación celular. Este gen frecuentemente se encuentra alterado en una gran cantidad de tumores. Sin embargo, actualmente poco se conoce sobre los elementos regulatorios en el promotor de c-myc.

Los mecanismos de represión transcripcional de p105^{RB} ya han sido analizados por ensayos de transfección transitoria en otros sistemas experimentales. A este respecto se sugiere que la forma hipofosforilada de p105^{RB}, la forma activa, reprime la

transcripción de c-myc deteniendo el ciclo celular (Pietenpol et al., 1990).

Un elemento de regulación por el factor TGF- β 1 (TCE) localizado en el promotor P1 de c-myc, es también utilizado por p105^{Rb} para reprimir la transcripción (Pietenpol et al., 1991), aunque no se conoce claramente el mecanismo.

Existe otro mecanismo de regulación por la proteína Rb en el promotor P2 de c-myc, a través de un elemento de unión al factor E2F, necesario para la transcripción de c-myc (Hamel et al., 1992). La interacción de p105^{Rb} con E2F forma un complejo que impide la unión directa de E2F a la secuencia de reconocimiento en el ADN TTTCGCGC, decrementando la transcripción de promotores regulados positivamente por E2F.

De esta manera, se sugiere que pueden presentarse al menos dos maneras diferentes de control de la expresión del gen c-myc por p105^{Rb}, que dependen de algún modo del ambiente celular donde se esté expresando c-myc.

La regulación de c-myc es importante para la transición normal a través del ciclo celular, donde p105^{Rb} puede regular la actividad transcripcional de E2F durante la fase G1 y S.

Recientemente se ha demostrado que p105^{Rb} interactúa físicamente con la proteína c-myc, lo que sugiere que puede existir otra vía de regulación a nivel post-traduccional.

Otro de los genes importantes que regulan el crecimiento celular es c-fos. Cuando se sobreexpresa p105^{Rb}, regula negativamente la transcripción de este gen a través de un

elemento de control a retinoblastoma (RCE) en su promotor, diferente al sitio E2F y al elemento de control por TGF- β 1 (Robbins et al., 1990).

Durante el desarrollo de este trabajo se intentó demostrar el efecto de p105^{RB} sobre el gen de c-fos en la línea celular C-33A, sin embargo no se logró expresar el plásmido que posee el promotor de c-fos frente al gen reportero CAT. Existen diferentes posibilidades para explicar este comportamiento: probablemente es necesaria la presencia de factores esenciales para la activación de c-fos, que no son expresados en cantidades suficientes en la línea celular C-33A; también es posible que algunos factores presentes en esta línea celular actúen como supresores, impidiendo la expresión de c-fos.

El gen de albúmina de rata ha sido estudiado debido a que es un modelo atractivo para analizar la expresión de genes tejido específico, ya que se expresa normalmente en el hígado de organismos adultos.

En el promotor de albúmina de rata se han identificado, además de la caja TATA, otros elementos regulatorios como el elemento proximal (PE), la caja CCAAT, y los elementos distales I, II y III (DELI, DELII y DELIII, respectivamente) (Blumenfeld et al., 1989). Se han caracterizado algunas de las proteínas que reconocen a estos elementos. Una de ellas, APF, se expresa específicamente en tejido hepático, mientras que otras, como ACF/NFY, C/EBP y NF-1, se expresan en diferentes tejidos (Cereghini et al., 1987).

Curiosamente el factor transcripcional NF-1 reconoce una secuencia consenso muy similar al factor E2F (TTTGGCAA), que en el promotor de la albúmina de rata se localiza a -120pb del inicio de la transcripción. Por lo anterior, se sugiere que esta secuencia pudiera ser un sitio posible de reconocimiento para E2F, y que el mecanismo de represión que se observó en los ensayos de actividad CAT, se deben a que p105^{RB} puede interactuar con el E2F celular endógeno y de esta manera, impedir la unión de E2F en el promotor para activar la transcripción del gen de albúmina.

Para determinar si p105^{RB} tiene el mismo efecto sobre la actividad transcripcional del promotor de albúmina en un contexto natural, sería necesario utilizar una línea celular derivada de hígado, en donde se encuentran los demás factores que normalmente se unen al promotor de este gen.

Los virus de ADN han permitido conocer gran parte de los mecanismos del control transcripcional eucariótico, ya que utilizan la maquinaria de transcripción celular.

Estos virus infectan por lo general tipos celulares en un estadio temprano de diferenciación. Esto les permite iniciar su replicación estimulando a las células a entrar en una fase de proliferación continua, para continuar con su ciclo de vida.

Se ha determinado que los virus de ADN denominados tumorales, poseen un papel importante en el proceso de la carcinogénesis.

Cada virus contiene genes que codifican para proteínas con actividad oncogénica, que alteran el control de la proliferación celular y promueven la transformación de una célula normal en cancerosa.

Los papilomavirus humanos que generalmente se asocian a carcinoma cervical, poseen una región que regula la expresión de los genes tempranos, incluyendo aquellos con actividad oncogénica. Esta región contiene sitios de interacción para diferentes factores de transcripción (celulares y virales), que controlan las primeras fases de la infección.

Durante la progresión del proceso de carcinogénesis, con frecuencia los genes que codifican para estos factores reguladores de la transcripción (algunos de ellos, productos de oncogenes y anti-oncogenes celulares), son alterados por mutaciones, deleciones, inserciones o rearrreglos. En consecuencia, la transcripción de los genes virales tempranos se descontrola, expresándose así de manera constitutiva y manteniendo el estado transformado de las células.

De esta manera, se consideró importante analizar el efecto de anti-oncogenes como Rb sobre la actividad transcripcional de los promotores de los virus tumorales de ADN SV40, HPV y TK-HSV.

La actividad transcripcional del promotor temprano (LTR) del virus SV40 no se vió afectada por la presencia del producto del gen RB (p105^{RB}).

Esta misma observación se ha realizado en otras líneas celulares como CCL64 (epitelio de pulmón de visón) y L (de

ratón), donde la actividad transcripcional del promotor/"enhancer" de SV40 no se afecta por p105^{RB} (Weintraub et al., 1992). En estas líneas celulares, que expresan la proteína Rb silvestre, solamente cuando se insertaron dos sitios de unión al factor E2F en el promotor temprano de SV40 frente al gen reportero CAT, existió una considerable disminución en su actividad. Estos resultados apoyan fuertemente el modelo de represión transcripcional de p105^{RB} por E2F.

Construcciones que poseen el promotor temprano de SV40, han sido utilizados con frecuencia para insertar sitios de reconocimiento a factores reguladores de la transcripción y demostrar su actividad, ya que este promotor posee elementos potenciadores que le permiten tener una alta expresión en células eucariotes, como se observó en los resultados de la actividad enzimática CAT, en la que se obtuvo alrededor del 100% de acetilación.

Es muy probable que si se insertan secuencias blanco para E2F en el promotor temprano de SV40 analizado en este trabajo y se analiza el efecto de p105^{RB} en células C-33A, se tendrían resultados similares o idénticos a los obtenidos en la línea celular CCL64. Por otra parte, la actividad transcripcional de la región regulatoria del papilomavirus humano tipo 18 (HPV-18) es claramente reprimida por p105^{RB} en las células C-33A. Hasta el momento, en ningún tipo de HPV se ha reportado esta observación.

Es importante mencionar, que el análisis funcional realizado mediante los ensayos de actividad de CAT, se efectuaron en una

línea celular que no expresa Rb funcional y que además es derivada de un carcinoma cervical (sin HPV).

En general, los papilomavirus humanos se encuentran asociados a lesiones benignas (HPV de bajo riesgo) infectando epitelios escamosos de piel o mucosas. Sin embargo, existen algunos tipos que pertenecen a otro grupo, denominado de alto riesgo, que han sido detectados principalmente en neoplasias intraepiteliales y carcinomas cervicales originadas a partir de un epitelio estratificado de la mucosa genital (zur Hausen, 1987).

El HPV-18 es uno de los más importantes tipos de papilomavirus asociados con cáncer cervical, encontrándose con frecuencia integrado al genoma celular en tumores cérvico uterinos y en diferentes líneas celulares derivadas de ellos.

La región promotora de los genes tempranos de este HPV (LCR) regula la transcripción de los genes E6 y E7, que son las proteínas con potencial oncogénico y transformante. Este promotor es el más estudiado entre los distintos promotores del virus, respecto a los elementos regulatorios que posee y los factores celulares y virales que interactúan con ellos.

Se ha sugerido que la inactivación de la proteína Rb, ya sea por mutación o por la formación de un complejo con la oncoproteína E7 de HPV-18 pueda ocurrir en diferentes etapas de la infección por HPV. Esto explica que la unión entre ambas proteínas sea un paso esencial en la carcinogénesis de los carcinomas cervicales.

Como se ha mencionado, E-F puede activar genes que promueven el crecimiento y algunos otros que poseen funciones esenciales para la replicación del ADN.

El mecanismo de regulación de p105^{Rb} sobre la región larga de control del HPV-18 es más compleja. Esto se debe a que la oncoproteína transformante E7 del virus puede disociar el complejo proteico de Rb con E2F, conduciendo a la activación transcripcional de promotores celulares que responden a este factor.

Sin embargo, el enfoque principal en este trabajo fue determinar cual es el mecanismo de regulación negativo de p105^{Rb} sobre la actividad transcripcional del LCR de HPV-18.

Para determinar si la represión involucraba al factor E2F, primeramente se buscó mediante un programa de computadora, posibles sitios de reconocimiento a E2F en la secuencia de la LCR, tomando en cuenta la secuencia consenso TTTGGCGC de N-myc. De esta forma, se localizaron dos sitios en los nucleótidos 7568 y 7580 con un 87.5% y 75% de homología, respectivamente.

Aunque se necesitan otras evidencias para determinar si realmente la represión de p105^{Rb} sobre el HPV-18 es mediante estos dos posibles sitios de unión a E2F, se propone el mecanismo de represión de p105^{Rb} por E2F sobre el LCR de HPV-18 es el establecido en los modelos de los genes celulares c-myc y albúmina de rata.

Algunos de las ideas experimentales que apoyarían este modelo de represión involucrarían eliminar ambos sitios posibles

de reconocimiento a E2F en el LCR, ya sea por delección cortando el fragmento de ADN definido con enzimas de restricción, o por mutación sitio dirigida. Otra opción sería transferir el fragmento de ADN que comprende los dos posibles sitios E2F únicamente del LCR de HPV-18, a un promotor distinto como del SV40 o del TK-HSV (cuya actividad transcripcional no es modificada por Rb), para observar si estos sitios les confieren la responsividad a Rb. Ambas estrategias serían realizadas mediante ensayos de tranfección transitoria en la línea celular C-33A y analizadas por ensayos de actividad CAT.

Otros sitios de unión para factores nucleares se han localizado en la región regulatoria del HPV-18. Algunos de estos factores son CTF, OCT1, AP-1 y SP1, los cuales mantienen la transcripción temprana de este promotor.

AP-1 es un complejo proteico constituido por heterodimeros que pertenecen a productos de las familias de genes c-jun y c-fos. Estos modulan la transcripción por su unión a la secuencia TGA C/G TCA en la región promotor/"enhancer" de una gran cantidad de genes.

En un estudio previo, se demostró la importancia de los dos sitios AP-1 en el promotor mínimo del HPV-18, encontrándose que la alteración por mutación en cualquiera de ellos, decreta drásticamente la actividad transcripcional del promotor, en diferentes líneas celulares incluyendo a C-33A.

Con base en lo anterior, se propone un segundo modelo de regulación negativa de la proteína Rb en el LCR del HPV-18.

Debido a que p105^{RB} reprime la transcripción del gen c-fos, disminuye directamente la función de activador transcripcional de AP-1, posiblemente interfiriendo en la unión de este factor al promotor (Robbins et al., 1990).

Esto fue demostrado al observar que p105^{RB} reprime la transcripción del promotor de la timidina cinasa del virus herpes simple (TK-HSV) cuando se le coloca el sitio AP-1 del LCR del HPV-18.

Los resultados de transfección transitoria en las células C-33A, cuando se expresa p105^{RB} junto con el producto del gen c-fos, incrementan la actividad transcripcional del promotor AP-1 TK-HSV. Este incremento no se observa cuando el análisis se realiza en el promotor celular c-myc donde naturalmente no existen secuencias AP-1.

Con base en lo anterior, se propone que p105^{RB} reprime el gen c-fos endógeno impidiendo formar el heterodimero jun/fos para interactuar en el sitio AP-1 del LCR del HPV-18 y activar la transcripción. De esta manera, p105^{RB} regula negativamente la transcripción del HPV-18 por una reducción en el nivel de actividad de AP-1, resultado de una disminución en la expresión de c-fos.

Lo anterior se demuestra cuando se realizan ensayos en los que se eleva la cantidad de c-fos en la célula (mediante la expresión de c-fos exógeno) y se favorece su interacción con c-jun endógeno; aumentando por tanto la capacidad de formar el complejo AP-1 y activando la transcripción, aun en presencia de

p105^{hb}.

Es necesario acumular aún más evidencias experimentales para determinar con certeza este segundo mecanismo de represión por p105^{hb}.

CONCLUSIONES

La Investigación en Fisiología y Medicina se ha beneficiado enormemente con el desarrollo de la Biología Molecular. Esto ha permitido iniciar el entendimiento de los mecanismos moleculares de regulación de la expresión genética.

Evaluar el efecto de p105^{RB} sobre la actividad transcripcional de los promotores celulares y virales, es una pequeña aportación sobre la definición de los mecanismos básicos de regulación que establecen el control de la división celular y un soporte fuerte para entender los mecanismos que originan el cáncer.

Los estudios moleculares de la participación de los genes supresores de tumor o anti-oncogenes, han contribuido a establecer algunos de los eventos importantes durante la carcinogénesis, principalmente la inactivación de los genes y la pérdida de la función de sus productos.

Con la caracterización del plásmido pCMV-RB.S se determinaron los sitios de corte para diferentes enzimas de restricción, dentro del gen RB. A partir de esta construcción plasmídica, es posible ahora aislar o modificar algunos de los dominios importantes para la función del producto del gen RB, p105^{RB}.

Los ensayos de funcionalidad como las transfecciones transitorias en cultivos celulares eucarióticos, permiten determinar la actividad de la proteína Rb sobre la transcripción

de genes específicos, en un ambiente natural que permite comprender mejor su comportamiento "in vivo".

La línea celular C-33A es un sistema apropiado para analizar la actividad de p105^{RB}, ya que posee el gen RB mutado y no contiene integrado en su genoma secuencias de HPV.

p105^{RB} reprime la transcripción de los genes celulares c-myc humano y albúmina de rata.

Los mecanismo moleculares por los cuales p105^{RB} inhibe, son apoyados por las características de cada promotor, donde la mayoría establece un modelo de regulación que involucra al factor de transcripción E2F.

p105^{RB} no afecta la expresión del promotor temprano de SV40 ni el de la Timidina cinasa de HSV, mientras que regula negativamente la transcripción de la región control del papilomavirus humano tipo 18.

En el caso del LCR de HPV-18, se establecen dos mecanismos de regulación: uno involucra la presencia de dos sitios posibles de reconocimiento para el factor E2F y otro mediante la disminución en la actividad de AP-1, ocasionada por la ausencia de uno de los componentes que forman este complejo proteico, c-fos.

De esta manera, el efecto de p105^{RB} sobre la actividad transcripcional de los promotores celulares y virales, permitió definir algunos de los mecanismos básicos de control transcripcional.

GLCSARIO

ADN complementario (ADNc): Molécula de ADN que se sintetiza a partir de un ARNm, por lo que no contiene intrones. El ADNc determina la secuencia de aminoácidos de una proteína.

ADN genómico: Secuencia de ADN que comprende la región promotora, los exones e intrones de un gen.

Alelo: Forma alternativa de un gen. En una célula diploide cada gen tiene dos alelos ocupando la misma posición (locus) en cromosomas homólogos.

Autosomal recesivo: Descripción de una característica genética, no ligada al sexo, que puede ser heredable de ambos padres para ser expresada a nivel fenotípico.

Caja TATA: Secuencia consenso en la región del promotor de muchos genes eucarióticos en la que se une un factor general de transcripción, lo cual especifica la posición de inicio de la transcripción.

Cáncer esporádico: Forma de cáncer que ocurre, entre otros eventos, por la inactivación de los dos alelos de un gen supresor de tumor o anti-oncogen en una misma célula somática.

Cáncer familiar: Forma de un cáncer que puede ser heredable, debido a la susceptibilidad de mutaciones en el único alelo normal de un gen supresor de tumor o anti-oncogen heredado de uno de los padres.

Carcinogénesis: Secuencia de eventos que convierte una célula normal en cancerosa.

Carcinógeno o carcinogénico: Agente químico o físico que causa cáncer.

Carcinoma: Cáncer de células epiteliales. Tumor maligno de origen mesodermal.

Ciclo celular: Secuencia ordenada de eventos por los cuales la célula duplica su contenido y se divide en dos.

Cierre de leucina: Dominio estructural presente en muchas proteínas que se unen al ADN, que consiste de varias leucinas esparcidas a intervalos regulares, para permitir la formación de un dímero proteico con un dominio similar en otras proteínas.

Clonación de genes: Inserción de un fragmento de ADN en un vector de expresión para producir una molécula de ADN recombinante.

Codón: Secuencia de tres nucleótidos en el ARNm que especifica

un solo un aminoácido en las proteínas.

Competente: Término usado para describir células que son capaces de permitir la introducción de ADN extraño dentro de ellas.

Cotransfección: Transfección simultánea de diferentes plásmidos.

Cromosoma: Estructura nucleoproteica que contiene los genes ordenados de una célula.

Cromatografía: Técnica que permite separar una mezcla de sustancias o moléculas de acuerdo a su carga, tamaño u otra propiedad bioquímica.

Dedos de zinc: Dominio estructural de varias proteínas de unión al ADN, que consiste de dos cisteínas y dos histidinas unidas por un ión de zinc.

Deleción: Pérdida de un segmento de un cromosoma o de una región pequeña de un gen.

Diferenciación celular: Proceso por el cual una célula va adquiriendo características estructurales y funcionales específicas, para llegar a ser un tipo celular especializado.

División celular: Separación de una célula parental en dos células hijas. En células eucariotes la división de los núcleos es seguida por la división del citoplasma.

Dominancia: Manifestación de un gen en un fenotipo observable de un individuo.

Dominio: Porción de una proteína que tiene una estructura terciaria independiente del resto de la molécula.

"Enhancer" (potenciador): Región del ADN que presenta sitios de reconocimiento para proteínas que estimulan fuertemente la tasa de transcripción de un gen.

Enzima de restricción (endonucleasa): Nucleasa que corta en un sitio interno de la molécula de ADN de doble cadena, reconociendo secuencias específicas de nucleótidos.

Electroforesis: Método de separación de moléculas de acuerdo a su carga, tamaño o forma, a medida que migran en un campo eléctrico a través de un gel.

Exón: Secuencia de un gen eucariote que codifica para aminoácidos en una proteína.

Expresión genética: Manifestación fenotípica de los genes, generalmente la síntesis de proteínas.

Factor de transcripción: Cualquier proteína requerida para el inicio y regulación de la transcripción en células eucariontes.

Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP): Una variación en el número de sitios de corte para determinada enzima de restricción en un locus genético, resultando una diferencia en la longitud de los fragmentos producidos por el corte de la enzima.

Fusión celular: Proceso por el cual la membrana plasmática de dos células se rompen en un punto de contacto entre ellas, permitiendo la unión del citoplasma.

Genoma: La información genética total que lleva una célula o un organismo.

Gradiente isopícnico: Una solución de ADN, cloruro de cesio y bromuro de etidio la cual tiene homogéneamente una misma densidad.

Heterocigosis: Manifestación de uno de los alelos diferentes de un locus genético dado en cromosomas homólogos.

Homocigosis: Manifestación de uno de los alelos idénticos en un locus genético.

Inmortalización: Proliferación ilimitada de células para la formación de una línea celular en cultivo.

Intrón: Secuencia de un gen que no codifica para una proteína.

Híbrido celular: Una célula somática formada por la fusión de dos células parentales de diferentes orígenes.

Kilobase (Kb): 1000 pares de bases.

Línea celular: Población de células derivadas de un tejido, de origen animal o vegetal, capaces de dividirse indefinidamente en cultivo.

Locus: Plural loci; lugar en el mapa genético en el que reside un gen particular.

Mapa de restricción: Representación gráfica de una molécula de ADN que indica los sitios de corte para diferentes enzimas de restricción.

Metástasis: Esparcimiento o migración de células cancerosas de su sitio de origen (de un tumor primario) hacia otro sitio en el cuerpo, frecuentemente a través del flujo sanguíneo o linfático.

Modificación post-traducciona: Una serie de cambios que ocurren

en una proteína recién sintetizada, por ejemplo glicosilación, fosforilación, fragmentación, etc.

Motivo: Un dominio estructural pequeño que puede ser reconocido en una variedad de proteínas.

Mutación: Cambio heredable en la secuencia de nucleótidos de un gen en el cromosoma.

Mutación puntual: Cambio en una sola base en la secuencia de nucleótidos de un gen.

Oncogénesis: La formación de un tumor.

Par de base (pb): Una purina o pirimidina de diferentes cadenas en una doble hélice, que interactúan por puentes de hidrógeno. La distancia a lo largo de una molécula de ADN es medida en pares de bases.

Plásmido: Molécula pequeña de ADN circular que se replica independientemente del genoma celular de su hospedero (bacteria).

"Polylinker": Múltiples sitios de clonación en una región de un vector de clonación, que contiene varios sitios de restricción contiguos.

Progresión : Tendencia de los tumores a convertirse en malignos a medida que crecen.

Promotor: Secuencia de nucleótidos en el ADN donde se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción.

Proteína regulatoria: Generalmente cualquier proteína que se une en una secuencia específica en el ADN alterando la expresión de un gen.

Proteína oncogénica: Molécula que puede transformar una célula normal en cancerosa.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Técnica para la amplificación de regiones específicas del ADN mediante múltiples ciclos de desnaturalización, alineamiento de oligonucleótidos que flanquean esta región y polimerización del ADN.

Recesivo: Manifestación de un gen que no expresa su fenotipo cuando el alelo dominante está presente, debido a la inactivación o ausencia del producto del alelo recesivo.

Regulación de la transcripción: Control de la expresión de un gen.

Sarcoma: Cáncer de tejido conectivo.

Secuencia consenso: Secuencia común de nucleótidos o de aminoácidos, en la cual cada posición representa la base más frecuentemente encontrada en comparación con otras secuencias. Esta región es capaz de mantener una misma función en diferentes moléculas.

Silvestre: Forma no mutada de un gen específico de un organismo.

Sitio de restricción: Una secuencia de pares de bases que es reconocida y cortada por enzimas de restricción.

Transcripción: Síntesis de ARNm mensajero (ARNm) a partir del ADN.

Transfección: Introducción de moléculas de ADN dentro de una célula eucariótica, permitiendo la expresión de uno o más genes del ADN introducido.

Transformación: Adquisición de nuevos marcadores genéticos por la incorporación de ADN en bacterias. En cultivos de células eucarióticas se refiere a la adquisición de las características tumorigénicas debido a un tratamiento con un virus tumoral o un carcinógeno.

Translocación: Relocalización de una parte de un cromosoma dentro del mismo cromosoma o en un cromosoma diferente.

Transregulador: Plásmido que contiene un gen que codifica para una proteína capaz de alterar la tasa de transcripción de un gen.

Tumorigénico: Capacidad de una proteína para causar tumores en animales.

Vector de expresión: Elemento genético, usualmente un virus o plásmido, que contiene secuencias de un gen clonado que codifica para una proteína capaz de expresarse dentro de una célula apropiada.

Virus oncogénicos: Partículas que consisten de moléculas de ADN o ARN encapsuladas con una cubierta proteica. Estos virus son capaces de replicarse dentro de una célula hospedero y producir un tumor debido a que poseen genes que codifican para proteínas con actividad oncogénica.

BIBLIOGRAFIA

Adame, L. F. L. y Gariglio, V. P. (1989). Los genes del cáncer. *Información Científica y Tecnológica* 11(152):43-47.

Alam, J. and Cook, J. L. (1990). Reporter Genes: application to the Study of Mammalian Gene Transcription. *Anal. Biochem.* 188:245-254.

Anderson, M. J. and Stanbridge, E. J. (1993). Tumor Suppressor genes studied by cell hibridization and chromosome transfer. *The FASEB Journal* 7:826-832.

Andersson, S., Davis, D. L., Dahlbäck, H., Jörnvall, H., Russell, D. W. (1989). Cloning, Structure, and Expression of the Mitochondrial Cytochrome P-450 Sterol 26-Hydroxylase, a Bile Acid Biosynthetic Enzyme. *J. Biol. Chem.* 264:8222-8229.

Balaban, et al., (1982). Citado en: Marshall, C. J. (1991). Tumor Suppressor Genes. *Cell* 64:313-326.

Bagchi, S., Raychaudhuri, P. Nevins, J. R. (1989). Phosphorylation-dependent activation of the adenovirus-inducible E2F transcription factor in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:4353-4356.

Bagchi, S., Raychaudhuri, P., Nevins, J. R. (1990). Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complex involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell* 62:659-669.

Bagchi, S., Weinmann, R., Raychaudhuri, P. (1991). The Retinoblastoma Protein Copurifies with E2F-1, an E1A-regulated inhibitor of the Transcription Factor E2F. *Cell* 65:1063-1072.

Bandara, L. R., and La Thangue, N. B. (1991). Cyclin A and the retinoblastoma gene product form complexing with a cellular transcription factor. *Nature* 351:494-497.

Banerjee A., Xu H-J., Hu S-X., Araujo D., Takahashi R., Stanbridge E. J., Benedict W. F. (1992). Changes in Growth and Tumorigenicity following Reconstitution of Retinoblastoma Gene Function in Various Human Cancer Cell Types by Microcell Transfer of Chromosome 13. *J. Cancer Res.* 52:6297-6304.

Blumenfeld, M., Cereghini, A., Raymondjean, M., Chouard, T., Yaniv, M. (1989). Factors controlling the liver-specific expression of the albumin gene. Ed. Gralla, J. D. *DNA-Protein Interactions in Transcription.* Alan R. Liss Inc. p. 91-105.

Bodmer, W. F., Barley, C. J., Bodmer, J., Bussey, H. J. R., Eltis, A., Gorman, P., Lucibello, F. C., Solomon, E., Spurr, N.

K. (1987). Localisation of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 323:614-616.

Bonilla, M., Ramírez, M., López, J., Gariglio, P. (1988). In vivo amplification and rearrangement of the c-myc oncogene in human breast cancer. *J. Nat. Ca. Inst.* 80:665-671.

Bookstein, R., Rio, P., Madreperla, S. A., Hong, F., Allred, C., Grizzle, W. E., Lee, W-H. (1990a). Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:7762-7766.

Bookstein, R., Shew, J-Y., Chen, P-L., Scully, P., Lee, W-H. (1990b). Suppression of Tumorigenicity of Human Prostate Carcinoma Cells by Replacing a Mutated RB Gene. *Science* 247:712-715.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Bravo, B. C. (1990). Análisis de Interacciones ADN-Proteínas en la Región Larga de Control del Papilomavirus Humano tipo 18. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala, UNAM, México. p 3-4.

Buchberg, A. M., Cleveland, L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. (1990). Sequence homology shared by neurofibromatosis type 1 gene and IRA-1 and IRA-2 negative regulators of the RAS cyclic AMP pathway. *Nature* 347:291-294.

Buchkovich, K., Duffy, L. A., Harlow, E. (1989). The Retinoblastoma Protein Is Phosphorylated during Specific Phases of the Cell Cycle. *Cell* 58:1097-1105.

Call, K. M., Glaser, T. M. Ito, C. Y., Buckler, A. J., Pelletier, J., Haber, D. A., Rose, E. A., Kral, A., Yeger, H., Lewis, W. H., Jones, C., Housman, D. E. (1990). Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms'tumor locus. *Cell* 60:509-520.

Cawthon, R. M., Weiss, R., Xu, G., Viskochil, D., Culver, M., Stevens, J., Robertson, M., Dunn, D., Gesteland, R., O'Connell, P., White, R. (1990). A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure and point mutations. *Cell* 62,193-201.

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

Collins, F. S., Ponder, B. A. J. Seizinger, B. R., Epstein, C. J. (1989). Editorial: the von Recklinghausen neurofibromatosis

region on chromosome 17-genetic and physical maps come into focus. *Am. J. Hum. Genet.* 44:1-5.

Cooper, G. M. (1992). Oncogenes as Markers for Early Detection of Cancer. *J. Cell. Biochemistry* 16:131-136.

Cooper, J. A. and Whyte P. (1989). RB and the Cell Cycle: Entrance or Exit?. *Cell* 58:1009-1011.

Chellappan, S. P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, M., Nevins, J. R. (1991). The E2F Transcription Factor Is a Cellular Target for the RB protein. *Cell* 65:1053-1061.

Chellappan, S. P., Kraus, V. B., Kroger, B., Munger, K., Howley, P. M., Phelps, W. C., Nevins, J. R. (1992). Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:4549-4553.

Chen, P-L., Scully, P., Shew, J-Y., Wang, J. Y. J., Lee, W-H. (1989). Phosphorylation of the Retinoblastoma Gene Product Is Modulated during the Cell Cycle and Cellular Differentiation. *Cell* 58:1193-1198.

DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J., Huang, C-M., Lee, W-H., Marsilio, E., Paucha, E., Livingston, D. M. (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54:275-283.

DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Furukawa, Y., Griffin, J., Piwnica-Worms, H., Huang, C-M., Livingston, D. M. (1989). The Product of the Retinoblastoma Susceptibility Gene Has Properties of a Cell Cycle Regulatory Element. *Cell* 58:1085-1095.

Defeo-Jones, D., Huang, P. S., Jones, R. E., Haskell, K. M., Vuocolo, G. A., Hanobik, M. G., Huber, H. E., Oliff, A. (1991). Cloning of cDNAs for cellular proteins that bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 352:251-254.

De Mars, R. (1979). Cited in: Marshall, C. J. (1991). Tumor Suppressor Genes. *Cell* 64:313-326.

Devoto, S. H., Mudryj, M., Pines, J., Hunter, T., Nevins, J. R. (1992). A Cyclin A-Protein Kinase Complex Possesses Sequence-Specific DNA Binding Activity: p33cdk2 Is a Component of the E2F-Cyclin a Complex. *Cell* 68:167-176.

Dyson, N., Guida, P., McCall, C., Harlow, E. (1992). Adenovirus E1A Makes Two Distinct Contacts with the Retinoblastoma Protein. *J. Virology* 66(7):4606-4611.

Dyson, N. Howley, P. M. Manger, K., Harlow, E. (1989). The Human Papilloma Virus-16 E7 Oncoprotein Is Able to Bind to the Retinoblastoma Gene Product. *Science* 243:934-937.

Egan, C., Jelsma, T. N., Howe, J. A., Bayley, S. T., Ferguson, B., Branton, P. (1988). Mapping of cellular protein-binding sites on the products of early-region 1A of human adenovirus type 5. *Mol. Cell. Biol.* 8:3955-3959.

Eliyahu, D., Michalovitz, D. Eliyahu, S., Pinhasi-kimhi, O., O'En, M. (1989). Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:8763-8767.

Eng, C. and Ponder, B. A. J. (1993). The role of gene mutations in the genesis of familial cancers. *The FASEB Journal* 7:910-919.

Ewen, M. E., Ludlow, J. W., Marsilio, E., DeCaprio, J. A., Millikan, R. C., (1989). An N-terminal transformation governing sequence of SV40 large T antigen contributes to the binding of both p110^{RB} and a second cellular protein, p120. *Cell* 58:257-267.

Facer, C. and Playfair, J. (1989). Malaria, Epstein Barr virus and the genesis of lymphomas. *Adv. Cancer Res.* 53:33-72.

Fearon, E. R. and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767.

Fearon, E. R. (1992). Genetic alterations underlying colorectal tumorigenesis. *Cancer Surveys* 12:119-136.

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

Fields, S. and Jang, S. K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 247:49-56.

Finlay, C. A., Hinds, P. W., Levine, A. J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57:1083-1093.

Francke et al., (1978). Citado en: Marshall, C. J. (1991). Tumor Suppressor Genes. *Cell* 64:313-326.

Friend, S. H., Bernards, R. Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M., Dryja, T. P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323:643-646.

Furukawa, Y., DeCaprio, J. A., Belvin, M., Griffin, J. D. (1991). Heterogeneous expression of the product of the

retinoblastoma susceptibility gene in primary human leukemia cells. *Oncogene* 6:1343-1346.

Gage, J. R., Meyers, C., Wettstein, F. O. (1990). The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J. Virology* 64:723-730.

Ganem, D. and Varmus, H. (1987). The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Ann. Rev. Biochem.* 56:651-693.

Gannon, J. V. and Lane, D. P. (1987). p53 and DNAPolymerase α compete for binding to SV40 T antigen. *Nature* 329:456-458.

Gessler, M., Poustka, A., Cavanee, W., Neve, R. L., Orkin, S. H., Burns, G. A. P. (1990). Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343, 774-778.

Green, S., Issemann, I., Sheer, E. (1988). A versatile in vivo and in vitro eukaryotic expression vector for protein engineering. *Nucl. Acids. Res.* 16(1):369.

Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gilbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M., Sargeant, L., Krapcho, K., Wolff, E., Burt, R., Hughes, J. P., Warrington, J., McPherson, J., Wasmuth, J., Le Paslier, D., Abderrahim, H., Cohen, D., Leppert, M., White, R. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66:589-600.

Gorman, C. M., Moffat, L. F., Howard, B. H. (1982a). Recombinant Genomes Which Express Chloramphenicol Acetyltransferase in Mammalian Cells. *Mol. Cell. Biol.* 2:1044-1051.

Gorman, C. M., Merlino, G. T., Wilingham, M. C., Pastan T. R., Howard, B. H. (1982b). The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 6777-6781.

Guido, J. M. C. (1991). Análisis funcional de elementos reguladores de la transcripción temprana en el Papilomavirus humano tipo 18 (HPV-18). Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. 95p.

Guido, J. M. C., Zamorano, R., Garrido-Guerrero, E., Gariglio, P., 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. of General Virology* 73:1395-1400.

Haber, D. A. and Fousman, D. E. (1991). Rate-limiting steps: the genetics of pediatric cancers. *Cell* 64:5-8.

Hamel, P. A., Gallie, B. L., Phillips, R. A. (1992). Transcriptional Repression of the E2-containing Promoters E11aE, c-myc and RB1 by the product of the RB1 gene. *Mol. Cell. Biol.* 12: 3431-3438.

Hamel, P. A., Phillips, R. A., Muncaster, M., Gallie, L. (1993). Speculations on the roles of RB1 in tissue-specific differentiation, tumor initiation and tumor progression. *The FASEB Journal* 7:846-854.

Hansen, F. M., Koufos, A., Gallie, B. L., Phillips, R. A., Fodstad, O. (1985). Osteosarcoma and retinoblastoma: A shared chromosomal mechanism revealing recessive predisposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:6216-6220.

Harbour, J. W., Lai, S-L., Whang-Peng, J., Gazdar, A. D., Minna, J. D., Kaye, F. J. (1988). Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 241:353-357.

Hayday, A., Gillies, S., Saito, H., (1984). Activation of a translocated human c-myc gene by an enhancer in the immunoglobulin heavy chain-locus. *Nature* 307:334-337.

Heard, J. M., Herbomel, P., Ott, M. O., Mottura-Rollier, A., Weiss, M., Yaniv, M. (1987). Determinants of rat albumin promoter tissue specificity analyzed by an improved transient expression system. *Mol. Cell. Biol.* 7:2425-2434.

Helin, K., Lees, J. A., Vidal, M., Dyson, N., Fattaey, A. (1992). A cDNA Encoding a pRB-Binding Protein with Properties of the Transcription Factor E2F. *Cell* 70:337-350.

Herbomel, P., Bourachot, B., Yaniv, M. (1984). Two distinct enhancers with different cell specificities coexist in the regulatory region of polyoma. *Cell* 39:653-662.

Hiebert, S. W., Blake, M., Azizkhan, J., Nevins, J. R., (1991). Role of E2F Transcription Factor in E1A-Mediated trans-Activation of Cellular Genes. *J. Virology* 65(7):3547-3552.

Hiebert, S. W., Chellappan, S. P., Horowitz, J. M., Nevins, J. R. (1992). The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes & Development* 6:177-185.

Hong F. D., Huang H-J. S., To H., Young S., Oro A., Bookstein R., Lee E. Y-H. P., Lee W-H. (1989). Structure of the

human retinoblastoma gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:5502-5506.

Horowitz, J. M., Park, S-H., Bogenmann, E., Cheng, J-C., Yandell, D. W., Kaye, F. J., Minna, J. D., Dryja, T. P., Weinberg, R. A. (1990). Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:2775-2779.

Horowitz J. M., Yandell, D. W., Park, S.-H., Canning, S., Whyte, P., Buchkovich, K., Harlow., E., Weinberg, R. A., Dryja, T. P. (1989). Point Mutational Inactivation of the Retinoblastoma Antioncogene. Science 243:937-943.

Hu, Q., Dayson, N., Harlow, E. (1990). The regions of the retinoblastoma protein needed for binding to adenovirus E1A or SV40 large T are common sites for mutations. The EMBO J. 9:1147-1155.

Huang, S., Lee, W-H., Lee, Y. H-P. (1991). A cellular protein that competes with SV40 T antigen for binding the retinoblastoma gene product. Nature 350:160-162.

Huang, S., Wang, N., Tseng B. Y., Lee, W., Lee, E. H. (1990). Two distinct and frequently mutated regions of retinoblastoma protein are required for binding to SV40 T antigen. The EMBO J. 9:1815-1822.

Kaelin, W. G. J., Ewen, M. E., Livingston, D. M. (1990). Definition of the minimal simian virus 40 large T antigen and adenovirus E1A-binding domain in the retinoblastoma gene product. Mol. Cell. Biol. 10:3761-3769.

Kaelin, W. G. J., Kerk, W., Sellers, W. R., DeCaprio, J. A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C. S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P. J., Blanar, M. A., Livingston, D. M., Flemington, E. K. (1992). Expression Cloning of a cDNA Encoding a Retinoblastoma-Binding Protein with E2F-like Properties. Cell 70:351-364.

Kaelin, W. G. J., Pallas, D. C., DeCaprio, J. A., Kaye, F. J., Livingston, D. M. (1991). Identification of Cellular Proteins That Can Interact Specifically with the T/E1A-Binding Region of the Retinoblastoma Gene Product. Cell 64:521-532.

Kaye, F. J., Kratzke, R. A., Gerster, J. L., and Horowitz, J. M. (1990). A single amino acid substitution results in a retinoblastoma protein defective in phosphorylation and oncoprotein binding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:6922-6926.

Kim, S-J., Lee, H-D., Robbins, P. D., Busam, K., Sporn, M. M., Roberts, A. B. (1991). Regulation of transforming growth factor β 1 gene expression by the product of the retinoblastoma-

susceptibility gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:3052-3056.

Kingston, R. E. (1991). Introduction of DNA into Mammalian Cells. Current Protocols in Molecular Biology. Supplement 14.

Knudson, A. G. Jr. (1971). Mutation and Cancer: Statistical study of retinoblastoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68, 820-823.

Knudson, A. G. Jr. (1991). Overview: Genes that predispose to cancer. Mutation Research 247:185-190.

Kovesdi, I., Reichel, R. Nevins, J. R. (1986). Identification of a cellular transcription factor involved in E1a trans-activation. Cell 45:219-228.

Lane, D. (1992). p53, guardian of the genome. Nature 358:15-16.

Lane, D. and Crawford, L. V. (1979). T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. Nature 278:261-263.

La Thangue, N. B. and Rigby, P. W. J. (1987). An Adenovirus E1A-like Transcription Factor Is Regulated during the Differentiation of Murine Embryonal carcinoma Stem Cells. Cell 49:507-513.

Lee, E. Y-H. P., Bookstein R., Young L-J., Lin C-J., Rosenfeld M. G., Lee W-H., (1988). Molecular mechanism of retinoblastoma gene inactivation in retinoblastoma cell line Y79. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:6017-6021.

Lee, W-H. (1993). Tumor Suppressor Genes - The Hope. The FASEB Journal 7:821.

Lee, W-H., Bookstein R., Hong F., Young L-J., Shew J-Y., Lee E. Y-H. P. (1987a). Human Retinoblastoma Susceptibility Gene: Cloning, Identification, and Sequence. Science 235:1394-1399.

Lee, W-H., Shew J-Y., Hong F. D., Sery, T. W., Donoso, L. A., Young, L-J., Bookstein, R., Lee, E. Y-H. P. (1987b). The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. Nature 239:642-645.

Lees J. A. Buchkovich, K. J., Marshak, D. R., Anderson, C. W., Harlow, E. (1991). The retinoblastoma protein is phosphorylated on multiple sites by human cdc2. The EMBO J. 10:4279-4289.

Levine, A. J. (1993). The Tumor Suppressor Genes. Annu. Rev. Biochem. 62:623-651.

Lewin, B. (1994). GENES V. Oxford University Press and Cell Press, New York, USA. 1272p.

Ludlow, J. W., DeCaprio, J. A., Huang, C-M., Lee, W-H., Paucha, E., Livingston, D. M. (1989). SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. Cell 56:57-65.

Maniatis, T., Fritsch, E., Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 545p.

Marshall, C. J. (1991). Tumor Suppressor Genes. Cell 64:313-326.

McGee, T. L., Yandell, D. W., Dryja, T. P. (1989). Structure and partial genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. Gene 80:119-128.

Miller, J. H. (1974). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. p352-359.

Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., Levine, A. J. (1992). The mdm-2 Oncogen Product Forms a Complex with the p53 Protein and Inhibits p53-Mediated Transactivation. Cell 69:1237-1245.

Mudryj, M., Devoto, S. H., Hiebert, S. W., Hunter, T., Pines, J., Nevins, J. R. (1991). Cell Cycle Regulation of the E2F Transcription Factor Involves an Interaction with Cyclin A. Cell 65:1243-1253.

Münger, K., Werness, B. A., Dyson, N., Phelps, W. C., Harlow, E., Howley, P. M. (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. The EMBO J. 8(13):4099-4105.

Nagase, H., Miyoshi, Y., Horii, A., Aoki, T., Ogawa, M., Utsunomiya, J., Baba, S., Sasazuki, T., Nakamura, Y. (1992). Correlation between the location of germ-line mutations in the APC gene and the number of polyps in familial adenomatous polyposis patients. Cancer Res. 52:4055-4057.

Nevins, J. R. (1992). E2F: A Link Between the Rb Tumor Suppressor Protein and Viral Oncoproteins. Science 258:424-429.

Nowell, P. C., Finan, J., Dalla-Favera, R. (1983). Association of amplified oncogene c-myc with abnormally banded chromosome 8 in a human leukemia cell line. Nature 306: 494-498.

Ocadiz, R., Saucedo, R. Cruz, M., Graef, A. M., Gariglio, P. (1987). High correlation between molecular alterations of the

c-myc oncogen and uterine cervix carcinoma Cancer Res. 47:4172-4177.

Oren, M. (1985). The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. Biochim. Biophys. Acta 823:67-78.

Pietenpol, J. A., Munger, K., Howley, P. M., Stein, R. W., Moses, H. L. (1991). Factor-binding Element in the human c-myc Promoter Involved in Transcriptional Regulation by Transforming Growth Factor B1 and by the Retinoblastoma Gene Product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:10227-10231.

Pietenpol, J. A., Stein, R. W., Moran, E., Yaciuk, P., Schlegel, R., Lyons, R. M., Pittelkow, M. R., Munger, K., Howley, P. M., Moses, H. L. (1990). TGF- β 1 Inhibition of c-myc Transcription and Growth in Keratinocytes Is Abrogated by Viral Transforming Proteins with pRB Binding Domains. Cell 61:777-785.

Poiesz, B., Ruscetti, F., Gazdar, A., Bunn, P., Minna, J., Gallo, R. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 294:268-271.

Ponder, B. A. J. (1988). Genes losses in human tumours. Nature 335:400-402.

Reddy, E. P., Reynolds, R. K., Santos, E., Barbacid, M. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. Nature 300:149-151.

Riccardi, V. M., Hittner, H. M., Francke, U., Yunis, J. J., Ledbertler, D., Borges, W. (1980). The aniridia-Wilms'tumor association: the critical role of chromosome band 11p13. Cancer Genet. Cytogenet. 2:131-137.

Rustgi, A. N., Dyson, N., Bernards, R. (1991). Amino-terminal domains of c-myc and N-myc proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product. Nature 352:541-544.

Robbins, P. D., Horowitz, J. M., Mulligan, R. C. (1990). Negative regulation of human c-fos expression by the retinoblastoma gene product. Nature 346:668-671.

Sarnow, P. Ho, Y. S., Williams, J., Levine A. J. (1982). Adenovirus E1b-58Kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 Kd cellular protein in transformed cells. Cell 28:387-394.

Shaulsky, G., Goldfinger, N., Tosky, M. S., Levine, A. J.,

Rotter, V. (1991). Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. *Oncogene* 6:2055-2065.

Scheffner, M., Münger, K., Byrne, J. C., Howley, P. M. (1991). The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:5523-5527.

Shirodkar, S., Ewen, M., DeCaprio, J. A., Morgan, J., Livingston, D. M., Chittenden, T. (1992). The Transcription Factor E2F Interacts with the Retinoblastoma Product and a p107-Cyclin A Complex in a Cell Cycle-Regulated Manner. *Cell* 68:157-166.

Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R. P. Canaani, E. (1985). Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia. *Nature* 315:550-554.

Sorenson, S. A., Mulvihill, J. J., Nielson, A. (1986). Long-term follow-up of von Recklinghausen neurofibromatosis. Survival and malignant neoplasms. *N. Engl. J. Med.* 314:1010-1015.

Stanbridge, E. J. and Nowell, P. C. (1990). Origins of Human Cancer Revised. *Cell.* 63:867-874.

Takahashi, K., Vigneron, M., Matthes, H., Wildeman, A., Zenke, M., Chambon, P. (1986). Requirement of stereospecific alignments for initiation from the simian virus 40 early promoter. *Nature* 319:121-126.

Tanaka, K., Oshimura, M., Kikuchi, R., Seki, M., Hayashi, T., Miyaki, M. (1991). Suppression of tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 5 or 18. *Nature*, 349:340-342.

Thierry, F., Carranca, A. G., Yaniv, M. (1987). Element That Control the Transcription of Genital Human Papillomavirus Type 18. *Cancer Cell* 5. Cold Spring Harbor Laboratory. p 23-32.

Thierry, F., Dostatni, N., Arnos, F., Yaniv, M. (1990). Cooperative Activation of Transcription by Bovine Papillomavirus Type 1 E2 Can Occur over a Large Distance. *Mol. Cell. Biol.* 10:4431-4437.

Thierry, F., Spyrou, G., Yaniv, M., Howley, P. (1992). Two AP1 Sites Binding JunB Are Essential for Human Papillomavirus Type 18 Transcription in Keratinocytes. *J. Virology* 66:37-3748.

Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C. (1988). Genetic alterations during colorectal tumor development. *New. Engl. J. Med.* 319: 525-532.

Wallace, M. R., Marchuk, D. A., Anderson, L. B., Letcher, R., Oden, H. M., Saulino, A. M., Fourtaint, J. W., Brereton, A., Nicholson, J., Mitchell, A. L., Brownstein, B. H., Collins, F. S. (1990). Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 249:181-186.

Weinberg, R. A. (1984). Base molecular del cáncer. *Investigación y Ciencia*.

Weinberg, R. A. (1988). En busca del antioncogén. *Investigación y Ciencia*. Núm.146 p.28-36

Weinberg, R. A. (1991). Tumor Suppressor Genes. *Science* 254:1138-1145.

Weintraub, S. J., Prater, C. A., Dean, D. C., (1992). Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* 358:259-261.

Werness, B. A., Levine, A. J., Howley, P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248:76-79.

Whyte, P., Buchkovich, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A., Harlow, E. (1988). Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 334:124-129.

Wigler, M., Silverstein, S., Lee, L., Pellicer, A., Cheng, Y. C., Axel R., (1977). Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell* 11:223-232.

Xu, G., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Gesteland, R., Weiss, R. (1990). The neurofibromatosis gene encodes a protein related to GAP. *Cell* 62:599-608.

Yanisch-Perron, C., Vierira, J., Messing, J. (1985). Improved M13 phase cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.

Zacksenhaus, E., Bremner, R., Jiang, Z., Gill, R. M., Muncaster, M., Sopta, M., Phillips, R. A., Gallie, B. L. (1993). Unraveling the Function of the Retinoblastoma Gene. *Advances in Cancer Res.* 61:115-141.

Zambetti, G. P., Labow, M., Levine, A. J. (1992). A mutant p53 protein is required for maintenance of the transformed phenotype in cells transformed with p53 plus ras cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:3952-3956.

zur Hausen, H. (1977). Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 78:1.