



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

14
2EJ

REGULACION DE LA TRANSCRIPCION DE LOS
ONCOGENES E6 Y E7 DEL VIRUS PAPILOMA
HUMANO TIPO 18, POR EL GEN H-ras Y SITIOS
DE RESPUESTA A GLUCOCORTICOIDES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(BIOQUIMICA)

PRESENTA:
BIOL. VERONICA VALLEJO RUIZ

México, D.F.

1995



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

REGULACION DE LA TRANSCRIPCION DE LOS
ONCOGENES E6 Y E7 DEL VIRUS PAPILOMA
HUMANO TIPO 18, POR EL GEN H-ras Y SITIOS
DE RESPUESTA A GLUCOCORTICOIDES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(BIOQUIMICA)

PRESENTA:
BIOL. VERONICA VALLEJO RUIZ

México, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN

Este trabajo fué realizado en el laboratorio del Dr. Alejandro García Carrancá del Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; bajo la supervisión del Dr. Alejandro García Carrancá.

A Roberto Arturo

Mi pequeño hijo, porque has traído a mi vida amor y alegría, porque tu sonrisa, tus besos, tus travesuras me dieron la fortaleza para seguir adelante. Gracias por el tiempo que he dejado de compartir contigo para poder alcanzar esta meta.

A Julio

Mi compañero, mi amigo y parte de mi vida. Espero que sigamos creciendo y aprendiendo juntos. Se que esta tesis es el resultado de mucho esfuerzo y que hubo momentos difíciles en los que tu presencia y amor me ayudaron a hacer más fácil el camino...

"...porque gracias a vos he descubierto
que el amor es una bahía linda y generosa
que se ilumina y se oscurece
según venga la vida..."

M. Benedetti

A mis padres...

Esos dos seres maravillosos que han llenado mi vida de amor y cuidados. Una vez mas GRACIAS, esta tesis es para ustedes y de ustedes, porque en los momentos difíciles me ayudaron para que lograra concluir este trabajo.

Los amo.

A mis hermanos

A tí Gabriela mi compañera de juegos de mi infancia, espero que luches para alcanzar todos tus anhelos y seas muy feliz.

A tí Ernesto mi ejemplo a seguir, porque tu entusiasmo por la ciencia sembró en mí la semilla para seguir por este camino.

AGRADECIMIENTOS

A los sinodales:

Dr. Edgar Zenteno Galindo
Dr. Vicente Madrid Marina
Dr. Alejandro García Carrancá
Dra. Edith Garay Rojas
Dra. Carmen Soler Claudín

Por dedicar parte de su tiempo a leer y corregir esta tesis.

A Alex

Por permitirme realizar este trabajo en tu laboratorio y por brindarme tu apoyo y comprensión en todo momento.

Gracias.

A mis amigos y compañeros del labo con quienes he compartido momentos muy agradables.

Carla, César, Edith, Enrique, Laurita, Lupita, Manuel, Mayra, Miriam, Néstor, Paloma, Ronith y de manera muy especial a Olga por brindarme su apoyo y por dedicar parte de su tiempo a enseñarme.

A mis amigos, que en todo momento me han demostrado su amistad.

A todas aquellas personas que hicieron posible la realización de esta tesis.

A los indígenas chiapanecos...

"...país ya te armarás
pedazo por pedazo
pueblo mi pueblo..."

M. Benedetti.

RESUMEN

Dentro de los tipos de cáncer que afectan a la mujer mexicana, el cérvico-uterino ocupa el primer sitio como causa de mortalidad, de ahí la importancia del estudio de los mecanismos moleculares que participan en el desarrollo de esta enfermedad para una mejor prevención y cura.

Análisis de tumores cérvico-uterinos muestran la presencia de secuencias de DNA del virus del papiloma humano (HPV) en más del 90% de ellos, siendo los de mayor prevalencia los tipos 16, 18, 31 y 33. Se sabe que la sola presencia del virus no es suficiente para el desarrollo del cáncer. Alteraciones en genes celulares han sido encontradas en un alto porcentaje de este tipo de tumores, unas de ellas corresponden a los protooncogenes *ras*.

Se sabe que el gen *H-ras* mutado y la presencia de HPVs de alto riesgo son suficientes para causar transformación celular, sin embargo, se desconoce si el efecto observado es resultado de la suma de ambos eventos que están actuando de manera independiente o bien, existe algún tipo de interacción entre ambos que da como resultado el fenotipo transformante.

El presente trabajo tuvo por objetivo determinar si el gen *H-ras* mutado ejerce algún efecto en la expresión de los oncogenes del HPV-18.

Los resultados de diversas transfecciones en las que se utilizó al gen reportero CAT, unido a la región larga de control (LCR) del HPV-18 muestran que, el gen *H-ras* mutado aumenta la transcripción de los oncogenes E6 y E7 e incluso cuando se

cotransfecta con H-ras normal se observa un ligero incremento en la transcripción de estos oncogenes. La LCR del HPV-18 presenta dos secuencias reguladoras conocidas como elementos de respuesta a tetradecanol forbol acetato (TRE) a las que se unen las proteínas AP1, éstas secuencias influyen de manera importante en el nivel de transcripción de la LCR. Cuando estas secuencias están mutadas, el incremento en el nivel de transcripción observado con el gen H-ras mutado se suprime, lo cual indica que el efecto sobre la transcripción de los oncogenes virales ocurre a través de éstos sitios. Las proteínas AP1 pueden estar formadas por homodímeros de la familia de proteínas Jun o bien por heterodímeros de la familia Jun/Jun o Jun/Fos. Para determinar cuales de estos miembros participan en la respuesta de un gen ras activo, se hicieron ensayos de transfección con los diferentes miembros de la familia Jun. Los resultados nos indican que el complejo de homodímeros c-jun/c-jun es el que participa en la activación de la transcripción de los oncogenes virales, mientras que los homodímeros JunB y JunD parecen reprimir ligeramente el nivel de transcripción basal. Los heterodímeros c-jun/JunB o c-jun/JunD a pesar de que incrementan el nivel de transcripción, lo hacen con menor eficiencia que c-jun. Los heterodímeros c-jun/c-fos no parecen ser tan eficientes como los homodímeros c-jun.

Para llegar en algún momento a controlar de manera eficiente e incluso prevenir el cáncer cérvico-uterino, es importante determinar que factores están favoreciendo el desarrollo de ésta enfermedad y como están interaccionando con los HPVs de alto riesgo.

INDICE	página
INTRODUCCION	
El cáncer	1
Los papilomavirus	1
Los oncogenes E6 y E7	7
La LCR del HPV-18	10
Las proteínas AP1	18
Glucocorticoides y sitios GRE	23
Las proteínas AP1 y su interacción con otros oncogenes	25
El gen <i>ras</i>	27
JUSTIFICACION	32
OBJETIVOS	33
MATERIAL Y METODOS	
Material biológico	34
DNAs recombinantes	34
Bacterias competentes	36
Transformación de bacterias competentes	37
Obtención de grandes cantidades de DNA plasmídico	37
Purificación de DNA plasmídico por gradiente de cloruro de cesio	38
Transfección de células por el método de cloruro de calcio	39
Ensayo de beta galactosidasa	40
Ensayo de cloranfenicol acetil transferasa	40

RESULTADOS

Efecto del gen H-ras sobre la actividad transcripcional del HPV-18	42
Papel de los elementos de respuesta a glucocorticoides sobre la transcripción temprana del HPV-18	43
Transactivación de las proteínas c-jun, JunB y JunD sobre la LCR del HPV-18	45
Efecto de los sitios API sobre la actividad de la LCR del HPV-18	54
DISCUSION	58
CONCLUSIONES	68
BIBLIOGRAFIA	69

INTRODUCCION

El cáncer

El descubrimiento de que agentes etiológicos virales y no virales participan en el desarrollo del cáncer ha sido de gran relevancia para comprender mejor los mecanismos moleculares de ésta enfermedad. Dentro de los agentes no virales que participan en el desarrollo de un cáncer se encuentran los protooncogenes y los genes supresores (Benjamin y Voght, 1990).

Algunos virus de DNA son capaces de inducir la formación de tumores, ya que contienen genes que expresan proteínas oncogénicas, estos virus pueden actuar en conjunción con otros factores para inducir transformación celular. Los papilomavirus son virus pequeños de DNA responsables de la formación de tumores benignos en humanos y en otras especies de mamíferos, sin embargo, algunos subtipos de papilomavirus humanos (HPVs) han sido involucrados como agentes etiológicos del cáncer de cérvix y de pene (Boshart et al., 1984; Durst et al., 1983).

El cáncer cérvico-uterino ocupa el primer lugar como causa de mortalidad por cáncer en México, esto constituye un grave problema de salud pública (Cisneros de Cárdenas et al., 1987).

Los papilomavirus

Los papilomavirus comprenden el subgrupo más grande de la familia de los papovavirus. Consisten de partículas icosaédricas

pequeñas (55 nm de diámetro), con 72 capsómeros que encierran a la molécula de DNA circular de doble cadena, con un tamaño promedio de 7.8 kpb (Melnick et al., 1974; zur Hausen, 1980).

El genoma de todos los papilomavirus está organizado de manera similar, con toda la información genética en una sola hebra del DNA y dividido en tres regiones (Fig. 1). La región tardía (L) codifica para las proteínas estructurales del virus y contiene los genes L1 y L2, la región temprana (E) codifica para proteínas que regulan diversas funciones vitales del virus (replicación, transcripción, control del ciclo, etc.) y contiene los genes E1 a E7. Entre estas dos regiones se encuentra la región larga de control (LCR), la cual regula la transcripción de los genes virales, así como la replicación del genoma (Gius et al., 1988; Lowly et al., 1980; Sousa et al., 1990).

La expresión de los genes tempranos da lugar a la replicación y a mantener el genoma viral como un plásmido con gran número de copias. Los genes E1 y E2 tienen un alto nivel de expresión durante las etapas tempranas de la infección cuando aún no se integra el DNA viral al genoma del hospedero, la expresión de éstos genes incrementa la replicación del DNA viral. La proteína E5 actúa sobre la vía del factor de crecimiento epidermal causando un crecimiento anormal de las células. La expresión de los genes E6 y E7 da lugar a efectos adicionales que incluyen la disrupción de la diferenciación epitelial y la inducción de la inestabilidad genética, lo que puede ser importante durante las etapas tempranas

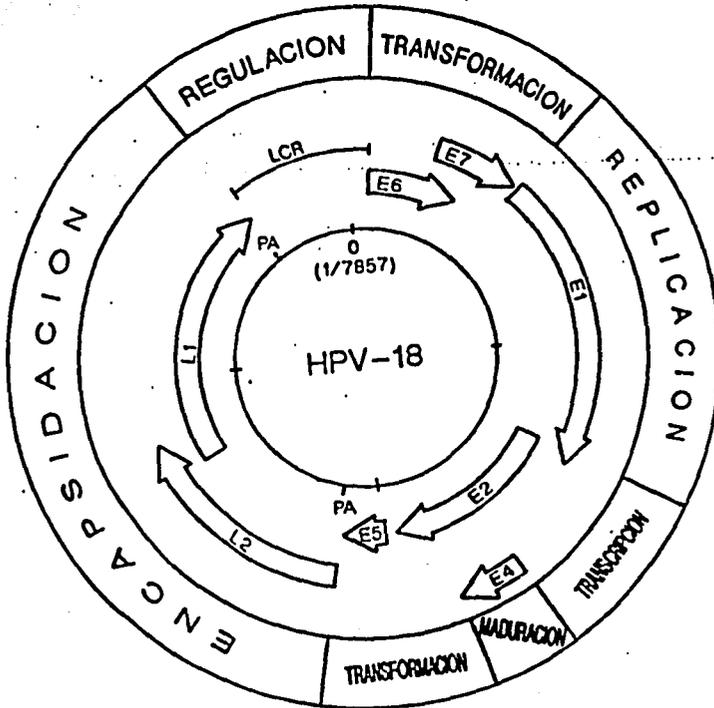


Fig. 1. Mapa genético del HPV-18. Su tamaño corresponde a 7857 pb. En la figura se muestran los seis genes tempranos y los dos tardíos con sus respectivos marcos de lectura abierta representados con las flechas y la función de cada uno de ellos. Se muestra también la posición de la LCR. Los sitios de poliadenilación se indican con (PA).

que preceden a la integración viral (Campo, 1988; Woodworth et al., 1989, McCance et al., 1988; Sousa, 1990; Leechanachai et al., 1992). La proteína E7 puede inducir deleciones cromosomales, translocaciones, duplicaciones y aneuploidías típicamente observadas en carcinomas cervicales (Durst et al., 1987; Reid et al., 1984). Lo anterior da lugar a la proliferación de las células para formar lesiones benignas (Benjamin y Voght, 1990).

La activación de los genes virales tardíos, así como la síntesis de las proteínas de la cápside y ensamblaje de las partículas virales ocurre en la capa externa del epitelio. Eventos secundarios están involucrados en la progresión de la lesión benigna hacia un carcinoma invasivo (Benjamin y Voght, 1990).

La especificidad tisular es atribuida a la región reguladora LCR la cual es activa en células epiteliales. La replicación y expresión génica son altamente específicas, ya que éstos virus son estrictamente epiteliotrópicos y sólo se replican vegetativamente en queratinocitos epiteliales diferenciados. Las células de las capas basales del epitelio escamoso parecen ser el blanco de la infección primaria (Cripe et al., 1987; Gloss, 1987). La naturaleza epiteliotrópica de la expresión genética de éstos virus está mediada por una compleja interacción de numerosos factores con los elementos presentes en la región de control de los papilomavirus (Pater et al., 1994).

Se han identificado alrededor de 70 tipos de HPVs, de los cuales, aproximadamente una tercera parte están asociados con

carcinomas anogenitales. Los tipos de HPVs más frecuentes en carcinomas cervicales y en líneas celulares derivadas de este tipo de carcinoma que están expresando los oncogenes virales, son el 16, 18, 31 y 33, por lo que estos tipos han sido considerados de alto riesgo y se sugiere que juegan un papel importante en el desarrollo de ésta enfermedad (Boshart et al., 1984; Durst et al., 1983; Cid et al., 1993). El HPV-18 se encuentra asociado con mayor frecuencia con adenocarcinomas cérvico-uterinos y carcinomas de células pequeñas de pulmón los cuales tienen un pronóstico de vida muy bajo (Stoler et al., 1992).

El DNA del HPV-16 y HPV-18 ha sido encontrado de forma integrada al genoma del hospedero en un alto porcentaje de tumores cérvico-uterinos, lo contrario ocurre en lesiones premalignas en donde el DNA viral se encuentra en estado episomal. La integración ocurre generalmente en la región que comprende a los genes E1-E2. Para el caso de los HPV-16 y HPV-18, la proteína E2 actúa como un represor del promotor que controla la expresión de los genes E6 y E7 (Munger et al., 1989; Schwarz et al., 1985).

El DNA del HPV-16 y HPV-18 es capaz de inmortalizar *in vitro* fibroblastos y queratinocitos de humano y de ratón, ocasionando alteraciones en la proliferación celular y en el proceso de diferenciación. Las células NIH3T3 son capaces de formar tumores en ratones atímicos cuando son transfectadas con DNA de HPV-16, sin embargo, esto no ocurre con las células de rata 3Y1, lo que sugiere que se requieren factores adicionales para dar el fenotipo maligno.

Tales factores pueden aumentar el nivel de transcripción de los oncogenes del HPV-16 o la susceptibilidad de las células a las proteínas del HPV (Yasumoto et al., 1986; Kanda et al., 1988; Woodworth et al., 1989; Matlashewski et al., 1988).

Cuando la expresión de los oncogenes de los papilomavirus que se consideran de alto riesgo, se encuentran bajo el control de elementos transcripcionales heterólogos, son capaces de transformar células primarias solo con cooperación de otros oncogenes como *ras* activado o *v-fos* (Matlashewski et al., 1987; Crook et al., 1989; Schneider et al., 1991, Saveria Campo, 1992). Cuando los oncogenes del HPV-16 se encuentran bajo el control de elementos homólogos, requieren de la presencia de dexametasona para cooperar con *H-ras* y transformar a la célula (Matlashewski et al., 1987; Schneider et al., 1991). Lo anterior concuerda con el hecho de que *ras* se encuentra mutado y ocasionalmente amplificado en diversos tumores cancerosos (Campo, et al., 1990).

Además de la infección por HPV y la alteración de genes celulares, están también implicados en el desarrollo del cáncer cérvico-uterino, la exposición a los carcinógenos químicos del humo del cigarro y los niveles elevados de hormonas que se presentan con el uso de anticonceptivos orales y la presencia de múltiples embarazos (Pater et al., 1994). Se ha reportado que los glucocorticoides aumentan el potencial oncogénico del HPV-16 y el oncogen *ras* en queratinocitos genitales (Durst et al., 1987).

Los oncogenes E6 y E7

Las funciones transformantes de los papilomavirus residen en la región temprana del genoma. Como ya se mencionó con anterioridad, las proteínas E6 y E7 tienen un papel fundamental en la inducción del fenotipo transformante. La expresión de ésta región del genoma viral es característica de tumores cérvico-uterinos humanos y de líneas celulares derivadas de tumores (Bedell et al., 1987; Munger, et al., 1989; Watanabe et al., 1989; Benjamin y Voght, 1990).

Tanto los genes E6 y E7 de los HPVs de alto riesgo poseen un potencial transformante *in vitro* y se ha mostrado que se requiere su expresión para mantener el fenotipo transformante de células derivadas de tumores cérvico-uterinos (Doeberitz et al. 1988; Doeberitz et al. 1992).

La proteína E7 está constituida por 98 aminoácidos y presenta básicamente dos dominios, el de unión a la proteína retinoblastoma (p105) que se localiza en la región amino terminal y el de unión a zinc que se localiza en la región carboxilo terminal, el cual contiene un par de motivos -Cys-X-X-Cys- que han sido identificados en diferentes factores de transcripción. Esta proteína presenta secuencias homólogas en su extremo amino terminal a la proteína E1A de adenovirus y al antígeno T del virus SV40 y se ha visto que es capaz de transactivar al promotor E2 de adenovirus (Phelps et al., 1988; Dyson et al., 1989; Miller et al., 1985).

La unión de E7 a p105Rb impide la interacción de ésta última

con sus blancos naturales. Se sabe que el gen de retinoblastoma codifica para una fosfoproteína nuclear de la cual no se conocen sus blancos celulares, pero se sabe que la pérdida de este gen está involucrada en diversos tipos de cáncer como: el de retinoblastoma, osteosarcoma y cáncer de pulmón de células pequeñas (Lewin, 1990).

La proteína E7 de HPV-16 y HPV-18 es capaz de formar por sí sola *focus* de fibroblastos establecidos como en la línea celular NIH3T3 y de inmortalizar células epiteliales humanas y fibroblastos de rata de cultivos primarios. En otros estudios se encontró que E7 es capaz de inmortalizar células HFE, sin embargo, la adición de E6 aumenta la eficiencia de transformación (Yasumoto, et al., 1986; Kanda et al., 1988; Bedell et al., 1989; Munger et al., 1989; Halbert, et al., 1991; Inoue et al., 1991; Defeo-Jones et al., 1991; Rutsgi et al., 1991). La proteína E7 del HPV-16, 18 y 33 es capaz de cooperar con *ras* mutado para causar transformación morfológica y crecimiento libre de anclaje en células embrionarias de rata, sin embargo, la proteína E7 de HPVs benignos como el 6 y el 11 no es capaz de cooperar con *ras* y causar transformación celular (Bedell et al., 1989; Edmonds y Vousden, 1991).

Análisis mutacionales de diferentes regiones de E7 sugieren que posiblemente las actividades de transformación y transactivación de ésta proteína son independientes ya que cuando se muta una región que reduce drásticamente la función de transactivación la actividad transformante prácticamente no se ve afectada (Edmonds y Vousden, 1989). Por otro lado si se mutan dos

residuos de serina que afectan el grado de fosforilación de la proteína tampoco se afecta la actividad transformante. Lo anterior confirma que ni el nivel de fosforilación, ni la habilidad de transactivar se requieren para la función de transformación de E7 (Storey et al., 1990).

La proteína E6 de HPV-16 y de HPV-18 se une a la proteína p53, que es un regulador negativo del ciclo celular, y promueve su degradación, lo anterior da como consecuencia la pérdida de función de p53 al ser eliminado el producto del gen. La proteína E6 al igual que E7, causa transformación celular en líneas celulares inmortalizadas, por ejemplo, es capaz de conferir crecimiento libre de anclaje en fibroblastos de rata, sin embargo, parece ser que las células que expresan E7 son más tumorigénicas que las que expresan E6. La proteína E6 es también capaz de transactivar el promotor E2 de adenovirus.

Las células infectadas con HPV-16 y 18 son capaces de expresar la proteína completa E6 o la forma truncada E6* que es producto de un procesamiento interno de algunos transcritos, se ha sugerido que el procesamiento facilita la traducción de la proteína E7 y que la proteína E6* por sí sola no tiene ninguna función biológica (Bedell et al., 1989; Werness, et al., 1990; Scheffner et al., 1990).

La pérdida del control de las funciones intracelulares que regulan la transcripción de E6 y E7 y el concomitante incremento de la expresión de los oncogenes virales pueden desempeñar un papel decisivo en el desarrollo del cáncer cérvico-uterino (zur Hausen, 1986; zur Hausen, 1989).

La LCR del HPV-18

El genoma de los HPVs contiene una región reguladora de la transcripción y de la replicación, comúnmente llamada región larga de control que contiene al promotor y a los elementos incrementadores que regulan la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7 (García-Carrancá et al. 1988; Cid et al. 1993).

La LCR del HPV-18 se encuentra comprendida dentro de un fragmento BamHI de 1050 pb, su tamaño es de 825 pb el cual incluye tres dominios funcionales diferentes, separados convenientemente por sitios de reconocimiento a la enzima RsaI. El fragmento distal (RsaI -838 a RsaI -450) responde a E6, incluye casi la mitad de la LCR pero contribuye sólo marginalmente a la estimulación del promotor de E6 y E7 (Gius et al., 1988); el fragmento central (RsaI -450 a RsaI -221) comprende a una región incrementadora constitutiva de 230 pb que desempeña un papel importante en el nivel de la transcripción de dichos oncogenes (Swift et al., 1987); y el fragmento proximal (RsaI -221 a BamHI +19) que comprende al promotor de los oncogenes E6 y E7 (Gius et al., 1988; Hoppe-Seyler y Butz, 1993; Hoppe-Seyler et al., 1991; Thierry et al., 1987a).

El producto del gen E2 es una proteína que reprime la actividad transcripcional de la LCR en queratinocitos humanos. Sin embargo, en lesiones malignas, la expresión de los genes virales probablemente sólo es regulada por proteínas celulares, ya que en carcinomas cervicales las secuencias virales se encuentran generalmente integradas al genoma del hospedero y como ya se

La LCR del HPV-18

El genoma de los HPVs contiene una región reguladora de la transcripción y de la replicación, comúnmente llamada región larga de control que contiene al promotor y a los elementos incrementadores que regulan la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7 (García-Carrancá et al. 1988; Cid et al. 1993).

La LCR del HPV-18 se encuentra comprendida dentro de un fragmento BamHI de 1050 pb, su tamaño es de 825 pb el cual incluye tres dominios funcionales diferentes, separados convenientemente por sitios de reconocimiento a la enzima RsaI. El fragmento distal (RsaI -838 a RsaI -450) responde a E6, incluye casi la mitad de la LCR pero contribuye sólo marginalmente a la estimulación del promotor de E6 y E7 (Gius et al., 1988); el fragmento central (RsaI -450 a RsaI -221) comprende a una región incrementadora constitutiva de 230 pb que desempeña un papel importante en el nivel de la transcripción de dichos oncogenes (Swift et al., 1987); y el fragmento proximal (RsaI -221 a BamHI +19) que comprende al promotor de los oncogenes E6 y E7 (Gius et al., 1988; Hoppe-Seyler y Butz, 1993; Hoppe-Seyler et al., 1991; Thierry et al., 1987a).

El producto del gen E2 es una proteína que reprime la actividad transcripcional de la LCR en queratinocitos humanos. Sin embargo, en lesiones malignas, la expresión de los genes virales probablemente sólo es regulada por proteínas celulares, ya que en carcinomas cervicales las secuencias virales se encuentran generalmente integradas al genoma del hospedero y como ya se

mencionó con anterioridad, ésta integración comúnmente rompe los marcos de lectura de los genes E1 y E2 (Baker et al. 1987; Gius et al., 1988; Pater et al. 1985; Schneider, et al. 1986; Cid et al. 1993).

La LCR del HPV-18 contiene sitios de unión para diferentes factores celulares como: NF1/CTF, OCT1, AP1, SP1, KRF1, YY1 y un sitio funcional de unión al receptor de glucocorticoides (GRE) (Fig. 2) (Butz y Hoppe Seyler, 1993).

Al hacer un análisis mutacional de éstos elementos se encontró que NF1 y OCT1 no juegan un papel crucial en la activación del promotor del HPV-18 (Butz y Hoppe-Seyler, 1993)

La región reguladora del HPV-18 presenta dos elementos de respuesta a TPA (TRE) a los que es capaz de unirse la proteína AP1. El TPA es un éster de forbol y un potente activador de la proteína cinasa C (PKC). La proteína AP1 fué identificada en un principio como un factor transcripcional que se une a un elemento del promotor de la metalotioneína humana (Lee, et al. 1987a), posteriormente se encontró que es capaz de unirse a los elementos de respuesta a TPA, que se encuentran en muchos genes celulares y virales (Angel, et al. 1987; Lee, et al. 1987b). Se ha visto que otros agentes que activan a la PKC también inducen la expresión de estos genes, y los inhibidores de la PKC bloquean la respuesta de inducción de los mismos. La comparación de muchos TREs permitió obtener una secuencia consenso de 8 bp 5'-TGA G/C TCA-3, a esta

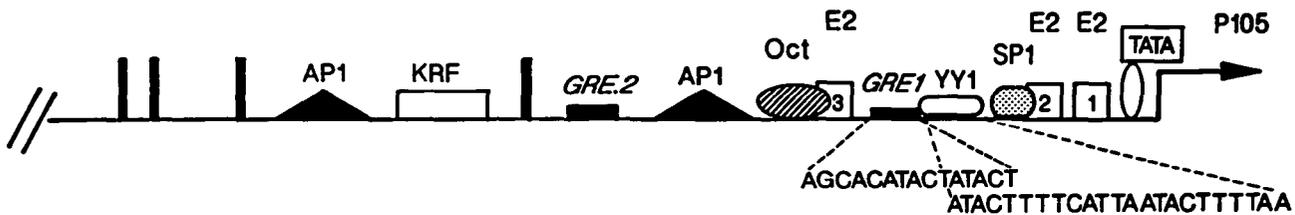


Fig. 2. Representación esquemática de la posición de los diferentes elementos de regulación que se localizan en la LCR del HPV-18.

secuencia se une a la proteína activadora API por lo que también se les ha dado el nombre de sitios API (Angel, et al. 1987; Lee, et al. 1987a).

Los sitios API del HPV-18 a los que se une dicha proteína, se encuentran localizados en los nucleótidos 7795 y 7613, o bien, con respecto al sitio de inicio del promotor en las posiciones -171 y -349. Estos sitios presentan secuencias idénticas 5'-TGACTAA-3'. Esta secuencia está muy relacionada a los sitios consenso API identificados en otros promotores (Thierry et al. 1992).

La integridad de los sitios API es indispensable para la actividad del promotor, esto indica que los factores API tienen un papel fundamental en la activación de este promotor y la inactivación de uno de ellos no puede ser funcionalmente compensada por el elemento remanente lo que indica que ambos elementos son requeridos para una eficiente activación del promotor E6/E7 (Butz y Hoppe-Seyler, 1993). Se ha visto en ensayos con células C-33 y queratinocitos humanos, que mutaciones en éstos sitios reducen hasta un 50% la actividad del promotor. También se determinó que ambos sitios contribuyen de igual manera en el nivel de transcripción a pesar de que se localizan en posiciones diferentes (Thierry et al., 1992).

Análisis de la región incrementadora constitutiva del HPV-18 muestran que cuando se aísla el sitio API y se coloca delante del promotor de la enzima timidina cinasa, en células HeLa y HaCaT,

sólo produce una estimulación muy débil de la transcripción, sin embargo, cuando el sitio API es mutado se observa una pérdida completa de la función incrementadora, estos hechos sugieren que existe una cooperación entre el sitio API y otros elementos *cis* adicionales presentes en ésta región (Butz y Hoppe-Seyler, 1993).

Aunque había sido reportado que el sitio API del promotor de HPV-18 es inducible por TPA en células HepG2 (Gius y Laimins, 1989) en células HeLa se encontró que este sitio API dentro del contexto de la LCR no tiene actividad y no es inducible por TPA, esto sugiere que este sitio está siendo regulado negativamente en células HeLa por algún elemento regulador negativo (Bauknecht et al., 1992).

El elemento Spl también mostró ser importante para la activación de la transcripción. Mientras que Spl es considerado un factor ubicuo que juega un papel importante en la transcripción de de una amplia gama de promotores celulares y virales, la composición de la familia de proteínas API ha mostrado ser dependiente del tipo celular, variando su regulación y distribución (Butz y Hoppe-Seyler, 1993; Hirai et al., 1989).

Estudios en tejidos de ratón mostraron que el nivel de expresión de los componentes de las proteínas API variaba con el tipo de tejido. Los niveles más altos de RNAm de JunD se observaron en intestino, timo, bazo y pulmón. En contraste, el RNAm de c-jun se expresa principalmente en pulmón y corazón, siendo indetectable en hígado, testículo, bazo y cerebro. Altos niveles de JunB y JunD

están presentes en cerebro, órgano que no contiene muchas células en división lo que sugiere que tienen otra función además de regular la transcripción de los genes que controlan el crecimiento (Wilkinson et al., 1989).

La inactivación del elemento KRF1 dió como resultado una reducción en la actividad del promotor que varió dependiendo del tipo celular utilizado (Butz y Hoppe-Seyler, 1993).

La región promotora del HPV-18 presenta un GRE cuya secuencia corresponde a AGCACANNNTATACT, este sitio tiene gran homología con la secuencia consenso de los GRE que actúan como reguladores positivos (GGTACANNNTGTTCT). La mutación del sitio GRE de la región promotora dió como resultado un aumento en la actividad basal de la LCR, es posible que la mutación caiga en un elemento de regulación negativa que se sobrelape con el sitio GRE. Se han sugerido la presencia de elementos de regulación negativa en la región del promotor ya que ésta región a pesar de tener elementos activadores como AP1 y Sp1 no presenta ninguna actividad intrínseca incrementadora (Butz y Hoppe-Seyler, 1993).

Ha sido identificado un elemento de regulación negativa en el promotor del HPV-18, este elemento se localiza en una región específica de 44 pb y muestra un alto grado de homología con elementos reguladores negativos de la región de control del gen N-ras del ratón, de la región incrementadora del gen de la albúmina de ratón y del elemento silenciador del promotor P5 del virus

asociado a adenovirus. Este elemento se identificó como el sitio de unión para el represor transcripcional YY1. Una mutación en el sitio de unión a YY1 lleva a un aumento en la actividad del promotor y de la región incrementadora del HPV-18, lo que demuestra que YY1 juega un papel importante como atenuador de la actividad del promotor de HPV-18 y por consiguiente de la expresión de los genes tempranos (Bauknecht et al., 1992).

Los elementos GRE y API pueden ser modulados externamente por tratamiento con glucocorticoides y ésteres de forbol respectivamente. Análisis basados en la actividad de un gen reportero y niveles de RNAm en ratones transgénicos sugiere que el receptor a glucocorticoides y la proteína API podrían interferir entre sí negativamente en la regulación de la LCR del HPV-18 en células epiteliales normales (García-Carrancá et al., 1988; Cid et al. 1993).

Debido a la falta de un sistema que permita la infección por HPV-18, la mayoría de los estudios han sido realizados en líneas celulares inmortalizadas o transformadas y por tanto la regulación de la expresión de los genes virales en células normales, en las cuales, el virus está presente por un periodo de latencia largo antes de la transformación maligna no es totalmente conocida (Cid et al. 1993).

Las proteínas API

El factor de transcripción API, además de mediar la respuesta celular a ésteres de forbol, responde también a suero, factores de crecimiento, citocinas y a los oncogenes c-H-ras, c-src y c-mos (Schütte et al., 1989).

La proteína API tiene como componente celular mayor, el complejo Jun-Fos. Todas las proteínas de la familia Jun pueden formar tanto homodímeros como heterodímeros, los cuales son capaces de unirse a los sitios API. Las proteínas de la familia Fos no son capaces de asociarse una con otra, ni de unirse al DNA, pero pueden asociarse con proteínas de la familia Jun y generar heterodímeros estables. Se ha observado que los heterodímeros Jun-Fos tienen una mayor actividad de unión al DNA que los homodímeros Jun. Estas diferencias en la actividad de unión al DNA no son debidas a la afinidad de éstos dímeros por el elemento, si no mas bien, por las diferencias que presentan en cuanto a estabilidad térmica es decir, los heterodímeros son más estables a 37°C que los homodímeros (Smeal et al., 1989), esto da como consecuencia un aumento en el número de moléculas Jun-Fos con respecto a las Jun-Jun (Rausher et al., 1988; Chiu et al., 1988; Sassone-Corsi et al., 1988; Kouzarides y Ziff, 1988).

Los miembros de la familia Jun: c-jun, JunB y JunD, comparten una gran homología en su secuencia nucleotídica, sin embargo, el gen JunB de humano está más estrechamente relacionado al gen JunB de ratón, que su contraparte c-jun de humano, ésto prueba que las

diferencias entre c-jun y JunB han sido mantenidas a lo largo la evolución. La mayor parte de las diferencias entre estas dos proteínas se localiza en la región amino terminal, que es la que les confiere la función de activador transcripcional, mientras que las regiones de mayor homología residen en el dominio de unión al DNA (Schütte et al., 1989).

El nivel de transcripción de los miembros de la familia Jun parece variar con los diferentes estímulos extracelulares, mientras c-jun y JunB responden a algunos estímulos mitógenos, la expresión de JunD parece variar poco (Hirai, et al., 1989; Pertovaara et al., 1989; Ryder et al., 1989).

Se ha encontrado que c-jun es capaz de activar la transcripción en ausencia de Fos, éstos resultados sugieren que el complejo de homodímeros de c-jun se forma *in vivo* y es completamente activo (Chiu et al., 1988; Sassone-Corsi, 1988).

Se ha observado que un aumento en la expresión de c-fos no aumenta la actividad transformante de c-jun, lo sugiere que c-jun es transformante sin la ayuda de c-fos, pero c-fos es completamente dependiente de c-jun.

El propio promotor de c-jun presenta un sitio AP1, este elemento es reconocido por los homodímeros c-jun, JunB y JunD. Mientras que c-jun es un eficiente activador de este promotor, JunB y JunD no lo son, de hecho JunB actúa como un regulador negativo y se propone que la unión de JunB al promotor de c-jun podría ser responsable de la falta de inducción por TPA, como se observa

después de un corto pretratamiento con CAMP. Mientras que la expresión de c-jun es inducida únicamente por TPA, la transcripción de JunB es además inducida por CAMP (Chiu et al., 1989; Angel y Karin, 1991; Deng y Karin, 1993).

Una cascada de amplificación es generada cuando el complejo AP1 inicial estimula la transcripción de c-jun en el contexto de abundante proteína Fos, llevando a niveles mas altos la actividad de AP1. Potencialmente esto podría ser un evento transformante, sin embargo, existe una rápida regulación negativa del sistema, ocasionada porque los RNAm y las proteínas involucradas tienen una vida media muy corta, además de que existe una regulación negativa de c-fos ejercida a través de sus sitios AP1 (Sassone-Corsi et al., 1988b).

Sin embargo, aún en la ausencia de Fos, las moléculas remanentes de c-jun pueden ser suficientes para mantener la alta actividad de AP1 y su potencial transformante (Schütte et al., 1989).

La coexpresión de JunB y c-jun da como consecuencia una disminución en el potencial de transactivación de ésta última proteína, debido a que JunB forma preferencialmente heterodímeros con c-jun, disminuyendo de este modo la formación de homodímeros c-jun. Los heterodímeros c-jun/JunB tienen una actividad de unión al DNA baja y por lo tanto actúan como transactivadores pobres (Chiu et al. 1989; Angel y Karin, 1991; Deng y Karin, 1993).

La proteína JunB no es capaz de activar promotores que

contengan un sólo sitio AP1, esto se ha demostrado tanto para promotores naturales como artificiales, sin embargo parece actuar como un activador efectivo en promotores artificiales que presentan múltiples sitios AP1 (Chiu et al., 1989; Shütte et al., 1989).

Aunque no ha sido ampliamente analizado el tercer miembro de la familia Jun, JunD, es también un transactivador poco eficiente, sin embargo, se ha visto que cuando es cotransfectado junto con c-fos, estimula la transcripción tan eficientemente como c-jun (Hirai, et al. 1989; Angel y Karin, 1991).

Existen varios datos que sugieren que la proteína JunB puede ser la que esté activando el promotor de HPV-18. El primero es el hecho de JunB requiera múltiples sitios AP1 para actuar como activador de la transcripción y la presencia de dos sitios AP1 en la LCR de HPV-18 (Angel y Karin, 1991). Otro hecho es la presencia de grandes cantidades de JunB en las células de las capas superiores de la epidermis, que corresponden a las capas del epitelio donde se ha detectado una transcripción eficiente de los genes E6 y E7 por hibridación *in situ*, esto sugiere que JunB puede estar involucrado en la especificidad tisular de la transcripción del HPV (Durst et al, 1992). Experimentos de unión de factores nucleares de queratinocitos y líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales a sitios AP1 del HPV-18 muestran que JunB se une con mayor afinidad a estos sitios que los demás miembros de la familia Jun, además cuando se utilizan anticuerpos específicos contra cada proteína se observa que el TPA activa principalmente a

JunB, una pequeña porción de JunD y con respecto a c-jun, prácticamente no se pudo detectar complejo (Thierry et al. 1992).

La modulación de la actividad de c-jun por fosforilación y desfosforilación es compleja, ya que la fosforilación de c-jun en sitios cercanos al dominio de unión al DNA disminuyen la actividad de unión a éste y la desfosforilación de uno de éstos sitios por una supuesta fosfatasa activada por la PKC resulta en un incremento en la actividad de unión al DNA, por otro lado se encontró que la fosforilación de c-jun en sitios de la región N-terminal que corresponde al dominio de activación, incrementa su potencial de transactivación (Angel y Karin, 1991; Binétruy et al. 1991). La expresión temporal de H-ras mutado y c-jun lleva a una hiperfosforilación de la serina 63 y 73 de c-jun localizadas en el en el dominio de transactivación N-terminal así como, una desfosforilación de uno o mas sitios del extremo C-terminal. El nivel del RNAm es regulado positivamente por ras (Smeal et al., 1991; Sistonen et al., 1991).

El complejo AP1 esta sujeto también a la regulación por interacciones con otras proteínas que no pertenecen a la familia jun o fos. Dos proteínas que se demostró recientemente que interactúan con el complejo AP1 y modifican su actividad son el receptor activado de glucocorticoides (Jonat et al. 1990; Yang-Yen et al., 1990; Schule et al., 1990) y la proteína E1A del adenovirus-2 (Angel y Karin, 1991).

Existen varios resultados que sugieren que la actividad de API puede estar siendo regulada negativamente por glucocorticoides, de hecho la unión de un sitio API a un promotor heterólogo es suficiente para conferir tanto respuesta a TPA como represión por dexametasona, esta represión es mediada por el receptor a glucocorticoides (Schule et al., 1990; Yang Yen et al., 1990). Cuando se purifica el receptor a glucocorticoides, éste no es capaz de unirse a los sitios API, ni la proteína API al elemento de respuesta a glucocorticoides. Se propone que los homodímeros c-jun y los heterodímeros c-jun y c-fos interactúan con el receptor a glucocorticoides y forman un complejo que no es capaz de unirse a sus respectivos elementos (Lee et al., 1987b; Yang-Yen et al., 1990, Schule et al., 1990; Jonat, et al., 1990).

Glucocorticoides y sitios GRE

Para el caso del HPV-18 no se puede descartar la posibilidad de que también exista una interferencia negativa con la proteína API y el receptor a glucocorticoides (Thierry et al., 1992). Experimentos que comprueban la aseveración anterior se hicieron con ratones transgénicos que portaban al gen reportero lacZ bajo el control de la LCR del HPV-18, después de 12 h de tratamiento con TPA se observa un incremento de por lo menos dos veces en la actividad de la beta galactosidasa; después de 12 h y 24 h de tratamiento con dexametasona se observa un incremento y un decremento en la actividad, respectivamente, esto muestra que los

glucocorticoides inducen la expresión poco tiempo después del tratamiento (6 a 12 h) pero la disminuyen después (12 a 24 h). Sin embargo el tratamiento concomitante con TPA y dexametasona muestra una disminución de la actividad de beta galactosidasa a las 12 h. si se compara con el tratamiento que incluye sólo TPA, esto indica que los factores de transcripción involucrados no cooperan entre sí, mostrando una interferencia mutua (Cid et al., 1993).

El mecanismo por el cual los glucocorticoides aumentan la expresión del HPV-16 propone que la hormona esteroide atraviesa la membrana de su célula blanco y se une al receptor de glucocorticoides (GR) que se localiza en la región citoplasmática. En la ausencia de la hormona glucocorticoide el monómero GR es inactivo porque se encuentra asociado con una proteína de choque térmico. La unión de los glucocorticoides disocia el complejo y activado el GR es introducido al núcleo donde se une al DNA en el sitio GRE, incrementando la transcripción (Pater et al., 1994). Estudios *in vitro* indican que el dímero hormona-GR aumenta el nivel de transcripción al facilitar la formación del complejo de preinicio de la transcripción, de tal manera que el mecanismo de inducción parece ser a nivel del inicio de la transcripción (Pater et al., 1994).

Los elementos GRE de muchos HPVs, incluyendo el del HPV-18, también funcionan como elementos de respuesta a progesterona, el mecanismo por el cual la progesterona aumenta el nivel de transcripción de los genes del HPV se piensa que es similar al de

los glucocorticoides (Chan et al., 1989; Pater et al., 1994).

A pesar de que se ha reportado que el HPV-18 presenta dos sitios GRE dentro de la LCR, uno dentro del promotor y otro dentro de la región incrementadora constitutiva (Cid et al., 1993), se ha demostrado que el único sitio funcional que presenta respuesta a glucocorticoides es el del promotor, ya que una mutación en este sitio es suficiente para abolir totalmente la estimulación dependiente de hormonas, esta actividad no pudo ser funcionalmente compensada por ninguna otra secuencia regulatoria de la LCR lo que sugiere que no existen sitios GRE adicionales que contribuyan a la inducción de la transcripción por hormonas (Butz y Hoppe-Seyler, 1993).

La proteína AP1 y su interacción con otros oncogenes

Se han encontrado diferencias en la capacidad de AP1 para activar o reprimir la expresión de genes a través del mismo elemento regulador y esto se puede atribuir a varias causas: al promotor en el que se encuentra dicho elemento y al ambiente celular, a las modificaciones que sufra la proteína AP1 en cada tipo celular; a la cantidad de alguna proteína represora de AP1 y a los niveles de actividad de AP1 o su composición (Angel y Karin, 1991).

Transfecciones de expresión temporal de varios oncogenes tales como: src, H-ras, raf, neu y mos provocan un aumento en la actividad de AP1. Estos oncogenes emplean diferentes mecanismos

para modular la actividad de AP1. La expresión temporal de H-ras activado incrementa la expresión de c-jun, JunB y c-fos, pero en células que expresan constitutivamente a H-ras mutado la expresión de JunB y c-fos ya no es inducida (Herrlich y Ponta, 1989; Schontal et al., 1988).

La expresión de la proteína JunD en una línea celular transformada por ras se reduce a un 35% comparación con la línea celular no transformada (Pfarr et al., 1994).

Se sabe que el gen c-jun es capaz de cooperar con ras para la transformación celular, ya que se ha visto que H-ras incrementa el potencial de transactivación de c-jun lo que correlaciona con un incremento en el nivel de fosforilación del dominio de activación N-terminal, este nivel de fosforilación de c-jun es cuatro veces mayor cuando se cotransfecta con H-ras, por otro lado se encontró que H-ras no es capaz de afectar la actividad de JunB. (Angel y Karin, 1991; Binétruy et al. 1991)). Anteriormente se había reportado que JunB y ras podían ocasionar transformación de células primarias de embriones de rata, aunque en menor grado que cuando coopera con c-jun, en éstos experimentos se observó que tanto c-jun como JunB interfieren entre sí ocasionando una regulación negativa (Schutte et al., 1989).

La proteína Jun D a diferencia de c-jun, mostró disminuir parcialmente el efecto de transformación de un gen ras activado, estos resultados indican que dos factores de transcripción

estrechamente relacionados pueden funcionar de manera opuesta (Pfarr et al., 1994).

Aunque no se conoce el efecto de H-ras sobre la fosforilación de c-fos, un reporte reciente indica que el incremento en el nivel de fosforilación de c-fos lo convierte en un autorepresor, por tanto la mayor parte de la actividad AP1 en células transformadas por H-ras es probablemente sostenida por una forma fosforilada de c-jun (Binétruy et al. 1991).

Se podría decir que la función de AP1 es activar la transcripción de una variedad de genes en respuesta a un estímulo de los receptores de superficie de la célula que están conectados a diferentes vías de transducción de señales, por tanto AP1 juega un papel general en la transducción de señales desde la membrana hasta el núcleo (Angel y Karin, 1991).

El gen *ras*

El gen *ras* fué identificado originalmente como un oncogen del virus de sarcoma de rata y posteriormente se encontró que desempeña un papel crucial en el control del crecimiento de células normales y transformadas (Barbacid, 1987).

Las células de mamíferos expresan cuatro proteínas *ras*, H-ras, N-ras, K-rasA y K-rasB, todas codifican para una proteína de 189 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 21 kda, siendo generalmente designadas como p21. La mayor parte de la secuencia de aminoácidos se conserva en los diferentes tipos protéicos. Cada una

puede funcionar como un oncogen después de una activación mutacional, ya que se ha visto que adquieren propiedades de transformación por mutaciones puntuales que afectan la incorporación de los residuos de aminoácidos 12 y 61, en su respectiva proteína p21 (Marshall, 1988; Boguski y McCormick, 1993; Santos et al., 1984). El producto de estos genes mutados ha perdido la habilidad de hidrolizar trifosfato de guanosina eficientemente y llega a estar activado de manera constitutiva (Finney y Bishop, 1993). Además de las mutaciones puntuales se sabe que la sobreexpresión de *ras* es capaz de producir transformación celular (McKay et al., 1986).

Los genes *ras* codifican para proteínas que unen nucleótidos de guanina, tienen actividad de GTPasas y están asociadas a la membrana plasmática. Estas proteínas participan en la transducción de señales a través de la membrana celular (Barbacid 1987).

Se sabe que la activación de las proteínas *ras* es un paso clave para que se desencadenen las vías bioquímicas, esto ocurre cuando el ligando se une al receptor de superficie, que es a su vez una tirosina cinasa (Fig. 3). Esta clase de receptores responde a una gran variedad de moduladores celulares que incluyen factores de crecimiento y neurotróficos, así como, factores involucrados en la respuesta inmune (Barbacid, 1987; Boguski y McCormick, 1993; Feig, 1993).

La conformación GTP de *ras* es la forma activa ya que puede interaccionar con su molécula blanco que traduce la señal y la

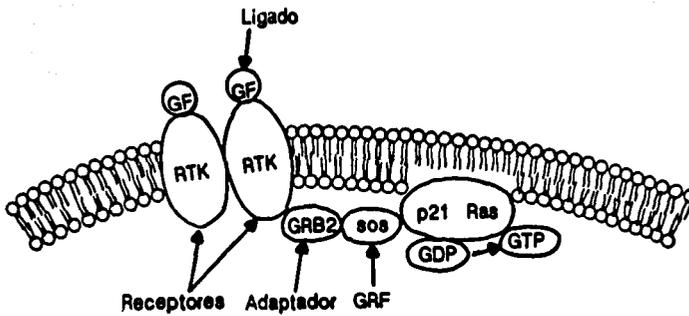


Fig. 3. Mecanismo de activación de *ras*. El factor de crecimiento (GF) se une al receptor (RTK). El receptor activa una proteína que es capaz de eliminar el GDP unido a *ras* (GRF) a través de un adaptador (GRB), pasando *ras* de la forma unida a GDP a la forma GTP.

conformación GDP es la forma inactiva ya que no puede estimular la molécula blanco. Las dos formas pueden intercambiarse una en la otra de dos maneras; una es la reacción de intercambio de nucleótido y la otra es la hidrólisis de GTP. La disociación de GDP del complejo proteico-GDP está limitada por la velocidad, ya que una proteína libre de ligando inmediatamente une GTP que es más abundante que el GDP, la liberación del GDP unido a ras es catalizado por factores que liberan el nucleótido de guanina (GRFs), de esta forma ras es activado y una proteína "adaptadora" (Sem5/Grb2) parece mediar la interacción de algunos GRFs y el receptor activado (Kaziro et al., 1991; Feig, 1993).

EL GTP unido a la proteína es hidrolizado por la actividad de GTPasa de la propia proteína, sin embargo, las proteínas que activan a la GTPasa aceleran dramáticamente su hidrólisis, pasando de este modo, de la forma GTP a la forma GDP unida a la proteína (Kaziro et al., 1991, Satoh et al., 1992; Feig, 1993). La proteína ras-GTP transmite la señal a otro oncogen llamado raf-1 y de ésta a una serie de enzimas llamadas proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Cuando las cinasas MAP son activadas en respuesta a factores de crecimiento, controlan la actividad de otras enzimas que unen grupos fosfato a sus moléculas blanco (Marx, 1993).

Recientemente se han analizado tumores cérvico-uterinos y se ha encontrado que además de presentar secuencias de HPV, un alto porcentaje del tipo de adenocarcinomas presentan el gen H-ras mutado (Lizano comunicación personal). Estos hechos, junto con los

análisis *in vitro* que muestran la cooperación entre los HPVs y otros oncogenes para causar transformación celular, hacen notar la importancia de la presencia de factores adicionales al HPV para que se lleve a cabo el desarrollo de este tipo de cáncer. De hecho se sabe que el proceso de formación de un tumor requiere de varios eventos celulares para convertir una célula normal en una transformada, el cáncer es una enfermedad multifactorial y la presencia del HPV en conjunto con H-ras mutado, puede estar siendo determinante para el desarrollo del cáncer cérvico-uterino.

JUSTIFICACION

El cáncer cérvico-uterino ocupa el primer sitio en mortalidad por cáncer en la mujer mexicana. De ahí que su estudio para una mejor prevención, control y cura sea de gran importancia.

Se sabe que existen muchos factores de riesgo que favorecen el desarrollo de este cáncer, sin embargo, algunos parecen tener mayor importancia que otros. Análisis del DNA de tumores cérvico-uterinos han mostrado que en más del 90% de ellos existen secuencias de DNA de HPVs. También se han encontrado en un gran número de tumores alteraciones en genes celulares, como es el caso del protooncogen *ras*. Existen además, otros factores que favorecen el desarrollo del cáncer, como es el uso de anticonceptivos orales, el tabaquismo, y la procreación de muchos hijos, entre otros.

El comprender los mecanismos moleculares que relacionan la presencia de HPV y H-*ras* mutado con el cáncer cérvico-uterino, es de gran importancia para desarrollar mejores medidas terapéuticas e incluso proponer medidas que reduzcan al mínimo el desarrollo de ésta enfermedad.

OBJETIVOS

Determinar el efecto del gen H-ras sobre la actividad de la región larga de control (LCR) del HPV-18.

Determinar si el efecto de H-ras se ejerce a través de los sitios AP1 de la LCR del HPV-18.

Determinar cuales miembros de la familia Jun regulan la transcripción, en respuesta a la actividad de H-ras.

Determinar si el elemento de respuesta a glucocorticoides actúa como un modulador positivo o negativo de la transcripción basal de la LCR del HPV-18.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

Células: Las células utilizadas para los ensayos de transfección fueron las C-33, éstas se derivan de un carcinoma de cérvix y no contienen secuencias de HPVs. Las células fueron cultivadas en Medio Dulbecco Modificado por Eagle (DMEM), suplementado con suero fetal al 7%.

Bacterias: Las bacterias que se utilizaron para obtener los diferentes plásmidos fueron *E. coli* de la cepa DH5alfa. Las bacterias fueron crecidas en medio Luria-Bertani (Bactotripton 1%, extracto de levadura 0.5%, cloruro de sodio 1%; pH 7.0) o medio SOB (Bactotripton 2%, extracto de levadura 0.5%, cloruro de sodio 0.05%; pH 7.0). En el caso de las bacterias que fueron transformadas se agregó al medio ampicilina a una concentración de 100 µg/ml.

DNAs recombinantes

El gen H-ras normal y H-ras mutado fueron clonados en el vector pBR322 como lo reportan Tabin et al., 1982.

Los plásmidos que expresan las proteínas Jun y Fos ya fueron previamente descritos por Hirai et al., 1990. El plásmido que incluye a la LCR del HPV-18 unida al gen reportero CAT (Fig. 4) fué

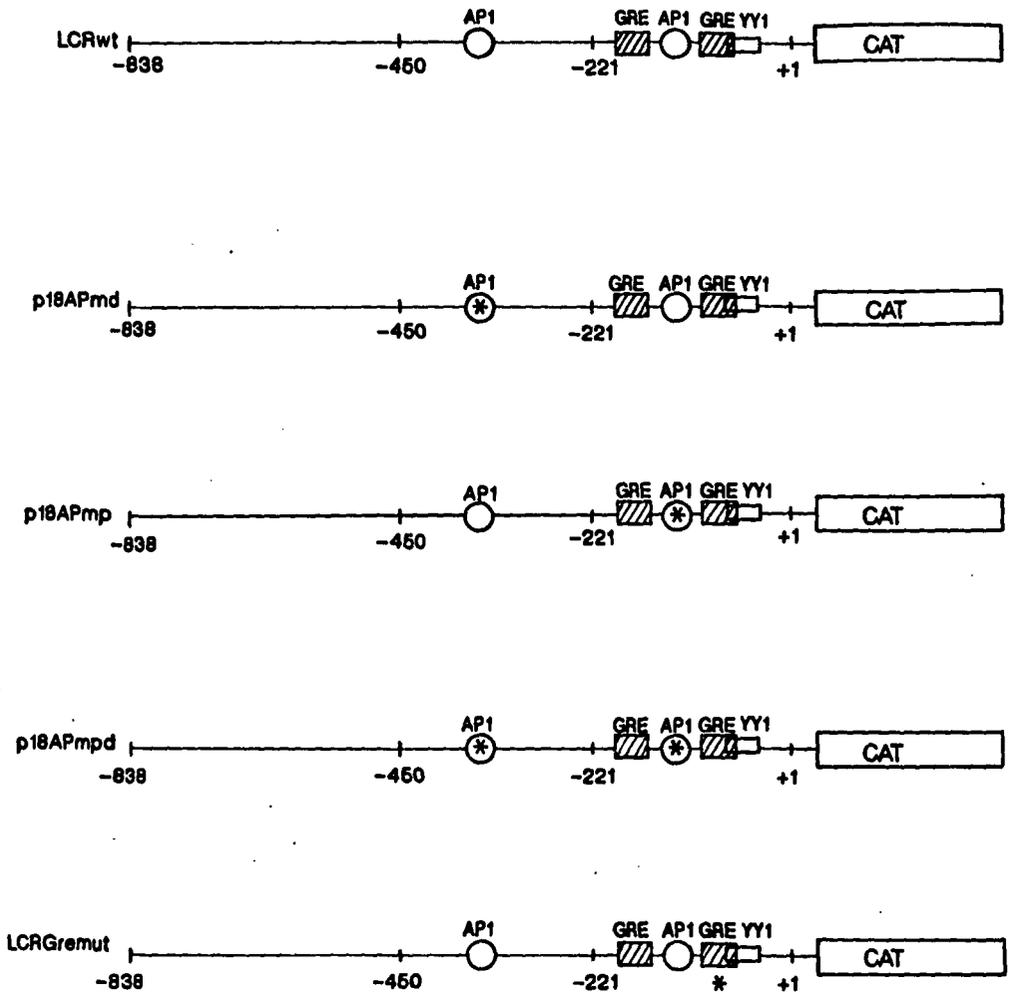


Fig. 4. Representación esquemática de los plásmidos reporteros empleados en los diferentes ensayos de transfección.
 Nota: Los asteriscos indican el sitio mutado.

construido como se reporta por Thierry et al., 1987b. Los plásmidos que incluyen las mutantes AP1 de la LCR del HPV-18 (Fig. 4) se construyeron como lo reportan Thierry y Howley, 1991 y Thierry et al., 1992. La mutante de la LCR en el sitio GRE funcional (Fig. 4) fué hecha por García-Carrancá, 1995 (sometido).

Bacterias competentes

La cepa DHSalfa se sembró en medio SOB complementado con 10 mM de sulfato de magnesio y se creció en agitación constante (200 rpm) a 37 °C, durante toda la noche. Se inocularon 500 µl del precultivo en 50 ml de medio SOB complementado con 10 mM de sulfato de magnesio y se crecieron en agitación constante a 37 °C, hasta alcanzar una D.O. de 0.5 a 550 nm. Se transfirieron a tubos Falcon de 50 ml, en condiciones de esterilidad y se colocaron 10 min en hielo. Se centrifugaron a 2500 rpm durante 12 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y las bacterias fueron resuspendidas en 16 ml de solución amortiguadora RF1 (30 mM acetato de potasio, 100mM cloruro de rubidio, 10 mM cloruro de calcio, 50 mM cloruro de manganeso, 15% glicerol; ajustar a pH 5.8 con ácido acético), se incubaron durante 15 min en hielo y se centrifugaron a 2500 rpm durante 12 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 4 ml de solución amortiguadora RF2 (10 mM MOPS o PIPES, 25 mM cloruro de calcio, 10 mM cloruro de rubidio, 15% glicerol; ajustar a pH 6.5 con hidróxido de potasio), se incubó durante 15 min en

hielo. Finalmente se distribuyó en alícuotas de 200 μ l y se almacenaron a -70°C , hasta su uso.

Transformación de bacterias competentes

Se tomaron 200 μ l de bacterias competentes por cada DNA plasmídico. Se incubó durante 20 min en hielo y se agregaron entre 50 y 100 ng de DNA. Se dió un choque térmico durante 90 seg a 42°C y posteriormente se colocaron en hielo durante 2 min. Se agregaron 800 μ l de medio SOB y se incubaron a 37°C durante 45 min en agitación constante. Se tomaron 50 μ l del medio con las bacterias y se sembraron en cajas de medio LB suplementado con ampicilina. Las bacterias restantes se centrifugaron 30 seg, se tiró el sobrenadante y se resuspendieron en aproximadamente 50 μ l de medio SOB, se sembraron en cajas de medio LB con ampicilina. Se incubaron durante toda la noche.

Obtención de grandes cantidades DNA plasmídico.

Se sembró una colonia transformada con el plásmido deseado en 5 ml de medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y se incubó a 37°C en agitación constante durante toda la noche. El pie de cultivo se agregó a 500 ml de medio LB con ampicilina, se incubó a 37°C hasta alcanzar una D.O. de 0.6 a 600 nm y se agregó cloranfenicol a una concentración final de 170 $\mu\text{g/ml}$. Se incubó a 32°C en agitación constante durante toda la noche. Las bacterias se centrifugaron a

4 °C, durante 15 min a 5000 rpm , se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 8 ml de la solución TS (125 g sacarosa, 25 ml Tris 1 M pH 8.0, agua destilada c.b.p. 500 ml). Se agregaron 8 ml de ELT (40 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0, 400 mg de lisozima, 0.2 ml de Triton X 100, agua destilada c.b.p. 200 ml), se mezcló suavemente y se incubó 15 min a temperatura ambiente y 10 min a 70 °C. Se centrifugó a 40,000 rpm durante 20 min a 4 °C en un rotor 50Ti. Se tomó el sobrenadante y se le agregó un volumen de PEG (100 g polietilen glicol, 29.22 g cloruro de sodio, 5 ml Tris 1M pH 8.0, 1 ml EDTA 0.5 M pH 8.0, agua destilada c.b.p. 500 ml), se incubó 30 min a temperatura ambiente, se centrifugó 10 min a 3000 rpm en un rotor SS34, se eliminó el sobrenadante y el DNA precipitado se resuspendió en TE pH 8.0 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0).

Purificación de DNA plasmídico por gradiente de Cloruro de Cesio.

A la mezcla de DNA y TE se agregó 1 g de CsCl por ml de mezcla, se disolvió perfectamente y por cada 10 ml de la mezcla de DNA-TE-CsCl se agregó 0.8 ml de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml). Se colocó la mezcla en tubos quick-seal y se centrifugaron en un rotor NVT90 a 85,000 rpm durante 3.5 h. La banda de DNA plasmídico se recolectó con una jeringa, picando el tubo justo abajo de la banda deseada. El DNA obtenido, se dializó en una solución de TE, haciendo varios cambios de la misma.

Finalmente el DNA se cuantificó leyendo a 260 nm y se comprobó su pureza leyendo a 280 nm.

Transfección de células por el método de Cloruro de Calcio.

Se crecieron células C-33 a confluencia en cajas de Petri de 100 mm de diámetro. Se tripsinizaron y se colocaron en cajas de Petri de 60 mm a una concentración de 7.5×10^5 con 5 ml de medio DMEM suplementado con 7% de suero fetal bovino. Se incubaron a 37° C durante toda la noche. Se cambió el medio viejo por fresco cuatro horas antes de que se hiciera la transfección, en este paso sólo se agregaron 2 ml de medio.

Se colocó el DNA a transfectar en diferentes tubos y se llevó a un volumen final de 50 µl con agua estéril, se agregaron 500 µl de solución HEBS 1X (8 g cloruro de sodio, 99.4 fosfato de sodio anhidro, 0.370 mg cloruro de potasio, 5 g HEPES, agua destilada c.b.p. 1000 ml, pH 7.05), se mezcló y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se agregaron 25 µl de CaCl₂ 2.5M mezclando constantemente, se incubó 10 min a temperatura ambiente y se agregó directamente al medio de las células. Después de una noche de incubación, las células se lavaron 3 veces con la solución Tris Dulbecco (137 mM cloruro de sodio, 5 mM cloruro de potasio, 0.7 mM fosfato de sodio, 25 mM tris base c.b.p. 1000 ml, pH 7.4) y se agregaron 5 ml de medio DMEM suplementado con 7% de sueron fetal bovino. 40 h después de la transfección, las células se lavaron dos

veces con PBS (137 mM cloruro de sodio, 3 mM cloruro de potasio, 8 mM fosfato de sodio, 2mM fosfato de potasio, agua destilada c.b.p. 1000 ml) y el tapiz celular fué resuspendido en 1 ml de PBS y colocado en tubos eppendorf. Las células se centrifugaron 1 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 200 μ l de una solución de Tris-glicerol (250 mM Tris pH 8.0, 15% glicerol). El extracto celular se obtuvo congelando y descongelando las células al incubarlas por períodos sucesivos de tres minutos en un baño de hielo seco con etanol y a 37 °C, repitiéndose por lo menos tres veces. Por último, se centrifugó durante 10 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante.

Ensayo de beta-galactosidasa.

Un volumen de 50 μ l de cada extracto celular se completó a 1 ml con PBS y se agregaron 200 μ l de o-Nitrofenil-beta-D-galactopiranosido (4 mg/ml). Se incubó a 37 °C durante 3 h o hasta que apareciera el color amarillo. La reacción se paró con 0.5 ml de carbonato de sodio 1 M.

Ensayo de cloranfenicol acetil transferasa.

Por el método de Bradford, 1976; se cuantificó la concentración proteica de cada extracto y con base en los resultados se tomaron concentraciones iguales para este ensayo. El volumen de extracto celular se completó a 150 μ l con una solución

de Tris pH 8 250 mM y se agregaron 8 μ l de acetilCoA (10 mM) y 2 μ l de cloranfenicol 14 C (0.1 μ Ci/ μ l). Se incubó a 37 °C durante 3 h. La reacción se paró con 250 μ l de acetato de etilo y se mezcló vigorosamente durante 30 seg. Se centrifugó 10 min a 4 °C y se tomó la fase orgánica colocándose ésta en el speedvac durante 10 min. Finalmente se resuspendió en 10 μ l de acetato de etilo y se colocó sobre una placa de cromatografía. La placa de cromatografía se colocó en una cámara previamente saturada con 190 ml de cloroformo y 10 ml de metanol, dejándose migrar durante 1 h. El tiempo de exposición de las placas varió entre dos y siete días.

La actividad de CAT se calculó en un contador de líquido de centelleo cuantificando la cantidad de cloranfenicol marcado con C^{14} acetilado y no acetilado. Del total de la radiactividad contada se obtuvo el porcentaje de cloranfenicol acetilado, que representa la actividad de la enzima CAT.

RESULTADOS

Efecto del gen H-ras sobre la actividad transcripcional del HPV-18.

Para determinar si el gen H-ras tiene algún efecto sobre la expresión temprana del HPV-18, se cotransfectaron células C-33 con 2 µg del plásmido que contiene a la LCR del HPV-18 unida al gen reportero CAT (Fig. 4) y con 5 µg de los plásmidos que contienen al gen H-ras normal (pEC) o al gen H-ras mutado en Val12 (pEJ). Las cantidades empleadas fueron determinadas con base en estudios preliminares en los que se realizaron curvas de concentración seleccionándose aquella en la que el efecto observado era más evidente. Los extractos celulares obtenidos después de la transfección se utilizaron para determinar la actividad de la enzima CAT, usando como sustrato cloranfenicol marcado radiactivamente. Se hicieron cromatografías en capa fina y la actividad de la enzima se determinó leyendo en un contador de líquido de centelleo, las zonas correspondientes al cloranfenicol acetilado y no acetilado. Los resultados mostrados representan el promedio de por lo menos 5 ensayos.

Los resultados obtenidos nos muestran que el gen H-ras normal incrementa 30% el nivel de transcripción de la enzima. Este ligero aumento en la expresión de los oncogenes virales, se explica con el hecho de que la sobreexpresión de un protooncogen puede estar teniendo un efecto similar al del oncogen mutado (McKay et al., 1986), en este caso el efecto es menor, ya que con el gen H-ras

mutado se observa un incremento en la transcripción de poco más del doble (110%), (Fig. 5).

Los resultados indican que tanto H-ras mutado como H-ras normal están afectando la expresión de los oncogenes E6 y E7 del HPV-18, aunque en diferente grado.

Como se sabe H-ras es una proteína anclada a la cara interna de la membrana y el efecto sobre la LCR del HPV-18 no podía ser una interacción directa, por ello se quiso determinar a través de qué proteína podía estar actuando H-ras para activar la transcripción de los oncogenes del virus.

Papel de los elementos de respuesta a glucocorticoides sobre la transcripción temprana del HPV-18.

Previamente se ha reportado que el sitio GRE podría actuar como regulador negativo de la transcripción temprana, ya que cuando se encuentra mutado, la actividad basal de la LCR se incrementa a más del doble (Butz y Hoppe-Seyler, 1993). Sin embargo, en otro reporte se encontró que dentro de la LCR existe una secuencia YY1 que se sobrelapa con el sitio GRE (Bauknecht et al., 1992), las secuencias YY1 se encuentran en diversos promotores y actúan como reguladores negativos de su actividad transcripcional. Para determinar si el sitio GRE actúa como regulador negativo de la transcripción, se hicieron ensayos de transfección en los que se utilizó la LCR con el sitio GRE mutado, en el que se cambió una citosina por una adenina en la posición 5 de la secuencia

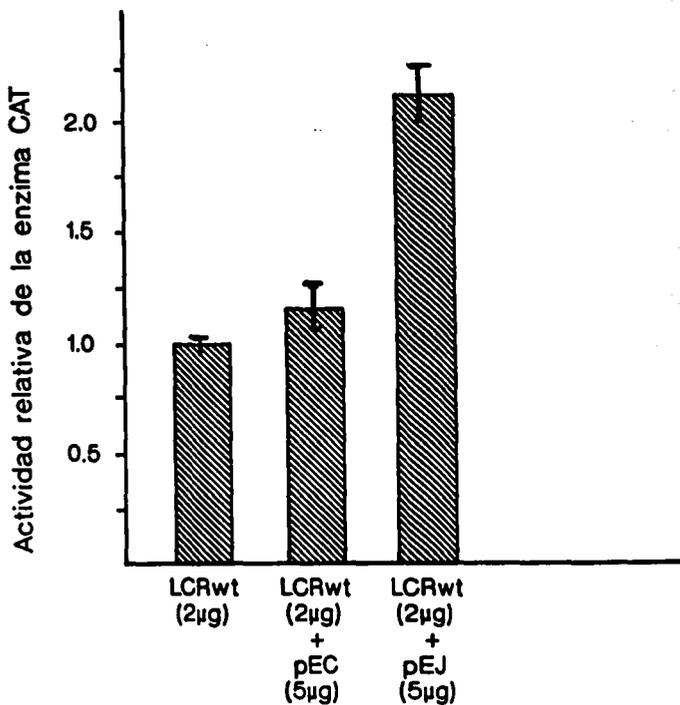


Fig. 5. Efecto del gen H-ras sobre la actividad transcripcional de la región larga de control del HPV-18. La gráfica muestra la actividad de la enzima CAT en extractos de células C-33 transfectadas con el plásmido que contiene a la LCR unida al gen reportero CAT y los plásmidos pEC o pEJ. La actividad se expresa en número de veces sobre la basal, que se igualó a uno.

(AGCACATACTATACT), la mutación se localiza en una base altamente conservada en los elementos de respuesta a glucocorticoides que actúan positivamente.

Los resultados que se muestran representan el promedio de por lo menos cinco ensayos. Los resultados obtenidos nos indican que esta mutación produce una disminución del 40% en la actividad basal de la LCR, sin embargo, cuando se introduce el gen H-ras mutado se observa un aumento del 50% en el nivel de transcripción (Fig. 6 y Fig. 7).

Los resultados nos indican que el sitio GRE no está actuando como un regulador negativo, ya que se observa una disminución en el nivel de transcripción cuando éste es mutado. Al comparar la secuencia GRE del HPV-18 con las secuencias consenso de los GRE que actúan como reguladores positivos y los GRE que se comportan como reguladores negativos, podemos observar que presenta mayor homología con los elementos que actúan como reguladores positivos, esto concuerda con los resultados obtenidos.

Transactivación de las proteínas c-jun, JunB y JunD sobre la LCR del HPV-18.

Se sabe que la LCR de HPV-18 presenta dos sitios AP1 a los cuales se unen las proteínas AP1, constituidas por dímeros Jun/Jun o Jun/Fos. Estos sitios son determinantes para mantener la actividad de la LCR, por ello se quiso determinar si H-ras estaba actuando sobre esta región a través de este grupo de proteínas. Se

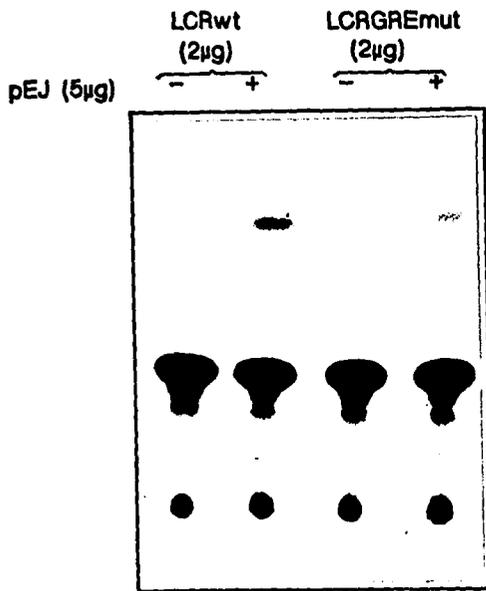


Fig. 6. Efecto del sitio GRE sobre la actividad basal de la LCR del HPV-18. La figura muestra un ensayo CAT de células C-33 transfectadas con la LCR mutada en el sitio GRE proximal o la LCR silvestre, en presencia y ausencia de H-ras.

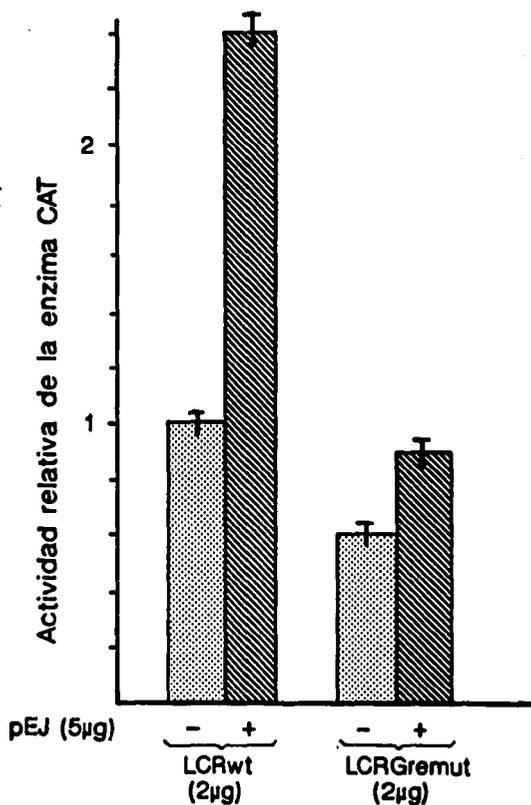


Fig. 7. Efecto del sitio GRE sobre la actividad basal de la LCR del HPV-18. La gráfica muestra las actividades relativas de CAT en células C-33 transfectadas con los plásmidos que contienen a la LCR silvestre o a la LCR con el sitio GRE proximal mutado, en ausencia o presencia de H-ras.

llevaron a cabo ensayos de transfección utilizando el plásmido que contiene a la LCR unida al gen reportero CAT y plásmidos que contienen a los genes que expresan las proteínas c-jun, JunB y JunD. Los extractos obtenidos se procesaron como se describió anteriormente en material y métodos. La cantidad de los plásmidos Jun empleados, se determinó haciendo una curva de concentraciones y seleccionando aquella en la que el efecto fuera más evidente, las concentraciones que mostraron mayor efecto oscilaron entre 2 y 6 μ g. Los resultados que se muestran representan el promedio de tres ensayos.

Los resultados obtenidos muestran que los homodímeros JunB y JunD no son capaces de activar la transcripción de la LCR e incluso se observa cierto grado de represión (Fig. 8). A diferencia de los anteriores se observa que el homodímero c-jun activa la transcripción poco más de 5 veces. Cuando éstos genes son además cotransfectados con el gen H-ras mutado, se observa un incremento aún mayor en el nivel de transcripción, sin embargo, el incremento con las proteínas JunB y JunD es sólo de aproximadamente el 50% (Figs. 9, 10 y 11). Si se compara esto con el nivel de transcripción obtenido cuando se cotransfecta sólo la LCR y H-ras mutado, podemos sugerir que éstas proteínas disminuyen a la mitad el efecto de H-ras. Por otro lado cuando la proteína c-jun se cotransfecta con H-ras mutado, se observa que el nivel de transcripción de la LCR aumenta más de 11 veces, poco más que la sumatoria del efecto de cada uno por separado. Estos resultados

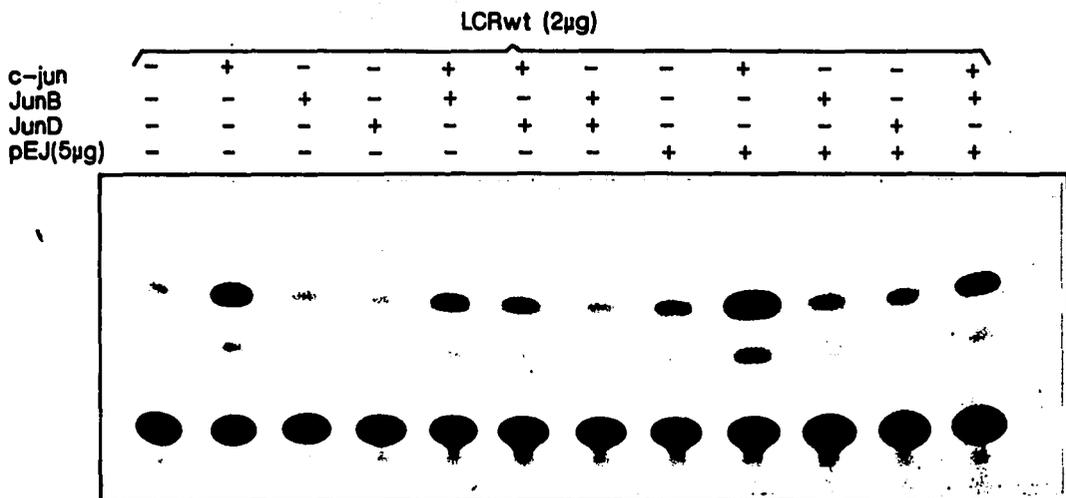


Fig. 8. Efecto de los diferentes miembros de la familia Jun sobre la expresión temprana del HPV-18. La figura muestra un ensayo CAT de células C-33 transfectadas con la LCR silvestre (2 ug) y con los plásmidos que expresan las proteínas Jun, carriles 2-4 y 9-11 contienen 4 ug de plásmido, carriles 5-7 y 12 contienen 2 ug de cada plásmido. El efecto de H-ras, también fué observado.

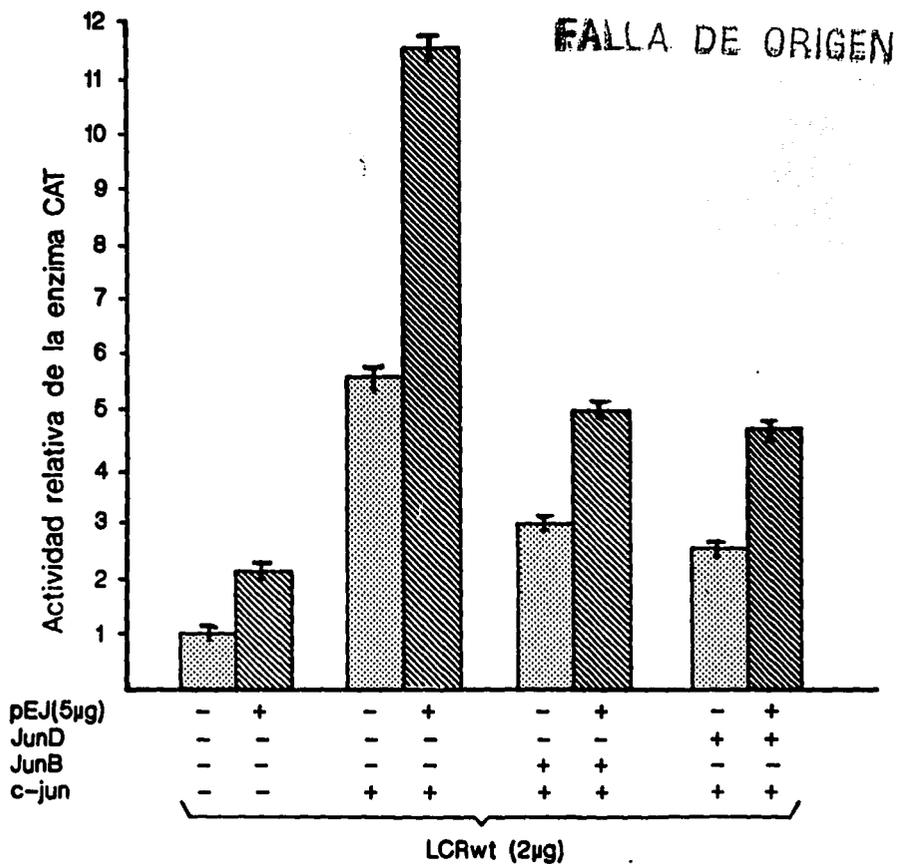


Fig. 9. Efecto de la proteína c-jun sobre la expresión temprana del HPV-18 y su cooperación con el gen H-ras. La gráfica muestra las actividades relativas de la enzima CAT.

FALLA DE ORIGEN

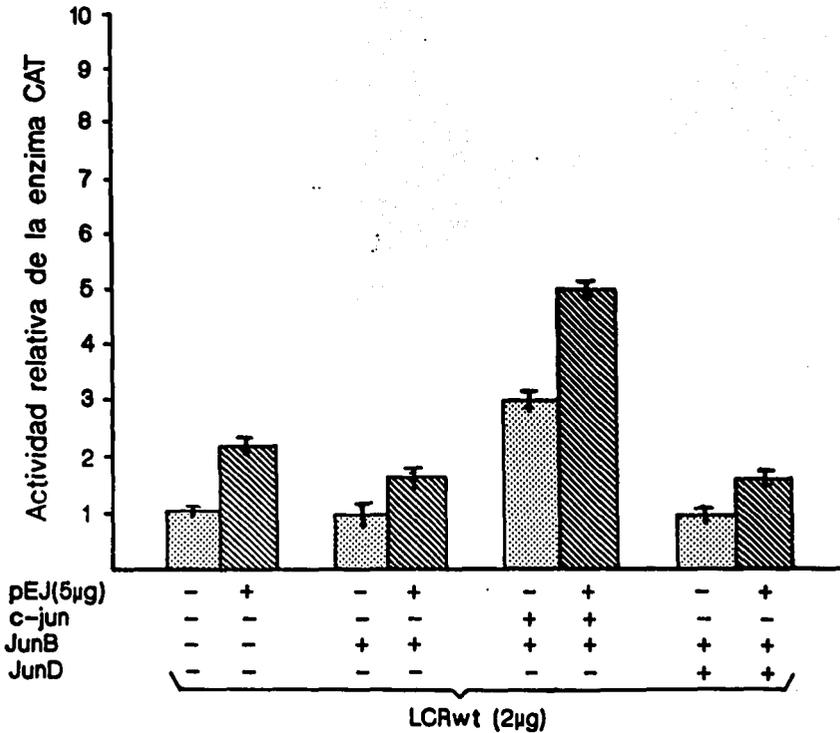


Fig. 10. Efecto de la proteína JunB en ausencia o presencia de H-ras, c-jun y JunD sobre la expresión temprana del HPV-18. La gráfica muestra las actividades relativas de la enzima CAT.

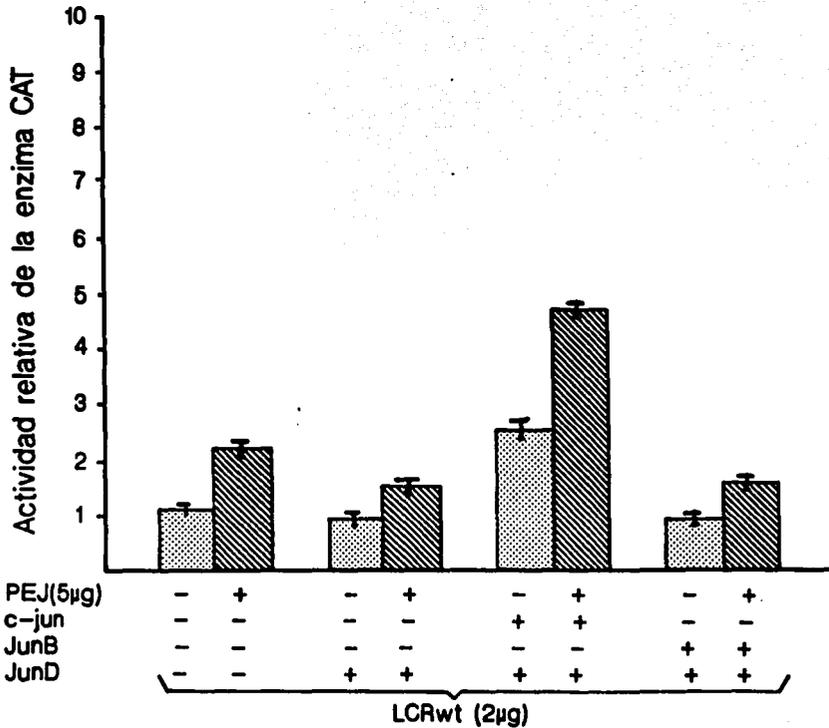


Fig. 11. Efecto de la proteína JunD en ausencia o presencia de H-ras, c-jun y JunB sobre la expresión temprana del HPV-18. La gráfica muestra las actividades relativas de la enzima CAT.

sugieren que H-ras puede estar ejerciendo su efecto sobre la LCR a través de la proteína c-jun. Lo anterior concuerda con reportes que indican que H-ras es capaz de transactivar a la proteína c-jun y no a JunB y JunD. Sin embargo, el hecho de que c-jun y no JunB sea la proteína transactivadora de la LCR de HPV-18 es un poco controversial, ya que se ha reportado que ésta última podría ser la proteína transactivadora más importante, sin embargo, en ningún caso se realizaron ensayos de transfección para corroborar su hipótesis.

Cuando se cotransfecta c-jun con JunB o JunD, se observa que estas dos últimas proteínas disminuyen el efecto de transactivación de la primera (Figs. 8 y 9), estos resultados podrían ser consecuencia de la formación preferencial de heterodímeros c-jun/JunB o c-jun/JunD, los cuales pueden actuar como transactivadores pobres disminuyendo el potencial transcripcional de c-jun (Deng y Karin, 1994; Pfarr et al., 1994).

Los resultados obtenidos sugieren que JunB y JunD no actúan como reguladores positivos de la transcripción de los oncogenes E6 y E7 del HPV-18, observándose incluso una ligera disminución en el nivel de transcripción basal. Por su parte c-jun parece ser la proteína activadora de la expresión de dichos genes.

Se sabe que para muchos promotores las proteínas AP1 son más activas cuando se unen heterodímeros Jun/Fos a los sitios AP1, sin embargo, en nuestro sistema nosotros observamos que en ningún caso los heterodímeros JunB/c-Fos, ni JunD/c-Fos aumentan la actividad

de la LCR (datos no mostrados). Si bien con los heterodímeros c-jun/c-fos, c-jun/JunB y c-jun/JunD se observa activación, ésta es menor que para el homodímero c-jun.

Efecto de los sitios AP1 sobre la actividad de la LCR del HPV-18.

Para corroborar que el efecto de transactivación ejercido por el gen H-ras a través de c-jun ocurría sobre los sitios AP1, se hicieron ensayos de transfección en los que se utilizaron plásmidos que contienen a la LCR con uno o ambos sitios AP1 mutados (Fig. 4). Estos plásmidos fueron construidos por Thierry et al., 1992; la mutante en el sitio AP1 proximal presenta un cambio en la secuencia 5'-TGACTAA-3' a 5'-TAAGTAA-3', la otra mutante AP1 presenta la misma mutación pero en el sitio AP1 distal, el cual presenta la misma secuencia que el proximal, pero en la cadena opuesta de DNA. La doble mutante incluye ambas mutaciones.

Las tres mutantes fueron cotransfectadas con el gen H-ras mutado y analizadas como en los experimentos anteriores. La mutación en el sitio AP1 distal lleva a una disminución del nivel de transcripción basal en un 65% en comparación con la LCR normal, la mutación en el sitio AP1 proximal lleva a una reducción del nivel de transcripción de un 80% y la mutación en ambos sitios reduce hasta un 90% la actividad de la LCR (Fig. 12 y Fig. 13). Esto confirma los resultados ya reportados en los que se propone a éstos sitios como cruciales para mantener el nivel de transcripción de la LCR (Thierry et al., 1992), sin embargo el nivel en que afectan la transcripción estos sitios difiere entre sí.

FALLA DE ORIGEN

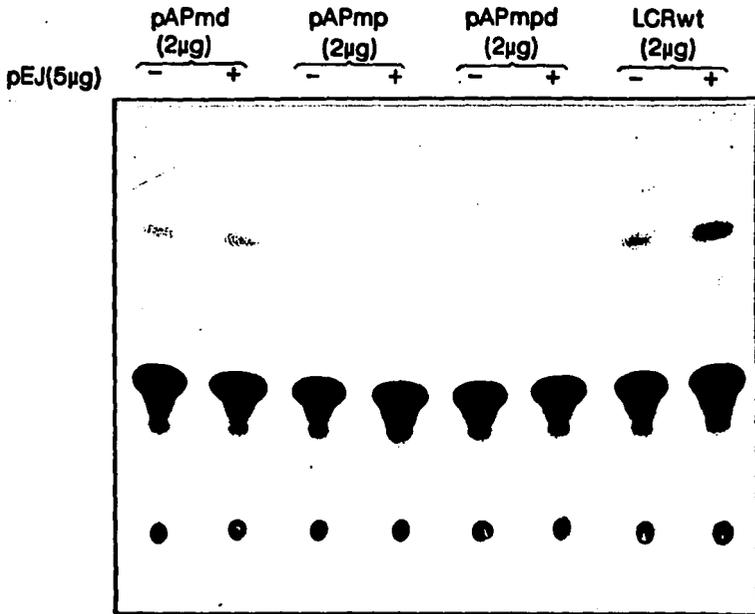


Fig. 12. Efecto de los sitios AP1 sobre la actividad transcripcional de la LCR del HPV-18. La figura muestra un ensayo CAT de células C-33, transfectadas con los plásmidos que contienen a la LCR silvestre o a la LCR mutada en uno o ambos sitios AP1.

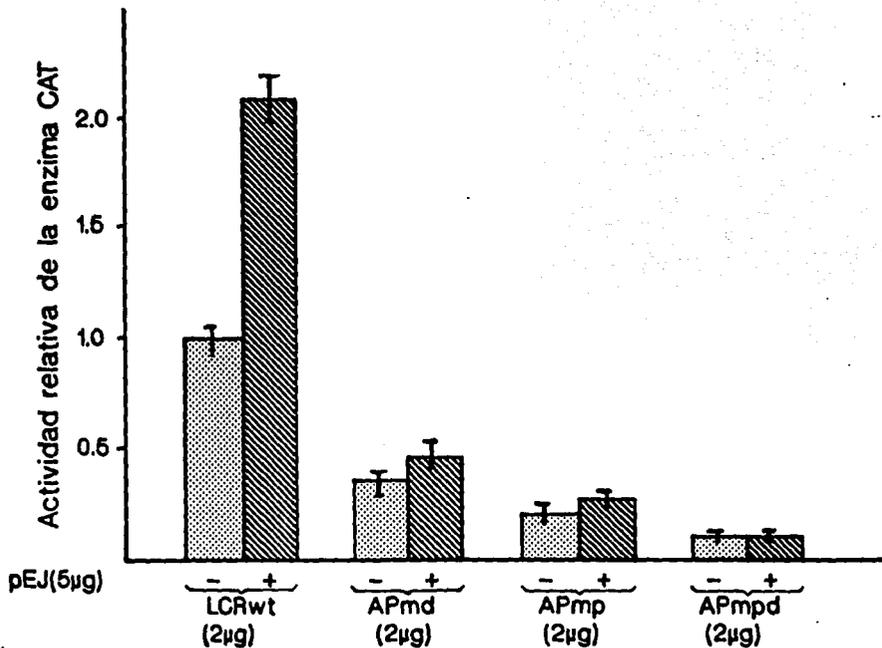


Fig. 13. Efecto de los sitios API sobre la actividad transcripcional de la LCR del HPV-18. La gráfica muestra los porcentajes de actividad relativa de la enzima CAT con las diferentes mutantes en los sitios API.

Cuando estas construcciones se cotransfectaron con el gen H-ras mutado, se observó un ligero incremento en el nivel de la transcripción basal de las mutantes en un sólo sitio AP1, este incremento corresponde sólo a un 10% (Fig. 12 y Fig. 13). Este aumento es pequeño si se compara con el observado con H-ras mutado, que corresponde a poco más del 100%. En el caso de la doble mutante no se observó incremento alguno cuando se utilizó el gen H-ras mutado.

Los resultados obtenidos confirman la propuesta de que H-ras modula la actividad de la LCR a través de los sitios AP1, al activar a la proteína c-jun.

DISCUSION

La transcripción temprana del HPV-18, la cual controla la expresión de los oncogenes virales E6 y E7, es regulada por una combinación de factores virales y celulares que se unen a la LCR. El hecho de que la infección por HPV no sea suficiente para desarrollar un cáncer, sumado a la presencia de otro tipo de alteraciones celulares en tumores cérvico-uterinos, llevó a tratar de determinar que factores celulares o extracelulares estaban participando en la regulación de la transcripción de estos oncogenes del virus.

Se sabe que el gen *ras* se encuentra mutado en un alto porcentaje de adenocarcinomas cérvico-uterinos, que además presentan secuencias de HPV (Lizano, comunicación personal). Por otro lado, la transfección de un fragmento del HPV-16 que contiene a los genes tempranos junto con el gen *ras* activo produce transformación celular, este efecto no se observa con cada uno por separado (Matlashewski et al., 1987).

La información anterior llevó a la pregunta de si el efecto por separado de los dos eventos antes mencionados, podía llevar al desarrollo de un cáncer o bien si existía algún tipo de interacción entre el gen *H-ras* mutado y el control de la expresión de los oncogenes virales del HPV-18 que favoreciera el desarrollo del cáncer.

Los resultados de transfección en células C-33 muestran que

tanto H-ras normal como H-ras mutado son capaces de aumentar el nivel de transcripción de la LCR del HPV-18. Estos resultados son comprensibles si se toma en cuenta que la sobreexpresión de un oncogene puede tener efectos similares a su contraparte mutada, aunque requiera de grandes cantidades (de 20 a 50 veces de sobreexpresión) para lograr tener un efecto similar al del gen mutado (McKay et al., 1986), en nuestro caso se observó que H-ras normal tiene un efecto menor al de H-ras mutado que incrementa en poco más del doble el nivel de transcripción, esto se puede explicar con los datos antes mencionados que indican que se requiere de una alta expresión del gen *ras* normal para tener una actividad similar a la de su contraparte mutada.

La expresión de los oncogenes E6/E7 del HPV-18 es regulada, como ya se mencionó con anterioridad, por factores virales y celulares, esta regulación implica una complicada interacción de estos factores que en conjunto van a dar cierto nivel de expresión. Se sabe que los sitios AP1 fuera de la LCR son más activos que dentro de la misma (Bauknecht et al., 1992), esto y otras evidencias como el hecho de que dentro del promotor existan sitios Ap1 y Sp1 y éste no presente ninguna actividad incrementadora intrínseca (Butz y Hoppe-Seyler, 1993), llevaron a sugerir que existía algún elemento de regulación negativa dentro de la LCR.

Butz y Hoppe-Seyler, 1993; utilizan una mutante en dos bases dentro del sitio GRE de la región promotora del HPV-18 y observan que el nivel de transcripción se incrementa a más del doble, ellos

explican que queda por aclarar si este mecanismo involucra al receptor de glucocorticoides o posiblemente a un factor regulador que se una a un sitio de regulación negativa. Sin embargo, previamente Bauknecht et al., 1992,; habían reportado la presencia de un dominio de regulación negativa dentro del promotor del HPV-18 al cual se unía el represor transcripcional YY1, cuando este sitio era mutado, se observaba un aumento en la respuesta a TPA. Al hacer una análisis de la secuencia y posición del sitio GRE mutado por Butz y el sitio YY1 identificado por Bauknecht, se encontró que en estas secuencias se sobrelapan cuatro bases y si bien, la mutación del sitio GRE no se localiza dentro del sitio YY1, si se encuentra en la vecindad, por lo tanto la mutación en esas dos bases podría estar causando un cambio conformacional en el DNA que afectara la unión de este regulador negativo a su sitio (Fig. 2).

Para determinar si el sitio GRE regula negativamente la transcripción, se hicieron ensayos de transfección con una mutante en una sola base, la base mutada corresponde a una de las dos mutadas por Butz. Los resultados obtenidos nos muestran que la actividad de la LCR con el sitio GRE mutado disminuye el 40%, estos resultados nos indican que el sitio GRE de alguna forma está participando positivamente en el nivel de transcripción basal de la LCR, esta participación podría ser de manera directa o bien indirecta es decir, que afectara la conformación del DNA y como consecuencia la interacción de los factores de transcripción.

La mutación no debe estar afectando, por lo menos de manera

significativa la conformación del DNA, ya que el represor YY1 al parecer mantiene su unión al DNA y por lo tanto no se observa un incremento en el nivel de transcripción como en el caso de la mutante de Butz. Por otro lado, se sabe que existen sitios GRE que actúan positivamente y otros de manera negativa, al hacer una comparación de la secuencia GRE del HPV-18 con estos sitios, se observa que presenta mayor homología con los GRE que actúan positivamente, esto concuerda con los resultados obtenidos y sugiere que el GRE está participando de manera positiva y directa en el nivel de transcripción basal del LCR.

La LCR con el sitio GRE mutado, fué cotransfectada con el gen H-ras mutado obteniéndose un incremento en el nivel de transcripción, menor al que se observa con la LCR sin mutar. Esta disminución en el nivel de activación de H-ras debe ser un reflejo de la disminución de la actividad basal de la LCR.

H-ras es una proteína que se localiza en la membrana y por lo tanto no puede tener una interacción directa sobre la LCR, pero se sabe que participa en las vías de transducción de señales y se ha visto que una de sus funciones es activar a la proteína c-jun al estimular la fosforilación de su dominio de activación y aumentar el nivel del RNAm de la misma, sin embargo, sobre JunB no parece tener ningún efecto (Binétruy et al., 1991). En el caso de JunD, ras disminuye el nivel de RNAm en la célula (Pfarr et al., 1994). Por otro lado reportes anteriores indican que H-ras es capaz de llevar a una activación específica de los sitios AP1.

Tomando en consideración los datos anteriores y el hecho de que la LCR presenta dos sitios AP1 se pensó que tal vez H-ras mutado podría estar actuando a través de c-jun sobre la LCR del HPV-18.

Los ensayos de transfección de los genes Jun muestran que la proteína c-jun es capaz de aumentar el nivel de transcripción en poco más de cinco veces, cuando se probaron los otros dos miembros de la familia Jun: JunB y JunD, éstos no lograron aumentar la transcripción, observándose incluso una ligera represión con respecto a la basal. Lo anterior concuerda con lo reportado para muchos genes celulares regulados por sitios AP1, en los cuales c-jun parece ser una proteína transactivadora y Jun B y JunD más bien transactivadores pobres y que en ocasiones intervienen con c-jun disminuyendo su potencial de transactivación. Deng y Karin, 1993; reportan que JunB reprime la actividad de c-jun al formar dímeros inactivos con éste último, esto ocurre porque los dímeros JunB/c-jun se forman con mayor afinidad que los dímeros c-jun/c-jun, además de que los heterodímeros tienen una baja afinidad por el DNA lo que los hace unos transactivadores pobres.

Cuando se cotransfecta c-jun y JunB se observa una disminución en el nivel de transactivación de c-jun, esto se puede explicar con los datos antes mencionados ya que, JunB estaría formando preferencialmente los heterodímeros con c-jun los cuales tienen una baja afinidad por los sitios AP1, bajando así el nivel de transcripción de la LCR. Los mismos resultados se obtienen cuando

se cotransfectan c-jun y JunD, lo que sugiere que los heterodímeros c-jun/JunD también se forman con mayor preferencia que los homodímeros c-jun y tienen baja afinidad por el DNA. De hecho se ha reportado que la sobreexpresión de JunD, previene o disminuye la entrada de

las células al ciclo celular, aún cuando los niveles de c-jun se mantengan, esto sugiere que JunD puede funcionar de manera dominante sobre c-jun (Pfarr et al., 1994).

Los experimentos de cotransfección que se realizaron con c-jun y H-ras mutado, nos muestran que la activación es aún mayor, más de once veces, poco más que la sumatoria del efecto de ambos plásmidos por separado. Esto indica que el efecto de ambos no se contraponen y que incluso, puede existir cierta cooperatividad, el efecto de cooperatividad se observa cuando se usan altas concentraciones de c-jun (4-6 μ g), cuando se emplean concentraciones bajas (1-2 μ g) el efecto que se observa es más bien sumatorio.

Cuando se cotransfecta H-ras mutado con JunB o JunD se observa una disminución en el efecto que ejerce el oncogen por sí solo sobre la LCR. Los resultados nos indican que estas proteínas tienen un efecto negativo sobre la actividad de H-ras, esto se contraponen con lo reportado para JunB, en donde se muestra que JunB es capaz de cooperar con H-ras aunque no tan eficientemente como c-jun (Schette et al., 1989). Sin embargo lo que se podría estar observando en nuestro modelo es que H-ras no coopera con JunB para aumentar la expresión de los oncogenes virales y de alguna forma se observa un efecto negativo de JunB sobre la LCR.

Para el caso de la proteína JunD, los resultados concuerdan con lo reportado por Pfarr et al., 1994, en los que ellos encuentran que JunD bloquea parcialmente el efecto de transformación de H-ras activo.

Los resultados anteriores sugieren que c-jun es la proteína que está actuando sobre la LCR para activar la transcripción, sin embargo, Thierry et al., 1992, sugieren que la proteína jun que está transactivando la LCR es JunB, esto lo sugieren por el hecho de encontrar mayor cantidad de esta proteína en extractos nucleares de queratinocitos humanos que con respecto a las otras proteínas Jun, además de ser la que se une con mayor afinidad a éstos sitios. Sin embargo, ellos no comprueban su hipótesis realizando ensayos de transfección.

El hecho de que JunB se encuentre en mayor abundancia en éstas células tal vez demuestra que puede existir un mecanismo de regulación que mantiene cierto nivel de expresión de los oncogenes virales, que esta siendo regulado por JunB, ya que si bien JunB no activa, la represión que se observa en el nivel basal de la transcripción es mínima y permite por tanto la expresión de los oncogenes del virus dentro de un cierto nivel, sin embargo, cuando ocurre alguna alteración celular como es el caso de la mutación del gen H-ras, el equilibrio se rompe, aumentando la cantidad de c-jun fosforilado y dando como consecuencia un incremento en la expresión de los oncogenes ocasionando así los efectos de transformación celular. Aún así, la presencia de grandes cantidades de JunB en

células epiteliales no garantiza que ésta proteína sea la que esté transactivando, ya que puede desempeñar muchas otras funciones dentro de la célula.

Una vez que se determinó que c-jun aumentaba el nivel de transcripción de la LCR del HPV-18 y que H-ras mutado se sumaba a este efecto, se quiso comprobar que el incremento observado cuando se cotransfectaba con H-ras era a través de los sitios AP1.

Las mutaciones en los sitios AP1, disminuyen notablemente el nivel de transcripción basal, lo que concuerda con lo antes reportado por Thierry et al., 1992, sus resultados muestran que ambos sitios cooperan de manera similar para mantener el nivel de transcripción basal de la LCR, sin embargo, en los ensayos realizados se observa que la actividad del sitio AP1 proximal es mayor que la del sitio distal, ya que al mutarse, la disminución en el nivel de transcripción basal es mayor en el sitio proximal que en el distal. Se sabe que la actividad de un elemento regulador dado depende de toda la composición de la región de control transcripcional en la que se localiza y como consecuencia de los elementos *cis* con los que esté interaccionando y del espacio adecuado entre los diferentes elementos reguladores. Los resultados obtenidos se explican por la posición de los sitios AP1 dentro de la LCR, ya que las interacciones de las proteínas AP1 con los factores de transcripción circundantes deben de ser diferente, de manera que la mutación en un sitio afectaría cierto tipo de interacciones protéicas diferentes a las del otro sitio, dando como consecuencia diferentes actividades transcripcionales.

Los resultados obtenidos en las transfecciones con las mutantes en un sitio AP1 y H-ras, nos muestran que existe una menor respuesta a H-ras mutado, debido a que el incremento obtenido con respecto a la basal es solo del 10% a diferencia del LCR silvestre que aumenta más del 100%. Por otro lado, cuando se usa la doble mutante y H-ras mutado no se observa ningún incremento en el nivel de transcripción. Estos resultados nos confirman que la estimulación que ejerce H-ras en el nivel de transcripción del LCR la ejerce a través de los sitios AP1.

Con base en los resultados obtenidos y los ya reportados se propone un modelo a través del cual H-ras este actuando sobre la LCR del HPV-18 (Fig. 14), En este modelo la proteína *ras* al pasar a su forma GTP por un estímulo extracelular, transmite una señal a través de una serie de proteínas cinasas una de las cuales debe estar fosforilando a la proteína *c-jun* en su dominio de transactivación, dando como consecuencia la unión de ésta a los sitios AP1 del LCR, aumentando el nivel de transcripción de los oncogenes virales.

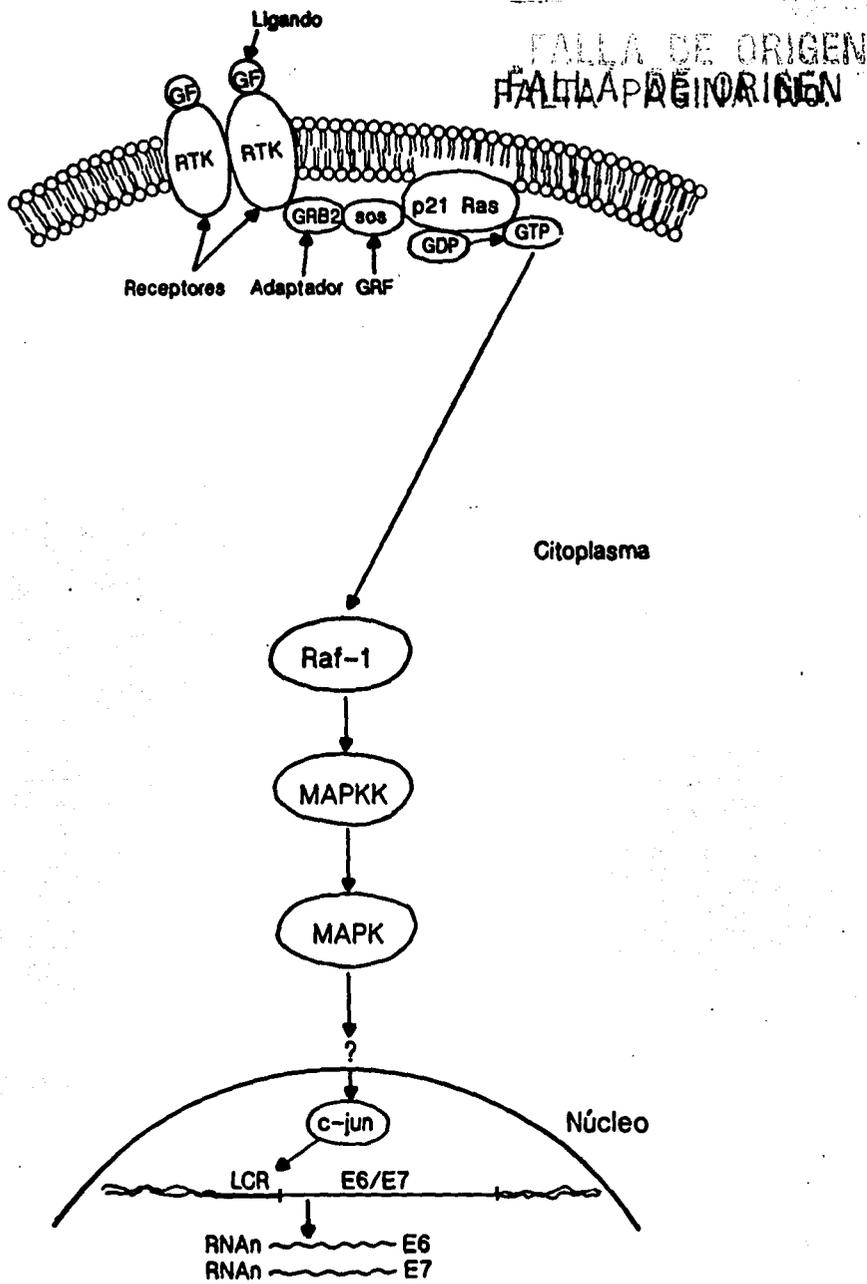


Fig. 14. Vía de transducción de señales de ras y su posible interacción a través de c-jun sobre el LCR del HPV-18.

CONCLUSIONES

1. El gen H-ras mutado aumenta al doble la expresión de los oncogenes E6/E7 del HPV-18 en células C-33.
2. El gen H-ras mutado aumenta la expresión de los oncogenes E6/E7 al activar a la proteína c-jun.
3. El gen H-ras mutado actúa a través de los sitios AP1 de la LCR del HPV-18 para aumentar la expresión de los oncogenes virales.
4. El sitio AP1 proximal de la LCR del HPV-18 parece ser más activo que el sitio AP1 distal.
5. Los sitios GRE tienen un efecto positivo sobre la transcripción basal de los oncogenes E6/E7 del HPV-18.

BIBLIOGRAFIA

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. y Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49:729-739.

Angel, P., Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos, and the AP1 complex in cell-proliferation and transformation. *Bioch. Biophys. Acta* 1072:129-157.

Baker, C.C., Phelps, W.C., Lingren, V., Braun, M.J. Gonda, M.A. y Howley, P.M. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J.Virol.* 61:962-971.

Barbacid, M. (1987). ras genes. *Annu.Rev.Biochem.* 56:779-827.

Bauknecht, T., Angel, P., Royer, H.D. y zur Hausen, H. (1992). Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J.* 11:4607-4617.

Bedell, M.A., Jones, K.H. y Laimins, L.A. (1987). The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH3T3 and Rat-1 cells. *J.Virol.* 61:3635-3640.

Bedell, M.A., Jones, K.H., Grossman, S.R. y Laimins, L.A. (1989). Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. *J.Virol.* 65:1247-1255.

Benjamin, T. y Voght, P.K. (1990). Cell transformation by viruses. In: B.N. Fields y D.M. Knipe (eds). *Virology*, second edition. Raven Press, Ltd. N.Y. pp 317-337

Binétry, B., Smeal, T. y Karin, M. (1991). Ha-Ras augments c-jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* 351:122-127.

Boguski, M.S. y McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366:643-654.

Boshart, M., Gissman, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W. y zur Hausen, H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 3:1151-1157.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72:248-259.

Butz, K. y Hoppe-Seyler, F. (1993). Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J.Virol.* 67:6476-6486.

Campo, M.S. (1988). Viral and cellular oncogenes in papillomavirus-associated cancers. *Br.J.Cancer.* 58(suppl.IX):80-84.

Campo, M.S., McCaffery, R.E., Doherty, I., Kennedy, I.M. y Jarrett, W.F.H. (1990). The Harvey ras 1 gene is activated in papillomavirus-associated carcinomas of the alimentary canal cattle. *Oncogene* 5: 303-308.

Chan, W. K., Klock, G. y Bernard, H. U. (1989). Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J.Virol.* 63:3261-3269.

Chiu, R., Boyle, W.J., Meck, J., Smeal, T., Hunter, T. y Karin, M. (1988). The c-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54:541-552.

Chiu, R., Angel, P. y Karin, M. (1989). Jun B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-jun. *Cell* 59:979-986.

Cid, A., Auewarakul, P., Garcia-Carranca, A., Ovseiovich, R., Gaissert, H. y Gissmann, L. (1993). Cell-type activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanol phorbol acetate and glucocorticoids. *J.Virol.* 67:6742-6752.

Cisneros de Cárdenas, M. T., Espinosa Romero, R., Pineda Corona, B.E. y González Camaño, A. (1987). Mortalidad por cáncer de la mujer mexicana. *Salud Pública Méx.* 29:299-312.

Cripe, T., Haugen, T., Turk, J., Tabatabai, F., Schmid, P., Durst, M., Gissmann, L., Roman, A. y Turek, L. (1987). Transcriptional regulation of the human papillomavirus 16 E6-E7 promoter by keratinocyte-dependent enhancer and by viral E2 transactivator and represor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* 6:3745-3754.

Crook, T., Storey, A., Almond, N., Osborn, K. y Crawford, L. (1989). Human papillomavirus type 16 cooperates with activated ras and fos oncogenes in the hormone-dependent transformation of primary mouse cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 80:3812-3815.

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

Deng, T. y Karin, M. (1993). Jun B differs from c-jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-jun by formation of inactive heterodimers. *Genes and Dev.* 7:479-490.

Doeberitz, V.K., Oltersdorf, T., Schwarz, E. y Gissmann, L. (1988). Correlation of modified human papillomavirus early expression with altered growth properties in C4-I cervical carcinoma cells. *Cancer Res.* 48:3780-3786.

Doeberitz, V.K., Rittmuller, C., zur Hausen, H. y Durst, M. (1992). Inhibition of tumorigenicity of C4-I cervical cancer cells in nude mice by HPV18 E6-E7 antisense RNA. *Int.J.Cancer* 51:831-834.

Durst, M., Gissman, L., Ikenberg, H., y zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 80:3812-3815.

Durst, M., Dzarlieva-Petrusevsks, R.T., Boukamp, P., Fusening, N.E. y Gissmann, L. (1987). Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* 1:251-256.

Durst, M., Glitz, D., Schneider, A. y zur Hausen, H. (1992). Human papillomavirus type 16 (HPV16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virol.* 189:132-140.

Dyson, N., Howley, P.M. Munger, K. y Harlow, E. (1989). The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Sci.* 243:934-937.

Edmonds, E. y Vousden, K.H. (1989). A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J.Virol.* 63:2650-2656.

Feig, L.A. (1993). The many roads that lead to Ras. *Sci.* 260:767-768.

Finney, R.E. y Bishop, J.M. (1993). Predisposition to neoplastic transformation caused by gene replacement of H-ras1. *Sci.* 260:1524-1527.

García-Carrancá, A., Thierry, F. y Yaniv, M. (1988). Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 62:4321-4330.

García-Carrancá, A. (1995 sometido). A single glucocorticoid hormone response element mediates hormonal response of the HPV-18 p105 promoter with no functional interaction with AP1.

Gius, D., Grossman, S., Bedell, M.A. y Laimins, L.A. (1988). Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. *J.Virol.* 62:665-672.

Gloss, B., Bernard, H., Seedorf, K. y Klock, G. (1987). The upstream regulatory region of human papillomavirus 16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J.* 6:3735-3743.

Halbert, C.L., Demers, G.W. y Galloway, D.A. (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J.Virol.* 65:473-478.

Herrlich, P. y Ponta, H. (1989). Nuclear oncogenes convert extracellular stimuli into changes in the genetic program. *Trends Genet.* 5:112-116.

Hirai, S.I., Ryseck, R.P., Mehta, F., Bravo, R. y Yaniv, M. (1989). Characterization of junD: A new member of the jun proto-oncogene family. *EMBO J.* 8:1433-1439.

Hirai, S.I., Bourachot, B. y Yaniv, M. (1990). Both Jun and Fos contribute to transcription activation by the heterodimer. *Oncogene* 5:39-46.

Hope-Seyler, F. y Butz, K. (1993). A novel cis-regulatory element maps to the 5'-portion of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region and is functionally dependent on a sequence aberrant Sp1 binding site. *J.Gen.Virol.* 74:281-286.

Hope-Seyler, F., Butz, K. y zur Hausen, H. (1991). Repression of the human type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1. *J.Virol.* 65:5613-5618.

Inoue, H., Kondoh, G., Kamakura, C.R., Yutsudo, M. y Hakura, A. (1991). Progression of rat embryo fibroblast cells immortalized with transforming genes of human papillomavirus type 16. *Virol.* 180:191-198.

Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K.K., Cato, A.C.B., Gebel, S; Ponta, H. y Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62:1189-1204.

Kanda, T., Furuno, A. y Yoshike, K. (1988). Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells. *J.Virol.* 62:610-613.

Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M. y Satoh, T. (1991). Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 60:349-400.

Kouzarides, T. y Ziff, E. (1988). The role of leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* 336:646-651.

Lee, W., Haslinger, A., Karin, M. y Tjian, R. (1987a). Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* 365: 368-372.

Lee, W., Mitchell, P. y Tjian, R. (1987b). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49:741-752.

Leechanachai, P., Banks, L., Moreau, F. y Matlashewski, G. (1992). The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene* 7:19-25.

Lewin, B. (1990). *Oncogenes: Gene Expression and Cancer*. En *Genes* IV. 4th edition, Lewin, B, ed. (New York: Oxford University Press), pp 788-789.

Lowly, D.R., Dvoretzky, I., Shober, R., Law, M-F., Engel, L. y Howley, P.M. (1980). In vitro tumorigenic transformation by a defined subgenomic fragment of bovine papilloma virus DNA. *Nature* 287:72-74.

Marshall, C.J. (1988). The ras oncogenes. *J.Cell.Sci.* 10(suppl):157-169.

Marx, J. (1993). Two major signal pathways linked. *Sci.* 262:988-990.

Matlashewski, G., Schneider, J., Banks, L., Jones, N., Murray, A. y Crawford, L. (1987). Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *EMBO J.* 6:1741-1746.

Matlashewski, G., Osborn, K., Banks, L., Stanley, M. y Crawford, L. (1988). Transformation of primary human fibroblasts cells with human papillomavirus type 16 DNA and EJ-ras. *Int. J. Cancer* 42:232-238.

McCance, D.J., Kopan, R., Fuchs, E. and Laimins, L.A. (1988). Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 85:7169-7173.

McKay, I.A., Marshall, C.J., Calés, C. y Hall, A. (1986). Transformation and stimulation of DNA synthesis in NIH3T3 cells are a tritable function of normal p21^{Nras} expression. *EMBO J.* 5:2617-2621.

Melnick, J. L., Allison, A.C., Butel, J. S., Eckhart, W., Eddy, B. E., Kit, S., Levine, A. J., Miles, J. A. R., Pagano, J. S., Sachs, L. y Vonka, V. (1974). Papovaviridae. *Intervirol* 3:106-120.

Miller, J., McLachlan, A.D. y Kulg, A. (1985). Repetitive zinc-binding domain in the protein transcription factor TFIIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4:1609-1614.

Munger, K., Phelps, W.C., Bubb, V., Howley, P.M. y Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J.Virol.* 63:4417-4421.

Pater, M. M. y Pater, A. (1985). Human papillomavirus types 16 y 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology* 145:313-318.

Pater, M. M., Mittal, R. y Pater, A. (1994). Role of steroid hormones in potentiating transformation of cervical cells by human papillomaviruses. *Trends Microbiol.* 2:229-235.

Pertovaara, L., Sistonen, L., Bos, T., Vogt, P., Keski-Oja, J., y Alitalo, K. (1989). Enhanced *jun* gene expression is an early genomic response to transforming growth factor beta stimulation. *Mol.Cel.Biol.* 9:1255-1262.

Pfarr, C.M., Mechta, F., Spyrou, G., Lallemand, D., Carillo, S. y Yaniv, M. (1994). Mouse *JunD* negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by *ras*. *Cell* 76:747-760.

Phelps, W.C., Yee, C.L., Munger, K. y Howley, P.M. (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1a. *Cell* 53:539-547.

Rauscher, F.J., Cohen, D.R., Curran, T., Bos, T.J., Vogt, P.K., Bohmann, D., Tijan, R. and Franza, B.R. (1988). Fos-associated protein p39 is the product of the *jun* proto-oncogene. *Sci.* 240:1010-1016.

Reid, R., Crum, C.P., Herschman, B.R., Fu, Y.S., Braun, L., Shah, K.V., Agronow, S.J., Stanhope, C.R. (1984). Genital warts and cervical cancer. III subclinical papillomaviral infection and cervical neoplasia are linked by a spectrum of continuous morphologic and biologic change. *Cancer* 53:943-953.

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

Ryder, K., Lanahan, A., Perez-Albuérne, E. y Nathans, D. (1989). JunD: a third member of the Jun gene family. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86:1500-1503.

Santos, E., Martín-Zanca, D., Reddy, E.P., Pierotti, M.A., Della Porta, G. y Barbacid, M. (1984). Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. Sci. 223:661-664.

Sassone-Corsi, P., Lamph, W.W., Kamps, M. y Verma, I.M. (1988). Fos-associated cellular p39^{ras} is related to nuclear transcription factor AP-1. Cell 54:553-560.

Sassone-Corsi, P., Sisson, J. y Verma, I. (1988b). Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. Nature 334:314-319.

Satoh, T., Nakafuku, M. y Kaziro, Y. (1992). Function of ras as a molecular switch in signal transduction. J.Biol.Chem. 267:24149-24152.

Saveria Campo, M. (1992). Cell transformation by animal papillomaviruses. J.Gen.Virol. 73:217-222.

Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. y Howley, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 y 18 promotes the degradation of p53. Cell 63:1129-1133.

Schneider-Gadicke, A. y Schwarz, E. (1986). Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. EMBO.J. 5:2285-2292.

Schneider, J.F., McGlennen, R.C., LaBresh, K.V., Ostrow, R.S. y Faras, A.J. (1991). Rhesus papillomavirus type 1 cooperates with an activated ras in transforming primary epithelial rat cells independent of dexamethasone. J.Virol. 65:3354-3358.

Schontal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H.J. y Ponta, H. (1988). Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. Cell 54:325-334.

Schwarz, E., Freese, U.K., Gissman, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. y zur Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. Nature (London) 314:111-114.

Shule, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I.M. y Evans, R.M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-jun and the glucocorticoid receptor. Cell 62:1217-1226.

- Ryder, K., Lanahan, A., Perez-Albuerno, E. y Nathans, D. (1989). JunD: a third member of the Jun gene family. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86:1500-1503.
- Santos, E., Martin-Zanca, D., Reddy, E.P. Pierotti, M.A., Della Porta, G. y Barbacid, M. (1984). Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. Sci. 223:661-664.
- Sassone-Corsi, P., Lamph, W.W., Kamps, M. y Verma, I.M. (1988). Fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1. Cell 54:553-560.
- Sassone-Corsi, P., Sisson, J. y Verma, I. (1988b). Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. Nature 334:314-319.
- Satoh, T., Nakafuku, M. y Kaziro, Y. (1992). Function of ras as a molecular switch in signal transduction. J.Biol.Chem. 267:24149-24152.
- Saveria Campo, M. (1992). Cell transformation by animal papillomaviruses. J.Gen.Virol. 73:217-222.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. y Howley, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 y 18 promotes the degradation of p53. Cell 63:1129-1133.
- Schneider-Gadicke, A. y Schwarz, E. (1986). Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. EMBO.J. 5:2285-2292.
- Schneider, J.F., McGlennen, R.C., LaBresh, K.V., Ostrow, R.S. y Faras, A.J. (1991). Rhesus papillomavirus type 1 cooperates with an activated ras in transforming primary epithelial rat cells independent of dexamethasone. J.Virol. 65:3354-3358.
- Schontal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H.J. y Ponta, H. (1988). Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. Cell 54:325-334.
- Schwarz, E., Freese, U.K., Gissman, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Strelau, A. y zur Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. Nature (London) 314:111-114.
- Shule, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I.M. y Evans, R.M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-jun and the glucocorticoid receptor. Cell 62:1217-1226.

- Shütte, J., Viallet, J., Nau, M., Segal, S., Fedorko, J. y Minna, J. (1989). jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell* 59:987-997.
- Sistonen, L., Holtta, E., Makela, J.K. y Alitalo, K. (1989). The cellular response to induction of p21 c-Ha-ras oncoprotein includes stimulation of jun gene expression. *EMBO.J.* 8, 815-822.
- Smeal, T., Angel, P., Meek, J. y Karin, M. (1989). Different requirements for formation of Jun:Jun and Jun:Fos complexes. *Genes Dev.* 3:2091-2100.
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D.A., Birrer, M. y Karin, M. (1991). Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-jun on serines 63 and 73. *Nature* 354:494-496.
- Sousa, R., Dostatni, N. y Yaniv, M. (1990). Control of papillomavirus gene expression. *Bioch.Biophys.Acta* 1032:19-36.
- Stoler, M.H., Rhodes, C.R., Whitbeck, A., Wolinsky, S.M., Chow, L.T. y Broker, T. (1992). Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum.Pathol.* 23:117-128.
- Storey, A., Almond, N., Osborn, K. y Crawford, L. (1990). Mutations of human papillomavirus type 16 E7 gene that affect transformation, transactivation and phosphorylation by the E7 protein. *J.Gen.Virol.* 71:965-970.
- Swift, F.V., Bhat, K., Younghusband, H.B. y Hamada, H. (1987). Characterisation of a cell type-specific enhancer found in the human papillomavirus type 18 genome. *EMBO J.* 6:1339-1344.
- Tabin, C.J., Bradlet, S.M., Bargmann, C.I., Weinberg, R.A., Papageorge, A.G., Scolnick, E.M., Dhar, R., Lowly, D.R. y Chang, E.H. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300:143-149.
- Thierry, F., Garcia-Carrancá, A. y Yaniv, M. (1987a). Elements that control the transcription of genital papillomavirus type 18. *Cancer Cell* 5:23-32.
- Thierry, F., Heard, K., Dartmann, K. y Yaniv, M. (1987b). Characterization of a transcriptional promoter of human papillomavirus 18 and modulation of its expression by simian virus 40 and adenovirus early antigens. *J.Virol.* 61:134-142.
- Thierry, F. y Howley, P.M. (1991). Funcional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P₁₀₅ promoter. *New.Biol.* 3:90-100.

Thierry, F., Spyrou, G., Yaniv, M. y Howley, P. (1992). Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J.Virol.* 66:3740-3748.

Watanabe, S., Kanda, T. y Yoskiiike, K. (1989). Human papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7. *J.Virol.* 64:965-969.

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

Wilkinson, D. G., Bhatt, S., Ryseck, R.P. y Bravo, R. (1989). Tissue specific expression of c-jun and junB during organogenesis in the mouse. *Develop.* 106:465-471.

Woodworth, C.D., Bowden, P.E., Doninger, J., Pirisi, L., Barnes, W., Lancaster, W.D. y DiPaolo, J.A. (1989). Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma. *J.Virol.* 63:159-164.

Yang-Yen, H.F., Chambard, J.C., Sun, Y., Smeal, T., Schmidt, T., Drouin, J. y Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62:1205-1215.

Yasumoto, S., Burkhardt, A.L., Doniger, J. y DiPaolo, J. (1986). Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH3T3 cells. *J.Virol.* 57:572-577.

zur Hausen, H. (1980). Papilloma viruses. En *Molecular Biology of tumor viruses, Part 2. DNA tumor viruses*. Second edition, J. Tooze, ed. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp 371-382.

zur Hausen, H. (1986). Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient control of papillomavirus gene expression. *Lancet* ii:489-491.

zur Hausen, H. (1989). Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancer. *Cancer Res.* 49:4677-4681.