

00581 24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE QUIMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA**

"Regulación de la transcripción de los oncogenes virales de HPV-18 por Ha-ras y la proteína fosfatasa 2A"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

P R E S E N T A:

M en C.Q. OLGA MEDINA MARTINEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue posible gracias al apoyo recibido por las siguientes instituciones:

-DGAPA, beca para realizar estudios de Doctorado a través del Subcomite de Fisiología Celular.

- Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

- Programa de Intercambio México-Francia entre el CNRS-CONACYT

- CONACYT, proyecto 1705 M9209

- DGAPA Proyectos IN211394, IN 212895.

- PADEP, Apoyos 05322 y 05356.

Este trabajo fué realizado en el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomedicas de la UNAM bajo la dirección del Dr. **Alejandro M. García-Carrancá** y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas (Bioquímica) por el siguiente jurado:

Presidente: Dr. Jorge Vázquez Ramos.

Primer vocal: Dr. Adolfo García Sáinz.

Segundo vocal: Dr. Roberto Coria Ortega.

Tercer vocal: Dr. Diego González Halphen.

Secretario: Dra. Marina Gavilanes Ruíz.

Primer Suplente: Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

Segundo Suplente: Dra. Edith Garay Rojas.

INDICE

	Pág.
Resumen	i
Abstract	ii
Capítulo 1. Introducción	
- Virus en el cáncer humano	2
- Los papilomavirus y el cáncer anogenital	3
- ¿Cómo son estos virus?	4
- ¿Cómo pueden los papilomavirus transformar células?	8
- ¿Qué controla la expresión de los oncogenes virales?	10
- Control celular de la expresión de los oncogenes de HPV	12
- Factores de transcripción AP-1	15
- Los oncogenes ras	17
- Modelo del control celular en la expresión de HPV	22
- Hormonas esteroides y la expresión de HPV.	27
¡Las preguntas!	30
Objetivos	32
Capítulo 2. Resultados	
- Artículo 1. A single element mediates glucocorticoid hormone response of HPV-18 with no functional interactions with AP-1 or Hbrm.	
- Artículo 2. Transcriptional activation of human papillomavirus type 18 E6 and E7 oncogenes by activated Ras and inhibition of protein phosphatase 2A.	
Capítulo 3. Discusión	33
Conclusiones	46
Referencias	47

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. MAPA GENOMICO DEL HPV-18	6
FIGURA 2. EFECTO DE E7 SOBRE LA ACTIVIDAD DE pRb	9
FIGURA 3. EFECTO DE E6 SOBRE LA ACTIVIDAD DE p53	11
FIGURA 4. FACTORES CELULARES QUE SE UNEN AL LCR	14
FIGURA 5. CICLO DE ACTIVACION DE RAS	19
FIGURA 6. CASCADA DE SEÑALES DE RAS	21
FIGURA 7. MODELO FUNCIONAL DEL CONTROL INTRACELULAR DE LA EXPRESION DE LOS ONCOGENES VIRALES DE LOS HPVs	26
FIGURA 8. POSIBLE EFECTO DE RAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE PP2A	44
FIGURA 9. MODELO DEL CONTROL DE LA EXPRESION DE E6 Y E7 POR LOS FACTORES AP-1	46

RESUMEN

El papilomavirus humano tipo 18 (HPV-18) ha sido asociado con la etiología de los carcinomas cervicales (CaCu) por lo que junto con algunos otros subtipos forma el llamado grupo de alto riesgo. Los miembros de este grupo han mostrado expresar dos proteínas transformantes, E6 la cual interactúa con el gen supresor de tumores p-53 e induce su degradación y E7 que se une a la proteína celular Rb. La transcripción de estos genes es regulada por un conjunto muy complejo de proteínas celulares y virales.

La transcripción de los oncogenes virales esta bajo el control de numerosos factores celulares entre los que se encuentran los factores de transcripción AP-1 y los receptores a hormonas esteroides. Estudios epidemiológicos han mostrado que el estado hormonal de una persona infectada por HPV, como los cambios que ocurren en el embarazo, podrían influenciar el desarrollo de lesiones asociadas con el HPV.

En este trabajo, se muestra que la región regulatoria de HPV-18 contiene un único elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) funcional que aunque interactúa con el receptor a glucocorticoides le confiere sólo una moderada activación del promotor viral P-105. Además dos moduladores de la actividad de los glucocorticoides, el factor AP-1 y la proteína bromina (hbrm), no interfieren con esta activación hormonal a pesar de que ambos participan en la transcripción de P-105.

Algunos trabajos anteriores han mostrado que la actividad del P-105 es regulada primordialmente por los factores AP-1. Ya que tanto las cinasas moduladas por Ras y las fosfatasa participan en la modulación de la actividad AP-1, se investigó su efecto sobre la actividad de este promotor.

Se encontró que tanto Ras activado como la inhibición de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) inducen la actividad transcripcional del promotor viral, mientras que Ras normal tiene sólo un efecto mínimo. Por el contrario el gen normal de H-ras junto con la inhibición de la PP2A resulta en un efecto cooperativo sobre la transcripción. En células HeLa expresando permanentemente el oncogen Ha-ras o niveles altos de el alelo normal exhiben un incremento neto de 2-3 veces en los transcritos de E6/E7. De esta manera se propone que tanto Ras como la PP2A controlan la expresión de los oncogenes de HPV-18 a través de la modulación de la actividad de los factores AP-1 y sugiere que el aumento en los niveles de las proteínas E6 y E7 contribuyen en parte a la cooperación observada entre Ras y HPV para transformar a las células.

ABSTRACT

The human papillomavirus type 18 (HPV-18) has been found to be associated with the etiology of cervical carcinomas, along with few other viral types forming the so-called "high risk" group. Members of this group have been shown to express two transforming proteins, E6 which interacts with p53 and induces its degradation and E7 which interacts with the product of the cellular Rb tumor suppressor gene.

Transcription of the viral oncogenes is under the control of numerous cellular factors among which, AP-1 transcription factors and steroid hormones receptors. Epidemiological studies have raised the possibility that the hormonal status of the infected person, such as observed in pregnancy, may influence the development of HPV-associated lesions.

We determined that the HPV-18 regulatory region contains one functional GRE sequence that interacts with the glucocorticoid receptor. This sequence conferred a moderate hormonal activation to the HPV-18 P-105 promoter. Two modulators of glucocorticoid hormone activity, AP-1 and hbrm, both involved in P-105 transcription, were found not to interfere with this hormonal activation.

Some previous reports have shown that AP-1 activity play a crucial role in the control of P-105 promoter. Since Ha-ras and protein phosphatases have been shown to modulate AP-1 activity, we investigated their effect on the transcriptional activity of P-105.

We found that while activated Ras and inhibition of protein phosphatase 2A (PP2A) induced the transcriptional activity of the viral promoter, the normal version of Ha-ras had a minimal effect. On the contrary, transfection of normal H-ras and simultaneous inhibition of protein phosphatase 2A resulted in a cooperative transactivation. HeLa cells permanently expressing Ha-ras oncogen, or high levels of the normal allele, exhibited a 2-3 increase in the levels of specific E6/E7 transcripts. We propose that Ras and PP2A control HPV oncogene expression through modulation of AP-1 activity, and suggest that increased levels of E6 and E7 could account in part to the cooperation observed in fully transforming cells.

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Hoy en día, a más de 20 años del descubrimiento de que los oncogenes de algunos retrovirus de transformación aguda tenían su origen a partir de genes celulares normales, la panorámica de los procesos de transformación ha cambiado enormemente. Se han caracterizado alrededor de 70 oncogenes y se contempla que su número se incrementará a medida que avancen las investigaciones (Marx 1994). Pero indudablemente la participación de tantos genes nos da sólo una ligera idea de la complejidad de los mecanismos de control del crecimiento que mantienen la integridad de un tejido normal.

Durante los últimos años, se ha mantenido la idea de que el cáncer representa un desorden que ocurre fundamentalmente en el control del crecimiento celular. Desde este punto de vista es posible imaginar que la acumulación a través del tiempo de cambios o mutaciones, en genes celulares, que juegan un papel clave en la regulación de procesos celulares como el crecimiento o la proliferación, hasta un punto en donde se alcanza un umbral catastrófico, ocasionen que una célula normal se transforme en una célula cancerosa (Bishop 1987).

Los primeros estudios sobre el cáncer hicieron pensar en la posibilidad de encontrar un único gen responsable de todo el control del crecimiento celular y por lo tanto del proceso de transformación. Sin embargo, a medida que hemos avanzado en el conocimiento, ha quedado claro que no existe un blanco celular que sea común a todos, o por lo menos a la mayoría de los tipos de cáncer humano; muy por el contrario, nos hemos topado con una sofisticada maquinaria de control del crecimiento celular y un gran número de conexiones entre los oncogenes y los componentes que regulan el ciclo celular (Hunter & Pines 1994).

De esta manera se desprende una característica de la transformación celular: la necesidad de múltiples pasos o bien la participación de muchos genes celulares, y esto parece lógico ahora que sabemos que la maquinaria celular involucrada en procesos tan complejos como la comunicación o el crecimiento, se compone comúnmente de moléculas paralelas cumpliendo una misma función. Lo que había permanecido menos claro, por lo menos hasta hace muy pocos años, era la identidad de los genes afectados en las células cancerosas y la naturaleza de esos cambios.

Las células tienen diversos mecanismos que garantizan el mantenimiento de su información genética. Una célula normalmente presenta una tasa de reparación muy alta del DNA (Murray 1992). Sin embargo, en alguna célula, estos mecanismos se pierden o son ignorados lo que lleva a acumular cambios en esta información. ¿Qué es lo que ocasiona que la célula pierda el control de su integridad genómica?

Se han propuesto varias hipótesis tratando de explicar cómo una célula puede perder la integridad de su información genética, ya que el responder esta pregunta posiblemente implicaría resolver en dónde se inicia el proceso de transformación de una célula.

Los virus pueden contribuir al desarrollo de tumores humanos por diferentes mecanismos: indirectamente, por inducir inmunosupresión, o directamente, por la interacción de su genoma con el de la célula hospedera, lo que ocasiona alteraciones en la expresión genética (zur Hausen 1991).

La historia de la relación entre los virus y el cáncer comienza en los inicios de este siglo, con los estudios de Ellerman y Bang, quienes lograron transmitir la leucemia de un pollo enfermo a uno sano utilizando ultrafiltrados de sangre. Sus resultados fueron recibidos con enormes reservas, por el hecho de que el cáncer no mostraba ser una enfermedad contagiosa, por lo que era muy difícil implicar un virus en su desarrollo. Con la misma suerte corrió el descubrimiento de Peyton Rous, unos años más tarde, quien demostró que los sarcomas de pollo podían ser transmitidos de un animal a otro, por medio de un virus.

Sin embargo, durante los últimos años se revivió el viejo concepto de un posible papel de las infecciones virales en el cáncer humano, lo que inició un campo muy excitante en la investigación biomédica.

Los tipos de cáncer humano asociados con diferentes infecciones virales son responsables de aproximadamente el 15% de la incidencia total de esta enfermedad. Tomando en cuenta diversos datos epidemiológicos y experimentales, implicando a los virus como agentes causales del cáncer, éstos ocuparían el segundo lugar en importancia, como factor de riesgo para el desarrollo del cáncer, superados únicamente por el consumo de tabaco (zur Hausen 1991).

VIRUS EN EL CÁNCER HUMANO

Existe un grupo de virus para los cuales el desarrollo de un tumor parece estar relacionado con una infección específica y en donde pueden observarse alteraciones en la proliferación celular como resultado de la persistencia del genoma viral.

En 1964, Epstein y colaboradores demostraron la presencia de partículas virales en linfoblastos humanos, derivados de un linfoma de Burkitt. Este virus fue posteriormente denominado el virus de Epstein-Barr, reconociéndose como el agente causal de la mononucleosis infecciosa y ligándose, a través de estudios seroepidemiológicos y prospectivos, con el cáncer nasofaríngeo y el linfoma de

Burkitt (Epstein *et al.* 1964).

Por otra parte, durante los años 70s se acumularon un gran número de evidencias que asociaban al virus de la hepatitis tipo B con el carcinoma primario hepatocelular (revisado por Essex *et al.* 1980).

A diferencia de estos agentes virales, la asociación de algunos tipos específicos de papilomavirus humanos, tuvo que seguir un largo camino antes de que fuera posible relacionarlos con ciertos carcinomas anogenitales incluyendo el cáncer cervical.

La hipótesis de que el cáncer de cérvix implica un proceso infeccioso fue propuesta desde 1842 (Rigoni-Stern 1842), en un estudio sobre la relación entre la incidencia de cáncer cervical y la promiscuidad.

En 1975 zur Hausen, propone por primera vez la hipótesis de que el cáncer cervical es causado por una infección con un papilomavirus humano. Estudios posteriores demostraron la existencia de diversos tipos de papilomavirus humanos (Gissmann & zur Hausen 1976).

La identificación de tipos virales específicos asociados con el cáncer cervical durante los años 80s desencadenó una importante aceleración en la investigación en este campo. Esto de manera justificada, si tomamos en cuenta que el cáncer de cérvix es un problema de salud muy importante en todo el mundo. En los países desarrollados se ubica como la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres, superado únicamente por el cáncer de mama; mientras que en los países subdesarrollados, ocupa el primer lugar como causa de muerte por neoplasias en mujeres (Parkin *et al.* 1993).

Por supuesto, en México el cáncer de cervix representa un importante problema de salud, si consideramos que, según los datos del Instituto Nacional De Salud Pública, no solo ocupa el primer lugar en incidencia, sino también en mortalidad en la población femenina de nuestro país.

LOS PAPILOMAVIRUS Y EL CÁNCER ANOGENITAL

Durante los últimos 15 años ha habido una virtual explosión en el interés y la investigación en los papilomavirus humanos, un grupo de virus pequeños que causan una variedad de lesiones benignas muy comunes en la piel, como las verrugas planas, o bien papilomas sobre mucosas de la cavidad oral, la laringe y las áreas anogenitales. Aunque la mayoría de las lesiones asociadas con la infección por HPV parecen benignas e incluso pueden desaparecer espontáneamente, algunas pueden sufrir transformación maligna hacia carcinomas

invasivos o *in situ*.

En la actualidad se han descrito más de 70 diferentes tipos de papilomavirus humanos y un subgrupo de casi 20 ha sido asociado específicamente con lesiones del tracto anogenital (De Villiers 1989). Este subgrupo a su vez puede ser separado en los de "bajo riesgo", asociados con lesiones benignas como el condiloma acuminado, las cuales raramente progresan a la malignidad, y los de "alto riesgo", asociados con lesiones potencialmente precursoras del cáncer (zur Hausen 1987).

Específicamente en el cérvix, los virus de "alto riesgo" están asociados con lesiones preneoplásicas intraepiteliales cervicales o NIC, de las cuales un pequeño porcentaje progresará hacia cáncer cervical (CaCu).

Aproximadamente 95% de las muestras obtenidas de tumores de cérvix contienen DNA de uno o más de los tipos de HPV (Lowy *et al.* 1994). Los primeros subtipos de HPV de alto riesgo aislados de carcinomas cervicales fueron los tipos HPV-16 (Dürts *et al.* 1983) y HPV-18 (Boshart *et al.* 1984), a los que subsecuentemente se adicionaron otros más, entre los que se incluyen los tipos 31,33,35,39,45,51 y 52 (revisado por Werness *et al.* 1991).

¿ Cómo son estos virus?

a. Estructura general

Los viriones de los HPVs son pequeñas cápsides icosaédricas, desnudas, formadas de 72 capsómeros y con un diámetro de 50 a 55 nm. La cápside se encuentra formada por 2 proteínas estructurales denominadas L1 y L2.

b.El mapa genómico y su organización

El genoma viral de la mayoría de los papilomavirus conocidos hasta hoy, se encuentra clonado y secuenciado en su totalidad (Gen Bank Database y European Molecular Biology Laboratory). La organización genómica de este grupo se encuentra muy conservada y está formada por una molécula de DNA de doble cadena, en forma circular, con un peso molecular aproximado de 5×10^6 daltones, lo que corresponde a casi 8000 pares de bases.

Los marcos de lectura abierta están localizados únicamente sobre una de las cadenas, lo que significa que la transcripción es unidireccional.

La cadena codificante contiene 10 marcos de lectura abierta que se dividen en dos regiones: una denominada temprana (E) y otra tardía (L) basándose en su localización sobre el genoma. La región temprana del genoma viral formada por los

genes E6, E7, E1, E2 E4 y E5 se expresa en células con infección no productiva y en células transformadas, mientras que la región tardía, formada por las proteínas L1 y L2, se expresa solamente en células de infección productiva. El gen E4 considerado como gen temprano por su localización, actualmente se considera tardío, ya que se ha demostrado que participa en la encapsidación del virus (Fig. 1).

Región tardía

Esta región codifica para las 2 proteínas estructurales que conforman la cápside. La principal proteína L1 tiene un peso molecular de 56 kDa y representa aproximadamente el 80% de la proteína viral total. La otra proteína L2, se encuentra en menor proporción en la cápside y tiene un peso de 78 kDa.

Región temprana

Proteínas E1 y E2. Estas dos proteínas se encuentran involucradas en la regulación de la transcripción y la replicación del genoma viral, ambas son proteínas de regulación que se unen a DNA.

La proteína E1 se encuentra muy bien conservada entre todos los papilomavirus y en combinación con E2 es necesaria para la replicación del genoma viral (Chiang *et al.* 1992). Se sabe muy poco sobre la función de E1 en papilomavirus humanos y mucho de nuestro conocimiento sobre la función de esta proteína se infiere por analogía con la proteína del papilomavirus bovino BPV-1. Las mutaciones que destruyen este gen resultan en un virus defectuoso en la replicación del DNA y ensayos de replicación transitoria e *in vitro* han demostrado un requerimiento absoluto de E1 en la replicación viral (Yang L *et al.* 1991).

Por otra parte, la proteína E2 se necesita para una replicación eficiente. Incluso los sistemas de replicación *in vitro* requieren de la presencia tanto de E1 como de E2.

En la misma forma, la proteína E2 se une a la secuencia consenso ACCN₆GGT (Androphy *et al.* 1987) y regula la transcripción de promotores conteniendo sitios de unión a E2. Una característica interesante de esta proteína, es que puede funcionar como un activador o un represor de la transcripción, dependiendo del contexto de los sitios de unión a E2 dentro de la región activador-promotor del genoma viral.

En el caso de los papilomavirus de alto riesgo, E2 reprime la expresión de los genes tempranos del virus (Thierry & Yaniv 1987).

Proteína E5. E5 es una proteína viral pequeña, de apenas 44 aminoácidos, que se

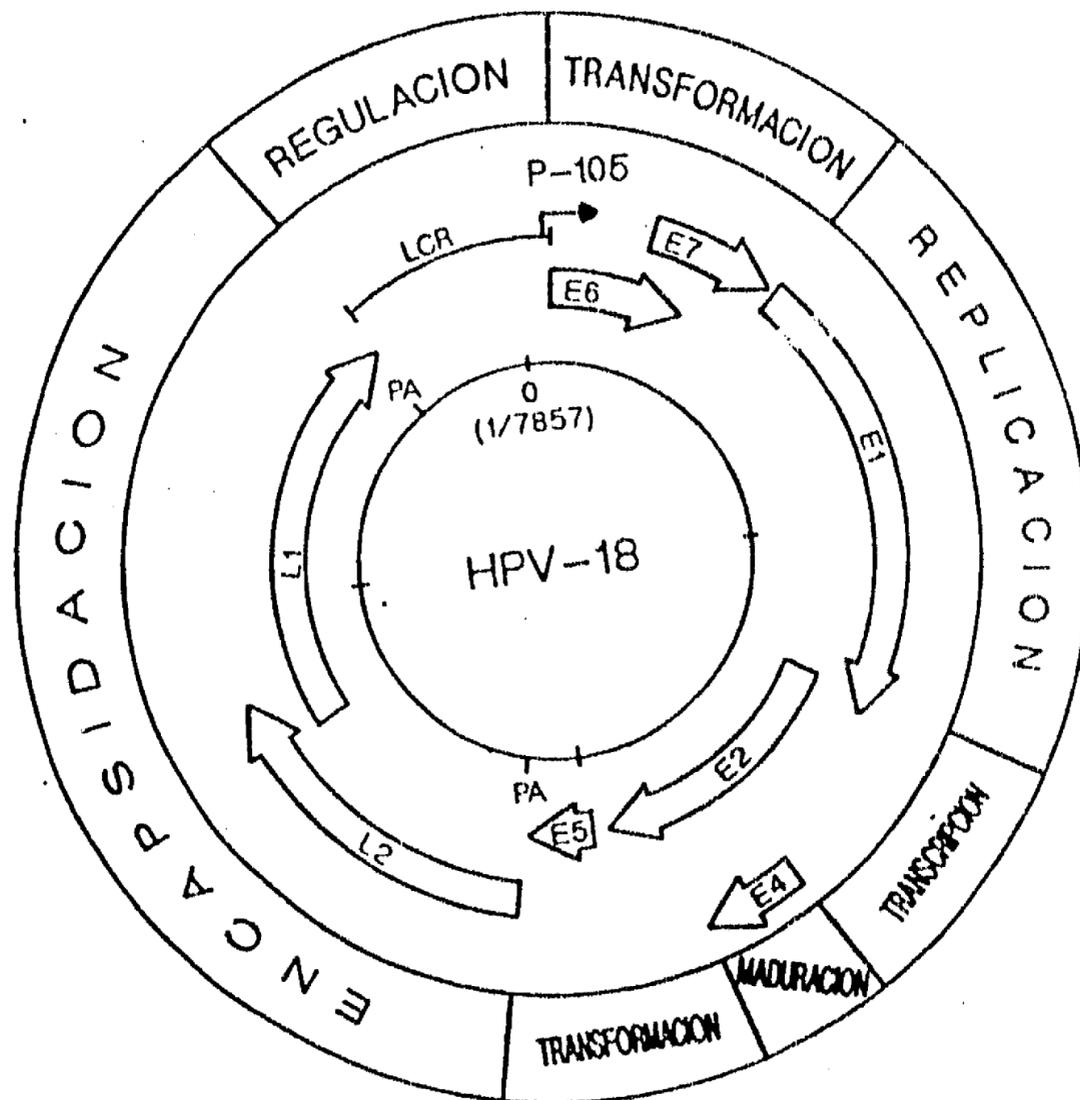


FIG 1. MAPA GENOMICO DEL HPV-18. El genoma del HPV-18 se representa esquemáticamente con sus regiones temprana y tardía, separadas por la región de control. El promotor P-105 representado por una flecha dentro de la LCR y exactamente arriba de los genes E6/E7. Las funciones de las proteínas se encuentran indicadas.

une a la membrana y es suficiente para la transformación de algunas líneas celulares de ratón. Se supone que esta proteína es demasiado pequeña para poseer una actividad enzimática intrínseca, y se ha propuesto que funciona alterando la actividad de receptores específicos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el estimulante de colonias (Martin *et al.* 1989). Sin embargo, no hay evidencias de que E5 de los HPVs pueda inmortalizar células humanas, de hecho la expresión de esta proteína generalmente se pierde en los procesos de integración del genoma viral, por lo que es posible que no juegue un papel muy importante en los procesos de transformación (Schwarz *et al.* 1985).

Proteínas E6 y E7. Un gran número de ensayos de transformación *in vitro* han mostrado que los genes E6 y E7 codifican para las oncoproteínas virales. Los primeros experimentos mostraron que el DNA de los papilomavirus humanos de alto riesgo es capaz de inmortalizar las células de ratón NIH-3T3 (Kanda *et al.* 1988). Posteriormente se obtuvieron evidencias de que la expresión tanto de E6 como de E7 eran necesarias y suficientes para inmortalizar de manera eficiente a sus hospederas naturales, las células humanas de epitelio escamoso (Münger *et al.* 1989).

Aunque el genoma viral puede sufrir rearrreglos e interrupciones significativas, es interesante notar que los genes E6 y E7 son mantenidos regularmente, y su expresión es requerida para el mantenimiento del fenotipo transformado tanto *in vitro* como *in vivo* (Schwarz *et al.* 1985). De hecho la expresión de estos genes ha sido observada en todas las biopsias de CaCu, que han mostrado ser positivas para HPV.

Los mecanismos moleculares potenciales a través de los cuales estas proteínas virales podrían estar involucradas en la transformación celular asociada a HPV, parecen residir en los complejos que estas oncoproteínas pueden formar con proteínas celulares que participan en el control del ciclo celular.

E7 es una fosfoproteína nuclear de 98 aminoácidos, que une zinc (Smotkin *et al.* 1989) y es fosforilada por la casein-cinasa II *in vitro* (Firzlaff *et al.* 1989). Presenta una región amino terminal con una gran similitud a las proteínas E1A de adenovirus y el antígeno T grande del virus SV-40 (Kalderon & Smith 1984). Algunos estudios han mostrado que esta región es de enorme importancia para la función transformante de estas proteínas. La porción carboxilo terminal de E7 no muestra ninguna secuencia homóloga adicional con estas proteínas, pero contiene 2 copias de un motivo Cys-X-X-Cys, que parece participar en la unión del zinc.

La proteína E6 presenta algunas funciones que son necesarias para la transformación eficiente de células en cultivo. Esta es una proteína básica de 151 aminoácidos que une zinc. En su región carboxilo terminal presenta 4 repeticiones del motivo Cys-X-X-Cys, presente también en la proteína E7 (Barbosa *et al.* 1989),

lo que sugiere que estas 2 proteínas se encuentran relacionadas evolutivamente. Una característica interesante es que E6 se une a la proteína supresora de tumores p53, aunque no presenta homología con otras proteínas virales que se unen a p53, como el antígeno T de SV40 y la proteína E1B de adenovirus. Una vez que E6 se acompleja con p-53, promueve su degradación.

¿ Cómo pueden los papilomavirus transformar a las células ?

El descubrimiento de que las oncoproteínas virales se unen a proteínas críticas que regulan el ciclo celular, ofreció las primeras evidencias que nos indicaron los mecanismos de acción de estos virus transformantes.

Algunos experimentos de co-precipitación *in vitro* han mostrado que la oncoproteína E7 se une a la forma hipofosforilada de pRb y presumiblemente esta interacción resulta en la inactivación de pRB y la liberación del factor de transcripción E2F-1, lo que permite la síntesis de determinados transcritos y la progresión del ciclo celular hacia la fase S.

El estado de fosforilación de pRb es regulado a través del ciclo. La forma hipofosforilada de pRB, unida al factor de transcripción E2F-1 se encuentra presente en las fases G0 y G1 (presumiblemente actuando como supresor del ciclo celular). Durante la transición a la fase S, pRb es fosforilado en residuos de serina por una o mas cinasas dependientes de ciclina o cdk's, por lo que pierde afinidad por E2F-1, y lo libera (forma hiperfosforilada inactiva) .

Al final de la fase M, pRb vuelve a su forma hipofosforilada, posiblemente por la acción de una fosfatasa específica y se une nuevamente al factor de transcripción E2F-1 y lo inactiva.

En la misma forma, la interacción de la proteína E7 con pRb, puede resultar en la liberación de E2F-1, permitiendo a éste funcionar como un activador transcripcional de los genes involucrados en el inicio de la fase S, y de esta manera alterar el ciclo celular (revisado por Cobrinik *et al.* 1992)(Fig. 2).

La propiedad de esta oncoproteína para unirse a pRb, llevó a suponer que E6 podría unirse a otros genes supresores de tumores como la proteína p53 (Wernes *et al.* 1990). La p53 se incrementa significativamente en respuesta a daño inducido en el DNA por radiaciones gama o mutágenos. El aumento en los niveles de esta proteína estimula la síntesis de la proteína waf1/cip1, la cual inactiva proteínas cinasas que intervienen en el ciclo celular, lo que permite que éste se detenga mientras se reparan los daños ocasionados al genoma, antes de que ocurra una nueva ronda de replicación (Xlong *et al.* 1993).

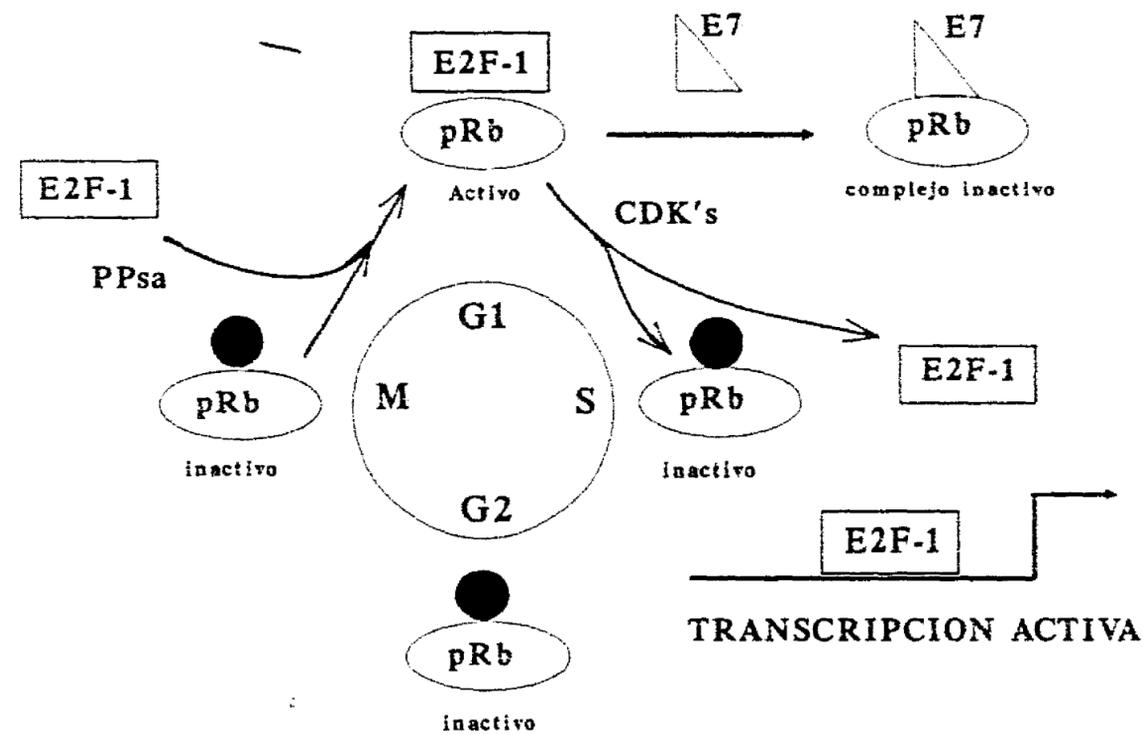


FIG 2. INTERACCION DE LA PROTEINA VIRAL E7 CON pRb. Durante el ciclo celular, la proteína Rb se encuentra fosforilada de manera diferencial. La forma no fosforilada solo se detecta durante la fase G1 del ciclo, y se supone que esta forma representa la forma activa, actuando como un regulador negativo de la progresión del ciclo celular. Durante la transición a la fase S, pRb es fosforilado por la acción de cinasas dependientes de ciclinas (cdk), lo que resulta en la inactivación de pRb. Solo hasta que pRb es nuevamente defosforilada, por acción de alguna fosfatasa, la célula regresa a G1. Aparentemente la unión a la oncoproteína viral E7, provoca una inactivación de la función reguladora de pRb, promoviendo el inicio de la fase S.

Es interesante hacer notar que las células que expresan E6 no manifiestan esta respuesta celular al daño del genoma, aparentemente porque la interacción de E6/p53 rompe el efecto que p53 ejerce sobre el ciclo celular. El mecanismo por el cual E6 puede inactivar p53 puede deberse a que E6 promueve la degradación de p53 a través del sistema de proteólisis dependiente de ubiquitina (Scheffner *et al.* 1990). Recientemente, se ha demostrado que otra proteína celular, denominada E6-AP, es necesaria para la formación del complejo con p53 (Fig. 3).

Las proteínas Rb y p53 juegan un papel muy importante en la regulación del ciclo celular, por lo tanto, es concebible que la interferencia con su función a través de los oncogenes virales, provoque una desregulación del ciclo celular e inestabilidad cromosomal. De hecho se ha mostrado que mutaciones que inactivan estas moléculas incrementan la frecuencia de pérdida de cromosomas, la amplificación génica (Livingstone *et al.* 1992) y la progresión de tumores (Kuerbitz *et al.* 1992).

La importancia de una alta expresión de los genes E6/E7 en la transformación celular, se ha remarcado con experimentos que muestran que la sobreexpresión de estos genes o su inhibición, usando los correspondientes antisentidos, resulta en cambios en el crecimiento de líneas celulares y la tumorigenicidad. Por lo tanto, estos oncogenes no sólo participan en la iniciación sino también en el mantenimiento del fenotipo proliferativo y maligno.

Región de control

Además de la región codificante, el genoma de los papilomavirus contiene una región de 1 kb, que se extiende entre la región temprana y la tardía, llamada la región larga de control o LCR por sus siglas en inglés. En el caso del HPV-18, esta región ha mostrado ser una de las principales determinantes del potencial transformante del virus.

Un gran número de factores celulares, entre los que se incluyen AP-1, NF1 y Sp1, participan en el control del promotor viral P-105, que regula la expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7. La LCR puede ser subdividida por su digestión con la enzima *RsaI* en 3 regiones: una región terminal 5', una región central denominada el activador constitutivo y la región promotora proximal.

¿Qué controla la expresión de los oncogenes virales?

Es interesante hacer notar que la integración del genoma de HPV es un fenómeno que se observa regularmente en muchos tumores de CaCu, aunque un pequeño porcentaje de las biopsias contiene exclusivamente DNA episomal (Dürst *et al.* 1987).

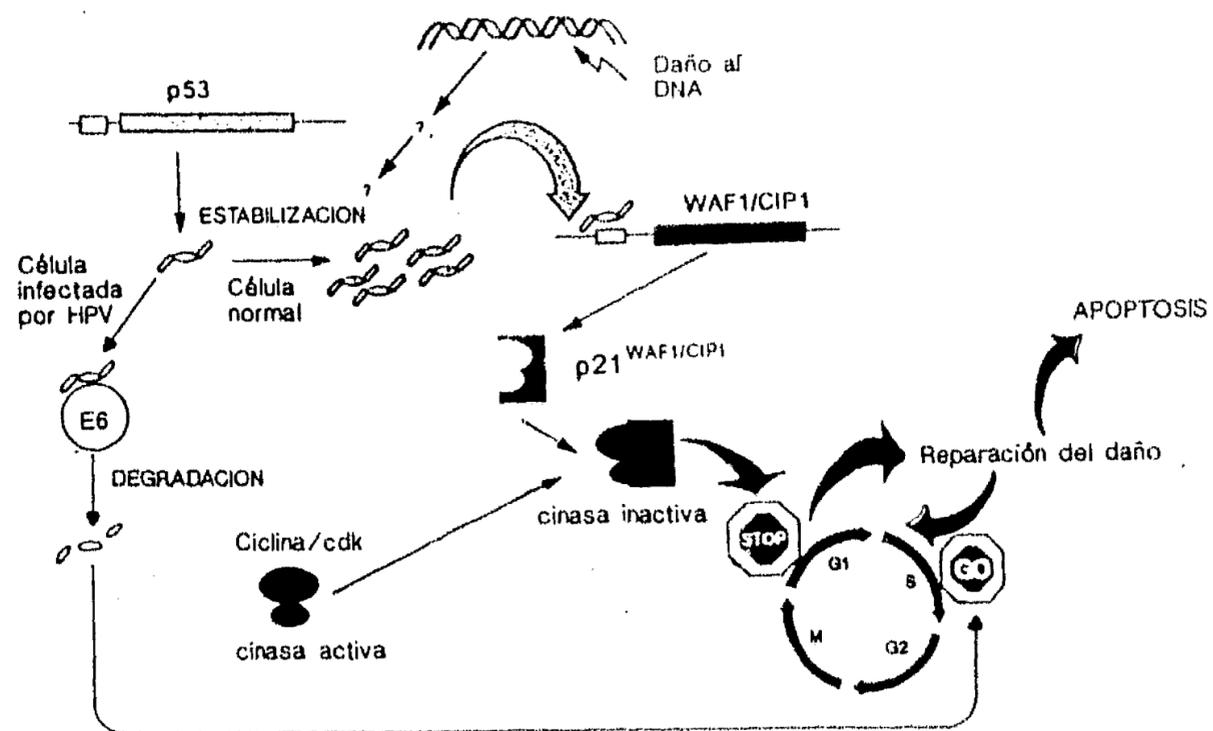


FIG 3. INTERACCION DE LA PROTEINA VIRAL E6 CON p53. El nivel de la proteína p53 es usualmente bajo. Los daños ocasionados al DNA provoca un incremento en los niveles normales de esta proteína, lo que promueve que el ciclo celular se detenga en G1 hasta que el daño sea reparado . La proteína viral E6 puede interferir con la función reguladora de p53, por secuestrarla y formar un complejo no funcional o por promover su degradación. Ambos mecanismos resultan en la inactivación de las acciones de p53.

En el proceso de integración, el DNA de los papilomavirus sufre preferencialmente interrupciones en la región E1/E2 del genoma viral (Schwarz *et al.* 1985). La destrucción del gen E2, que como se ha mencionado codifica para un represor de la transcripción de los HPVs de alto riesgo, parece ser importante en la desregulación de la expresión de los oncogenes virales (Romanczuk *et al.* 1990).

Este escenario podría en parte explicar cómo estos oncogenes virales pueden transformar a las células, sin embargo algunas evidencias han mostrado que el fenotipo maligno sería el resultado de un efecto dual. Por una parte la interrupción de mecanismos de control viral, representado por la pérdida de E2 y por el otro, un escape de los mecanismos de control intracelular que regulan la transcripción de los oncogenes virales, en ausencia de E2.

Control celular de la expresión de los oncogenes de HPV

En 1977, zur Hausen propuso la existencia de mecanismos de control celular que regulaban la expresión de los oncogenes virales.

Los primeros indicios vinieron de la observación de que existía un gran número de proteínas celulares que influencian de manera diferente tanto positiva como negativamente la expresión de los oncogenes virales.

En la misma forma, se ha encontrado que existe una clara diferencia en la actividad transcripcional de E6/E7 entre lesiones neoplásicas de diferentes grados. Las células proliferativas en NIC de bajo grado muestran muy baja actividad transcripcional, apenas detectable por técnicas de hibridación *in situ*, en contraste al cáncer invasivo, que presenta abundante actividad transcripcional.

Aparentemente, la transición entre los estados de bajo/alto grado de la lesión, requiere la desregulación en la transcripción de los oncogenes virales E6/E7 (Dürst *et al.* 1992).

Por esta razón, durante los últimos años se ha dado particular interés en la caracterización de los diferentes factores celulares que participan regulando la expresión de E6 y E7. El gran número y la diversidad de factores que están involucrados en esta regulación nos dan sólo los primeros indicios sobre la compleja maquinaria que parece requerirse para controlar la expresión de estos genes virales.

FACTORES CELULARES QUE MODULAN NEGATIVAMENTE LA EXPRESIÓN DE LOS ONCOGENES VIRALES

Entre los factores que regulan negativamente la transcripción se encuentran las proteínas:

- Factor Oct-1 (Hoppe-Seyler *et al.* 1991).
- Los receptores de ácido retinoico (Bartsch *et al.* 1992).
- El represor transcripcional YY-1 (Bauknetch *et al.* 1992).

Estos factores podrían actuar como silenciadores de la expresión viral en células no transformadas, y su pérdida o cambio en la actividad podría permitir un aumento en la transcripción en células transformadas. Sin embargo, no se ha demostrado la existencia de diferencias de expresión o modificaciones funcionales de estos factores entre células malignas y no malignas.

En estudios *in vitro*, se ha demostrado que el represor transcripcional YY-1 es capaz de silenciar la actividad del promotor P-105 de HPV-18. Las mutaciones en el sitio de unión al factor YY-1 en el contexto del promotor completo, ocasionan un incremento en la actividad transcripcional basal en células no transformadas (Bauknetch *et al.* 1992).

FACTORES CELULARES QUE MODULAN POSITIVAMENTE LA EXPRESIÓN DE E6/E7

Un gran número de factores celulares que activan la transcripción temprana del HPV-18 se unen en *cis* a la región de control en donde se encuentra el promotor P-105. La unión de algunas proteínas nucleares a sitios específicos en la región regulatoria de HPV-18 ha sido observada con experimentos de huellas de unión de proteínas o "footprinting" (García Carrancá *et al.* 1988) (Fig. 4).

Aunque no existen evidencias, es posible que la unión competitiva de estos factores a sus sitios específicos o su modificación funcional, pudiera resultar en un aumento en la producción de las proteínas E6/E7 en células malignas.

Entre estos factores de transcripción se han identificado los siguientes:

- NF-II (Gloss *et al.* 1989).
- Sp-1 (Gloss & Bernard 1990).
- KRF-1 (Mack & Laimins 1991).
- TEF-1 (Ishiji *et al.* 1992).
- AP-1 (Chan *et al.* 1990) y
- los receptores activados por glucocorticoides (Gloss *et al.* 1987, Chan *et al.* 1989).

Estos dos últimos factores son el motivo de este estudio por lo que se incluye un breve resumen sobre las características de estos factores.

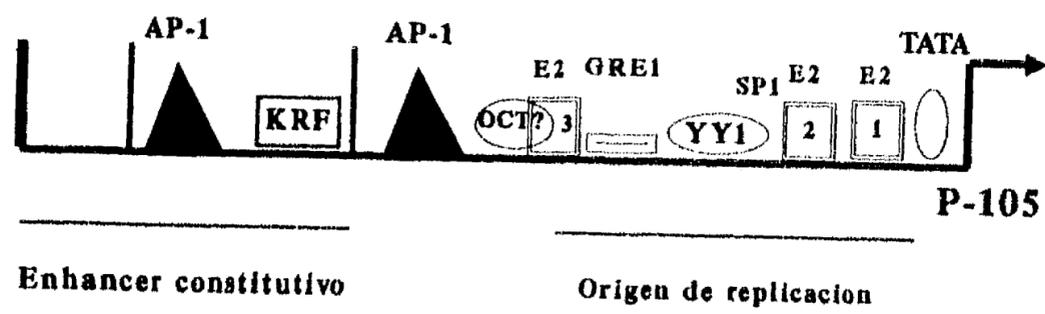


FIG 4. REGION DE CONTROL LARGA DEL HPV-18. Representación simbólica de algunos factores de transcripción que se unen a la región enhancer y la región proximal del promotor P-105.

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN AP-1

Los factores de transcripción AP-1 juegan un papel central en la célula, convirtiendo señales extracelulares en cambios en la expresión de genes específicos, y regulando procesos biológicos tan complejos como la proliferación, la diferenciación y la transformación.

El factor de transcripción AP-1 fue inicialmente identificado por su habilidad para alterar la expresión genética en respuesta a factores de crecimiento (Brenner 1989), citocinas (Curran & Morgan 1985), factores promotores de tumores como el forbol miristato acetato (TPA) (Angel *et al.* 1987), carcinógenos, etc. Este factor transcripcional se une en *cis* a un sitio de reconocimiento específico en los promotores de los genes blanco, denominado sitio AP-1 o elemento de respuesta a TPA o TRE, por sus siglas en inglés.

Este elemento ha sido reconocido en un gran número de genes celulares incluyendo el gen de la colagenasa humana, el de la estromelina y la interleucina 2, y en promotores virales entre los que se incluyen los de SV-40, poloma y papiloma. La comparación de los sitios AP-1 ha llevado a la derivación de una secuencia consenso palindrómica 5' TGA G/C TCA 3' que es reconocida por el complejo proteico AP-1 (Angel & Karin 1991).

De particular importancia resultan los dos sitios AP-1 del HPV-18, que han mostrado tener un papel crucial en la regulación de la actividad del promotor P-105.

Los dos sitios AP-1 presentes en la región de control de HPV-18 se localizan en las posiciones -171 y -349 con respecto al sitio de inicio de la transcripción, conteniendo 2 secuencias idénticas 5'-TGACTAA-3' que contribuyen igualmente al nivel final de transcripción. Las mutaciones en estos sitios, que impiden la unión de los factores AP-1 correspondientes, reducen drásticamente la transcripción de este promotor (Thierry *et al.* 1992).

El complejo AP-1 consiste de dos proteínas nucleares, codificadas por las familias de protooncogenes c-jun y c-fos (Rauscher *et al.* 1988). Los miembros de la familia Fos (v-Fos, c-Fos, Fos B, Fra-1 y Fra-2) pueden asociarse con cualquiera de las proteínas Jun (v-Jun, c-Jun, Jun B y Jun D) para generar heterodímeros estables, que tienen una alta afinidad por el DNA, pero no pueden asociarse con miembros de su misma familia, y por lo tanto no tienen capacidad de unirse a DNA en forma de homodímeros.

En contraste, todos los elementos de la familia Jun, identificados hasta ahora, pueden formar tanto homo como heterodímeros (Ryseck & Bravo 1991).

Experimentos de mutagénesis dirigida han mostrado que la dimerización de estas proteínas ocurre por medio de un motivo estructural denominado "zipper" de leucina, presente en diversas proteínas que se unen a DNA (Angel & Karin 1991).

REGULACION DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AP-1

Los cambios que ocurren en la actividad AP-1 en respuesta a múltiples señales extracelulares, son regulados tanto a nivel de la transcripción como por modificaciones post-traduccionales de las proteínas AP-1 preexistentes.

Es notable que aunque c-jun y c-fos codifiquen los componentes de un factor de transcripción que regula la expresión de varios genes blanco, su propia transcripción es aumentada muy rápidamente en respuesta a diversos estímulos (Kruijer *et al.* 1984). Sin embargo, se ha observado que mientras que la inducción de c-fos es muy transitoria, la de c-jun, es considerablemente mayor (Rahmsdorf *et al.* 1987). En parte, esta diferencia se explica por una mayor estabilidad del transcrito de c-jun (Pertovaara *et al.* 1989) y el hecho de que la proteína Fos actúa como un autorrepresor de su expresión (Ofir *et al.* 1990).

La familia de proteínas Jun muestra homología a nivel de los genes y las secuencias primarias, por lo que se supone que son sujetos de regulación similar pero no idéntica. Tanto c-jun como jun-B son considerados como ejemplos clásicos de los llamados "genes tempranos" por el aumento rápido y transitorio de sus transcritos, después de la estimulación de las células por algunos agentes incluyendo mitógenos (Herschman 1991), mientras que jun-D es relativamente refractario a tal estimulación (Mechta *et al.* 1989). Diversos estímulos que provocan que una célula en reposo entre al ciclo celular provocan la inducción de estos genes tempranos.

Otro importante nivel de control de las proteínas que forman el dímero AP-1, es la modificación postraducciona. En respuesta al tratamiento con el TPA, se observa que AP-1 se une rápidamente a sus sitios de reconocimiento, independientemente de la síntesis de proteínas. Esta actividad ha sido atribuida a un aumento en el patrón de fosforilación de las proteínas Jun.

La actividad transcripcional de c-jun disminuye considerablemente en respuesta a la fosforilación de un sitio que se encuentra adyacente a la región básica de esta proteína y que aparentemente participa de manera activa en la unión al DNA. La sustitución de aminoácidos en este sitio impide su fosforilación por la glucógeno sintasa cinasa 3 (GKS-3) *in vitro*, lo que ocasiona un incremento en su unión a DNA y por lo tanto un aumento en su actividad transcripcional.

Por otra parte, la actividad transcripcional de c-jun se incrementa en

respuesta a la fosforilación de dos residuos de serina (Ser-63 y Ser-73), localizados en su dominio de transactivación. Sólo para darnos una idea de la enorme complejidad que existe en la regulación del factor de transcripción AP-1, se ha observado que en respuesta a radiación por UV (Devary *et al.* 1991) y a algunos oncogenes, entre los que se incluyen *src*, *raf* y *H-ras* (Herrlich & Ponta 1989, Wasylyk *et al.* 1989, Schöntal *et al.* 1988), estos sitios son rápidamente fosforilados, lo que resulta en una actividad transcripcional de c-jun y la inducción de genes blanco con sitios AP-1. Esto significa que el complejo AP-1 sirve como un blanco en el núcleo para una vía de señales mitogénicas o estímulos del ambiente. Evidentemente cada uno de estos oncogenes actúa a diferentes niveles para regular la actividad AP-1 (Smeal *et al.* 1992).

Una característica importante de c-jun es su capacidad de cooperar con Ha-ras en la promoción de la transformación. Algunos experimentos realizados *in vitro* han mostrado que la expresión de c-jun puede promover la formación de algunos focos de transformación en fibroblastos embrionarios de rata. Esta capacidad es marcadamente potenciada por la cotransfección de un gen Ha-ras activado (Schütte *et al.* 1989).

Una serie de experimentos mostraron que la cooperación entre estos dos oncogenes requiere la fosforilación de c-jun en los residuos Ser 63/73, por cinasas moduladas por H-ras (Binetruy *et al.* 1991).

Otro importante evento de regulación al que se encuentra sujeto el factor AP-1, es el que ejercen algunas hormonas esteroideas, las cuales han mostrado ser potentes inhibidores de la actividad AP-1 promovida por el TPA. El mejor estudiado es el receptor de glucocorticoides activado, que es capaz de formar complejos inactivos con los complejos AP-1, lo que ocasiona una fuerte reducción en la expresión de los genes dependientes de sitios AP-1 (Lucibello *et al.* 1990).

LOS ONCOGENES RAS

Ha pasado un poco más de una década desde que los genes ras con potencial oncogénico fueron detectados en tumores humanos. Durante todo este tiempo, ha quedado establecido que la activación de las proteínas Ras constituye un paso determinante en la principal vía de transducción de señales, involucrada en el crecimiento celular y el desarrollo.

Ras ha servido como el prototipo de un grupo de proteínas, con pesos moleculares en un rango de 21-25 kDa, que unen nucleótidos de guanina y que muestran homología estructural, por lo que han sido reunidas en la superfamilia de proteínas relacionadas con Ras.

La función de las proteínas Ras se ha conservado a lo largo de la evolución,

a tal grado que una proteína Ras humana puede complementar a una cepa de levadura que carezca de esta actividad (Kataoka *et al.* 1985). En células de mamífero, estas proteínas regulan actividades tan variadas como la diferenciación, la progresión hacia la fase S del ciclo celular y la respuesta Inmunológica (Moodie & Wolfman 1994).

La importancia de los genes ras ha llevado a un análisis sistemático de las proteínas que codifican. En células humanas se encuentran tres isoformas de esta proteína: H-ras, K-ras y N-ras, cuyos genes se encuentran en los cromosomas 11,12 y 1 respectivamente.

El análisis de la expresión de los genes ras, utilizando anticuerpos, ha mostrado que estas proteínas pueden ser encontradas a niveles bajos en todos los tejidos, tanto adultos como fetales. Sin embargo, análisis de los RNAs mensajeros han mostrado algunas diferencias de expresión. Por ejemplo en células de ratón, la expresión de H-ras es más alta en piel y músculo esquelético; K-ras, se encuentra preferencialmente en los intestinos y en el timo, mientras que N-ras se encuentra principalmente en testículos y el timo. Este patrón de expresión ha llevado a la conclusión de que por lo menos uno de estos genes es expresado en los diferentes tipos celulares (revisado en Barbacid 1987).

El descubrimiento de que las proteínas Ras unen nucleótidos de guanina (GTP o GDP) con alta afinidad y de que poseen actividad intrínseca de GTPasa sugirió, por analogía con otras proteínas que unen nucleótidos de guanina, un mecanismo por el cual la actividad de las proteínas Ras es regulada (Temeles *et al.* 1985)

Estas proteínas tienen la propiedad de funcionar como "switches" binarios, en donde su actividad biológica es determinada por el nucleótido que tienen unido. La conformación unida a GTP es la forma "activa" en el sentido de que esta forma puede interactuar con una molécula blanco y enviar la señal al interior de la célula. La conformación que une GDP es referida como "inactiva" ya que en esta forma no puede interactuar con sus moléculas blanco.

La actividad intrínseca de GTPasa de esta proteína limita la vida media de las especies activas Ras-GTP. El GTP unido a la proteína es hidrolizado a GDP y un fosfato inorgánico, lo que provoca que la conformación activa unida a GTP se convierta en la forma inactiva unida a GDP (revisado por Kaziro *et al.* 1991) (Fig. 5).

En células quiescentes, la mayoría de las moléculas de Ras se encuentran en su conformación inactiva unida a GDP, mientras que la estimulación de las células con mitógenos o agentes inductores de la diferenciación, incrementan la abundancia de la forma activa unida a GTP.

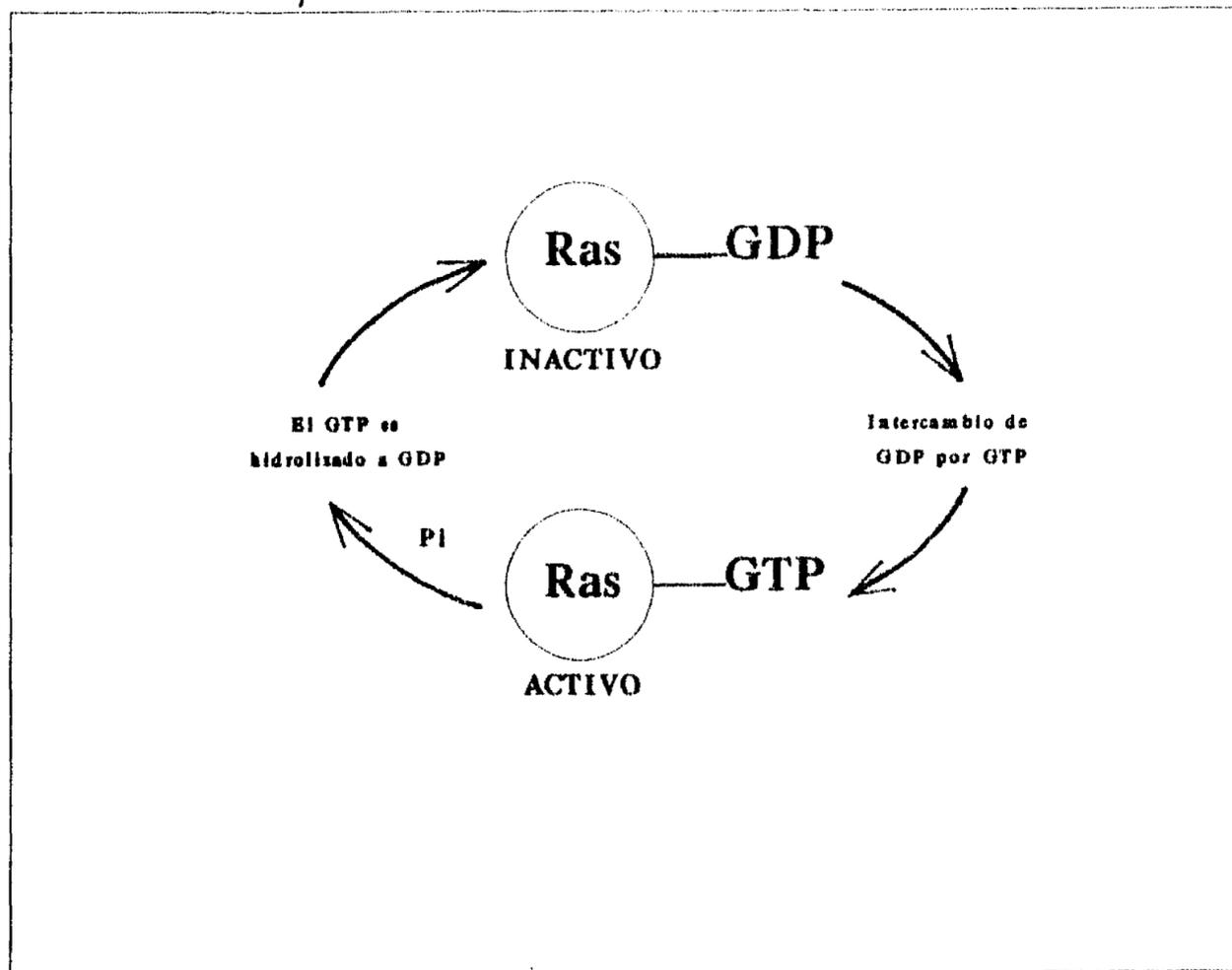


FIG 5. CICLO DE ACTIVACION DE LAS PROTEINAS Ras. Estas proteínas presentan una actividad intrínseca de GTPasa , que inactiva su función por hidrolizar el GTP a GDP. Todas las mutaciones transformantes de Ras involucran aminoácidos que son críticos para la unión y la hidrólisis del GTP.

La comparación de las actividades biológicas y bioquímicas de las proteínas Ras, ha mostrado que las versiones mutantes de Ras con actividad transformante aumentada presentan una actividad reducida de GTPasa. La sustitución de Gly-12 por Val-12, la cual es la forma mutada que se encuentra más comúnmente en carcinomas humanos, provoca una dramática disminución en la actividad de hidrólisis de GTP y por lo tanto se acumula la forma activa unida a GTP. Además de esta versión, los genes ras adquieren potencial transformante por mutaciones puntuales en los codones 13,59 ó 61 (Bos 1989). Todas las mutantes de Ras asociadas con la transformación se caracterizan porque adquieren una ganancia de función.

Algunos análisis de los niveles de Ras-GDP y Ras-GTP en células intactas han mostrado que varios estímulos extracelulares promueven la activación de Ras en diferentes tipos celulares. La mayoría de las señales que inducen la activación de Ras son mediadas a través de receptores con actividad intrínseca de tirosin-cinasa, entre los que se incluyen el PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas), EGF y la insulina (revisado en Satoh *et al.* 1992).

La vía de los receptores con actividad de tirosin-cinasa que promueven la activación de las proteínas Ras, involucra la activación de una cascada de serina-treonina cinasas, muy conservadas evolutivamente, denominadas las proteínas-cinasas activadas por mitógenos o cinasas reguladas por señales extracelulares (MAPK o ERK por sus siglas en inglés) (Pelech & Sanghera 1992).

La unión de un factor de crecimiento a su receptor, con actividad de tirosin-cinasa, induce la formación de un complejo multiproteico en la membrana plásmica, que promueve la conversión de Ras-GDP inactivo a una forma activa unida a GTP (Mc. Cormick 1993). Ras activo a su vez inicia una cascada de fosforilaciones secuenciales en donde la serin-treonin cinasa Raf fosforila y activa una cinasa dual específica denominada MAP cinasa-cinasa (MAPKK) (Payne *et al.* 1991), que a su vez fosforila a la MAP cinasa, (MAPK) en residuos de tirosina y treonina, lo que aumenta su actividad de cinasa. Una vez activada, la MAPK fosforila algunos factores de transcripción en el núcleo (Blenis 1993) (Fig. 6).

Las MAPKs de vertebrado tienen pesos moleculares en los rangos de 40-44 kDa y 54-64 kDa, y fosforilan en residuos de serina o treonina contenidos en el motivo P/LXT/SP, por lo que en la misma forma que las cinasas dependientes de ciclinas, las MAPKs son cinasas dirigidas por prolina. Los diferentes sustratos de estas cinasas incluyen la fosfolipasa A2, la cinasa p90rsk y diferentes factores de transcripción, tales como c-Myc, c-Jun y Elk-1 (revisado por Marshall 1994).

La fosforilación de los factores de transcripción por las MAPKs podría representar la conexión citoplásmica entre los eventos mediados por el receptor y los cambios en la expresión genética en el núcleo. Tal idea es mucho más

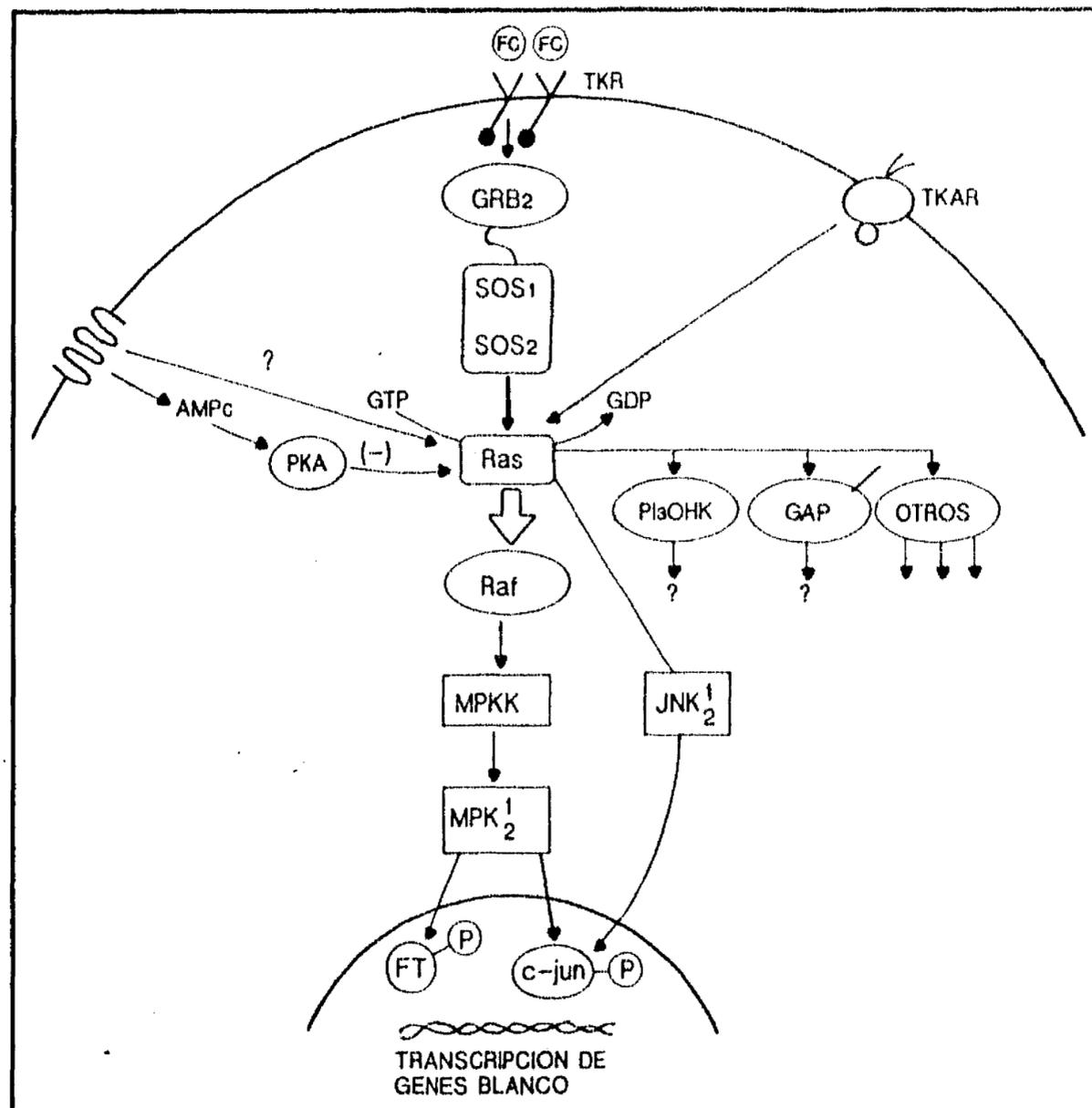


FIG 6. LA CASCADA DE SEÑALES DE Ras, SUS DIVERSOS BLANCOS Y SU INTERACCIÓN CON OTRAS VIAS DE SEÑALIZACIÓN. Ras puede ser activado por un factor de crecimiento (FC) que se une a su receptor específico con actividad de tirosina-cinasa (TKR), a través de una vía ubícua, consistente de una proteína adaptadora (GRB2) y un factor que estimula la disociación de GDP unido a Ras (SOS) activándolo directamente. Una vez activo, Ras se une a diversas proteínas, que pueden ser los efectores de las múltiples funciones dirigidas por Ras. El mejor conocido de los diversos caminos, es el mediado por Raf, y que ocasiona finalmente la activación de algunos factores de transcripción.

atractiva por la observación de que las MAPKs activadas pueden entrar al núcleo.

Por otra parte, recientemente se identificó la actividad de una nueva proteína cinasa de 46 kDa, denominada la cinasa amino terminal de c-jun o JNK1 por sus siglas en inglés. Esta cinasa se une al dominio de transactivación de c-jun y fosforila los residuos Ser-63, Ser-73 y algunos otros sitios en menor proporción (Hibi *et al.* 1993). Estudios posteriores de caracterización bioquímica identificaron un polipéptido adicional de 55 kDa que exhibe la misma actividad, denominada JNK2. Una característica importante de estas cinasas es que son capaces de fosforilar residuos de serina, seguidos de prolina y un aminoácido ácido, lo que las identifica como miembros del grupo de cinasas dirigidas por prolina, que como se había mencionado, incluye a las MAPK y a las cinasas dependientes de ciclina (Davis 1993).

Una característica interesante de JNK1, es que es estimulada rápidamente por la irradiación con rayos ultravioleta (UV) o por la expresión de Ha-ras oncogénico. De manera similar a las MAPKs, las JNKs requieren para ser activadas de eventos duales de fosforilación tanto en treonina como en tirosina, aunque el motivo presente en las JNKs (Thr-Pro-Tyr) es distinto al de las MAPKs (Thr-Glu-Tyr) (Derijard *et al.* 1994).

De esta forma, es importante considerar a las JNKs como elementos importantes en la fosforilación de c-jun dentro de la vía de Ha-ras. También es importante recalcar que el único sustrato conocido de las JNKs es c-jun. En vista de la activación tan eficiente, en respuesta a radiación UV, pareciera que estas enzimas juegan un papel altamente específico en la fisiología de la célula.

Sin embargo este es un panorama demasiado simple de la vía de señalización dependiente de Ras, ya que más bien parece que una diversidad de señales fluyen a través de las proteínas Ras y que existen un gran número de moléculas blanco. Posiblemente la especificidad de las diversas interacciones cambie dependiendo del objetivo final de la vía.

MODELO DE CONTROL CELULAR DE LA EXPRESIÓN DE LOS ONCOGENES DE HPV

Entre las evidencias experimentales de la asociación entre HPV y el cáncer humano encontramos:

- La presencia de DNA viral en casi el 90% de los tumores derivados de cáncer de cérvix (el más frecuente el HPV-16, seguido por el HPV-18).
- Las lesiones precursoras del cáncer genital (como las displasias cervicales)

contienen DNA viral en forma episomal y son capaces de producir partículas virales en las células superficiales de la piel, mientras que la mayoría de los tumores analizados se observa la integración del DNA viral.

- El mantenimiento de los oncogenes virales E6 y E7, en la gran mayoría, si no es que en todas las biopsias positivas para HPV y en las líneas celulares derivadas de cáncer cervical.

Por lo anterior, este virus aparece como el principal factor condicionante para el CaCu. Sin embargo como otras infecciones virales relacionadas con el cáncer humano, la infección por HPV no es suficiente para la inducción del crecimiento maligno, lo que sustenta la hipótesis de que otros cambios son necesarios para el desarrollo de la malignidad. Incluso, las células inmortalizadas por HPV progresan al estado transformado sólo después de largos períodos en cultivo.

Aparentemente existe una compleja regulación de la expresión de E6/E7, por proteínas específicas del hospedero, lo que representa un mecanismo de defensa celular en contra de la inducción del crecimiento irrestricto. La falla en el sistema de control de la célula hospedera determinaría la predisposición a la conversión maligna.

Tomando en cuenta estas características, zur Hausen ha propuesto la existencia de mecanismos de sobrevivencia intracelular, que utilizan lo que él denomina factores de interferencia celular (CIF), los cuales se encontrarían presentes e intactos en células no tumorigénicas y actuarían *in vivo* suprimiendo la expresión de los oncogenes virales E6/E7.

Desde este enfoque, el desarrollo del CaCu sería la consecuencia de una falla de las células huésped en el control de la expresión viral. La expresión de los oncogenes virales E6/E7 de los tipos oncogénicos de HPV, resultaría en inestabilidad cromosomal, debido a la inactivación de los genes Rb y p53. Entre las mutaciones celulares, acumuladas como el resultado de la inestabilidad cromosomal, podrían encontrarse los genes que codifican para estos CIF, en adición a otros genes importantes en el desarrollo del tumor (zur Hausen 1994).

PARTICIPACION DE LA FOSFORILACION EN EL CONTROL DE LA TRANSCRIPCIÓN DE HPV.

Algunos estudios citogenéticos han mostrado que en muchos carcinomas cervicales el cromosoma 11 tiende a perder uno de sus brazos cortos (Atkin & Baker 1988). Aparentemente, la ruptura de esta parte del cromosoma aumenta en forma importante la actividad transcripcional del promotor-activador de HPV-18 y por lo tanto aumenta la expresión de los genes tempranos de los papilomavirus,

lo que sugiere que algún o algunos genes contenidos en esta región del cromosoma participan en el control de la transcripción viral (Rösl *et al.* 1988).

En la misma forma, algunos experimentos realizados en fibroblastos humanos, con alteraciones en el brazo corto del cromosoma 11, han mostrado que estas células tienen una alta susceptibilidad a la transformación inducida por el virus. El HPV-16 es totalmente inactivo en fibroblastos normales, mientras que es activo en las mismas células que han perdido el cromosoma 11 (Smits *et al.* 1988). Sin embargo, este efecto no es un efecto general sobre la transcripción, ya que el promotor de SV-40 es activo en ambos tipos celulares (Smits *et al.* 1990).

La capacidad de transformación por HPV-16 en fibroblastos que han perdido el cromosoma 11, correlaciona con una alta expresión de los oncogenes virales, lo que sugiere que tras la pérdida de este cromosoma, se activa un factor de regulación positivo, o que alternativamente se pierde uno de regulación negativa.

Una característica muy interesante del antígeno T pequeño del virus del simio SV-40 (ST), es que es esencial para la transformación inducida por HPV en células diploides (de Ronde *et al.* 1989), pero no se requiere cuando las células han perdido el cromosoma 11. En la misma forma, es posible activar la transcripción de HPV-16, por la expresión del ST e incrementar el potencial transformante de 10 a 15 veces (Smits *et al.* 1992a).

Los mecanismos de transactivación mediados por este antígeno son desconocidos, pero parecen estar mediados por la unión observada del ST a la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y su consecuente inhibición, lo que ocasionaría un aumento en el estado de fosforilación de determinadas proteínas celulares (Yang S *et al.* 1991).

La PP2A es una enzima multimérica, perteneciente a la familia de las fosfatasas de serina-treonina. Esta familia incluye además a las fosfatasas 1 y 2B, aunque la PP2A predomina en la gran mayoría de tejidos y células analizados. La PP2A está compuesta de una subunidad catalítica de 36 kDa (C), asociada a dos subunidades regulatorias, de 65 kDa (PR65) y 55 kDa (PR55) respectivamente, que no presentan actividad de fosfatasa, pero actúan regulando a la subunidad C (Cohen 1989).

El ST es capaz de formar complejos con el heterodímero C-PR65, pero no con la subunidad catalítica libre o con la forma heterotrimérica PR55-C-PR65, lo que permite suponer que ST puede competir con la subunidad regulatoria PR55 (Joshi & Rundell 1990).

Todas estas observaciones llevaron a la conclusión de que en las células que carecen del brazo corto del cromosoma 11 es posible activar el promotor de

HPV-16, por la activación o inducción de un factor celular análogo al ST, que funcionalmente actuaría inhibiendo la actividad de la PP2A. La naturaleza de este factor apuntó hacia la subunidad PR55, y de hecho se mostró que la isoforma β de esta subunidad es únicamente detectable en células que han perdido esta parte del cromosoma 11 (Smits *et al.* 1992b).

Corroborando esta hipótesis, el ácido okadaico aumenta la actividad transcripcional del promotor-activador de HPV-16. Este compuesto es un poliéter compuesto de un ácido graso de 38 carbonos, aislado de la esponja negra *Halichondria okadae*, que ha mostrado ser un potente promotor de tumores en piel de ratón. OA es un potente inhibidor de la actividad de la PP2A y probablemente ejerza sus efectos al unirse a la subunidad C de esta proteína. Si la actividad transcripcional aumentada de HPV-16, observada en células que carecen del cromosoma 11, es mediada por la inhibición de la actividad de la PP2A por PR55 β , entonces el OA en células diploides, deberá también resultar en la transactivación del HPV-16.

Estos resultados sugieren que la ruptura del cromosoma 11 tendría profundas implicaciones en los procesos de fosforilación-desfosforilación de diversas proteínas celulares entre las que se incluyen factores de transcripción.

Desde esta panorámica, el modelo del control que la célula ejerce sobre la expresión viral propuesto por zur Hausen, establece que el estado de fosforilación de determinados factores de transcripción sería determinante en el nivel de expresión de los oncogenes virales (zur Hausen 1994) (Fig. 7). Este modelo supone que en una célula infectada existiría una fuerte regulación de la expresión de los oncogenes virales porque determinados factores de transcripción se encuentran desfosforilados (forma inactiva), lo que favorece la unión del silenciador YY1, resultando en un control estricto de la expresión viral.

Por el contrario, durante el desarrollo de un carcinoma se comenzarían a acumular cambios que destruirían esta cascada de regulación intracelular, de tal manera que la transformación mediada por estos virus, sería un proceso formado de pasos individuales, en donde la inhibición de la PP2A llevaría a una fosforilación incrementada de algunos factores de transcripción (forma activa), lo que aumentaría la actividad de promotores tempranos de los HPV.

Pero además, en el momento de la interacción entre el factor fosforilado y su sitio de reconocimiento se podría promover el desplazamiento de YY1, aumentando aún más la actividad transcripcional de los promotores de los tipos virales de HPVs asociados con transformación maligna.

Una posibilidad que nosotros hemos considerado, es que la PP2A pudiera ser responsable de la desfosforilación de los sustratos de la cascada de fosforilación mediada por Ras, es decir, los factores de transcripción AP-1. De

FACTORES HUMORALES

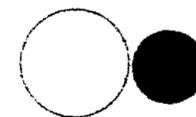
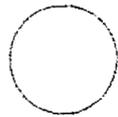
RECEPTORES

ACTIVACION DE CIF
(locus en el cromosoma 11)

NO ACTIVACION DE CIF
(Por ausencia o modificacion)

↓
Activación de la PP2A

ST-SV40 ↓
OA ↓
Inhibición de la PP2A

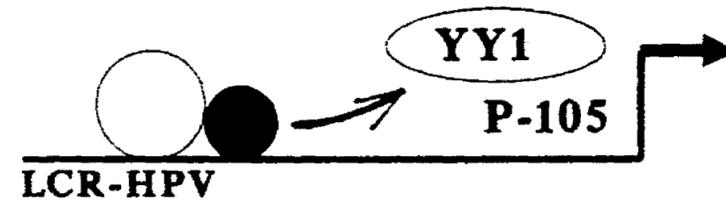
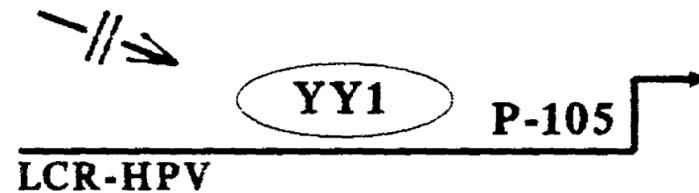


DEFOSFORILACION DE
FACTORES DE TRANSCRIPCION

FOSFORILACION DE
FACTORES DE TRANSCRIPCION

EXPRESION CONTROLADA POR
POR LA UNION DE YY1

DESREGULACION POR
DESPLAZAMIENTO DE YY1



hecho, existen algunas evidencias de que la PP2A aumenta la actividad de promotores que contienen sitios AP-1, aunque no se conocen claramente los mecanismos de acción (Alberts *et al.* 1993). Sin embargo, si ubicamos esta suposición en el contexto del cromosoma 11, esta posibilidad se vuelve todavía más interesante. La pérdida frecuente del brazo corto de este cromosoma en varios tipos tumorales, posiblemente refleja la inestabilidad genética de esta región, producida por la presencia de sitios frágiles entre las regiones cromosómicas 11p13 y 11p15.

Aunque 11p15 es una banda muy grande, es curioso que en esta región, específicamente en 11p15.5, mapea uno de los alelos del gen Ha-ras. Coincidentemente, la progresión a un fenotipo transformado, totalmente tumorigénico en queratinocitos inmortalizados por HPV, sólo puede ser observada por la cotransfección de estas células, con una versión activada del oncogen Ha-ras (Di Paolo *et al.* 1989). Estas observaciones indicarían que algunos eventos relacionados con la activación de la vía de ras son necesarios para el desarrollo de un carcinoma cervical.

Como ya había mencionado, los oncogenes ras han sido implicados en el desarrollo de una gran variedad de tumores. En la misma forma se ha encontrado que son acarreados en varias cepas de retrovirus de transformación aguda o bien activados por virus que no acarrean oncogenes, lo mismo que en tumores de etiología sin ninguna relación viral.

Hasta hoy, los genes ras transformantes son los oncogenes asociados más frecuentemente con cáncer humano. Su incidencia varía entre el 5-40% en los diferentes tumores humanos, mientras que la global se estima alrededor de un 30%.

Sin embargo, algunos estudios han mostrado que una mutación puntual en el gen H-ras, aunque suficiente para activarlo, no es por sí misma suficiente para la transformación neoplásica de líneas celulares, sino que es necesaria su cooperación con otros oncogenes, como c-jun o bien eventos adicionales como la amplificación génica de H-ras (Finney & Bishop 1993).

Es frecuente encontrar aumentos en la expresión de los genes ras en células tumorales por amplificación génica o algún otro mecanismo (Yokota *et al.* 1986). Incluso EJ H-ras1, el alelo original de ras activado, aislado de un tumor humano de vejiga (Der *et al.* 1982), contiene una mutación adicional a la del codón 12 en el último intrón, que aumenta la expresión del gen hasta 10 veces (Cohen & Levinson 1988).

Por otra parte, otros eventos adicionales podrían también ser suficientes, como la pérdida de un alelo normal de H-ras que ha sido observada en diversos

tumores humanos (Yokota *et al.* 1986), y es una característica consistente en los tumores de piel de ratón (Bremmer & Balmain 1990). Además, muchos de estos tumores retienen la copia mutada de H-ras (Yokota *et al.* 1986).

En el caso de líneas celulares de origen cervical, se han reportado alteraciones en la región cromosómica 11p15 (Standbridge 1990) y no sería difícil encontrar mutaciones en el alelo restante, ya que existen diversas evidencias de que la ausencia del producto normal de ras facilita la transformación por el producto remanente mutado.

Estos cambios observados en las líneas celulares derivadas de carcinoma de cérvix podrían ser interpretados como cambios ocasionados durante el cultivo celular. Sin embargo, se han mostrado alteraciones en la expresión de este gen en pacientes con CaCu asociado a papilomavirus humano, entre las que se incluyen amplificaciones en el gen Ha-ras, en por lo menos el 25% de estos pacientes (Kiroshita *et al.* 1994).

Por otra parte, la integración del genoma viral de los HPVs aunque ocurre en sitios muy variados y sin un patrón característico, se ha encontrado en algunas líneas celulares y en tumores, insertado en la vecindad del oncogen Ha-ras (Dürst *et al.* 1987). El evento de la integración viral parece ser muy importante en la desregulación de la expresión viral. Lo anterior indica que la activación de este oncogen podría ser uno de los eventos celulares necesarios para la progresión hacia la malignidad en células con una infección latente por HPV.

HORMONAS ESTEROIDES Y LA EXPRESIÓN DE HPV

Los glucocorticoides son hormonas esteroideas que participan en una amplia variedad de procesos celulares como el desarrollo y la homeostasis; sus acciones son mediadas por un receptor específico. El mecanismo por el cual los esteroideos aumentan la expresión de sus genes blanco, entre los que se encuentra el promotor temprano P-97 del HPV-16, se inicia con la entrada de la hormona a la célula y su unión al receptor correspondiente (GR). En ausencia de la hormona, el GR monomérico está inactivo y asociado con dos proteínas de estrés calórico o heat-shock, de 90 y 70 kDa respectivamente. La unión del glucocorticoide disocia este complejo y el GR activo en forma dimérica se transloca al núcleo, en donde se une a su secuencia correspondiente en el DNA, incrementando la transcripción del gen blanco (Beato *et al.* 1989).

Algunos estudios *in vitro* han mostrado que las hormonas pueden tener un profundo efecto sobre los procesos de transformación mediados por HPV. Uno de los más interesantes ha mostrado que los glucocorticoides aumentan la transformación de células epiteliales humanas por el HPV y el oncogen ras

activado (Dürst *et al.* 1989). De hecho se ha demostrado que la transformación mediada por HPV-16 y ras puede ser inhibida por antagonistas de estas hormonas (Pater & Pater 1991). En la misma forma se ha mostrado que los glucocorticoides aumentan la transcripción de los oncogenes virales de HPV-16 (Gloss *et al.* 1987).

Además de la infección por HPV, algunos estudios epidemiológicos han permitido vislumbrar la posibilidad de que el estado hormonal de una persona infectada, como el cambio promovido por el uso de anticonceptivos o el asociado con embarazos múltiples (Hildesheim *et al.* 1990, Brinton *et al.* 1990), pudieran influir en la progresión de las lesiones asociadas con el HPV.

En el HPV-18 se ha identificado una secuencia actuando en *cis* en la LCR, que es similar al elemento de respuesta a glucocorticoides y que ha mostrado inducir la expresión temprana de este virus en respuesta a los glucocorticoides (Chan *et al.* 1989). Sin embargo, aunque existen numerosas evidencias asociando a las hormonas esteroides con los procesos de oncogénesis mediados por HPV-18, es necesario estudiar más el papel de estos elementos de respuesta y su interacción con los elementos AP-1 con el propósito de conocer mejor las posibles interrelaciones entre estos elementos y su resultado final sobre la transcripción de los oncogenes virales de HPV-18.

Por otra parte, se ha mostrado que algunas proteínas celulares son capaces de potenciar la activación mediada por los receptores de glucocorticoides y el receptor Ó de ácido retinoico. Entre estas se encuentra la proteína brahma o hbrm (en el caso de células humanas), la cual es un componente de un complejo proteico que modula la estructura de la cromatina. La proteína brahma presenta un dominio con actividad de helicasa, encontrado comúnmente en proteínas que participan en la descondensación de la cromatina durante la replicación del DNA, por lo que se supone que hbrm puede cooperar con los receptores a glucocorticoides para activar la transcripción, porque facilita la accesibilidad de estos receptores a zonas compactadas, sin ser de ningún modo esencial (Muchardt & Yaniv 1993).

Sin embargo, no se sabe si hbrm ejerce la misma modulación sobre el promotor viral de HPV-18, por lo que cabe la posibilidad de que brahma pudiera ser un factor celular determinante en el efecto que las hormonas esteroides pudieran tener sobre la transcripción temprana del HPV-18.

Es difícil determinar la contribución total de la infección del virus del papiloma en el desarrollo del cáncer cervical o algunos otros tipos de neoplasias relacionados con este agente. Hasta hoy, ninguno de los virus relacionados con el cáncer humano ha demostrado llevar directamente al desarrollo del cáncer. Como ya se ha descrito, es necesaria la alteración de proteínas específicas, que parecen realizar un control celular sobre la expresión irrestricta de los oncogenes

virales, por lo que es necesario determinar cómo es que todos estos factores interaccionan y la importancia que cada uno de ellos reviste en el desarrollo de la enfermedad.

Existen ya buenas razones para asumir que la eliminación de los HPVs como un factor de riesgo reducirían enormemente la incidencia de este cáncer ligado a la infección por HPV. Sin embargo esta solución preventiva suena casi a un sueño, si tomamos en cuenta que en nuestro país, muchas mujeres mueren a causa de la fase terminal de este tipo de cáncer, siendo que es posible un manejo adecuado de las pacientes cuando este tipo de neoplasias es diagnosticado a tiempo.

No debemos olvidar la necesidad de conocer más sobre la regulación que ejerce una célula sobre estos virus y las consecuencias de perderla. En este sentido, la investigación básica permitirá el conocimiento de los mecanismos celulares involucrados en el proceso de transformación con el fin de poder tener un control más adecuado de la enfermedad.

¡ LAS PREGUNTAS ...!

En vista del importante papel regulador que parecen tener algunos factores celulares sobre el control de la transcripción viral como ya se ha mencionado, muchos de los aspectos estudiados hasta hoy se han enfocado básicamente a caracterizar los factores celulares que pueden controlar en forma positiva o negativa la expresión de los oncogenes.

Del grupo de virus denominados de "alto riesgo", el más estudiado ha sido el HPV-16 seguido por el HPV-18. Ambos tipos virales contienen en general elementos de respuesta similares pero muestran algunas discrepancias en el número y aparentemente en los mecanismos de regulación a los que se encuentran sujetos.

Además de la infección por HPV, existen considerables evidencias experimentales, epidemiológicas y clínicas sobre el papel que las hormonas esteroides parecen jugar en el desarrollo del cáncer de cérvix.

En el caso del HPV-16, los glucocorticoides aumentan la transformación mediada por ras, de células epiteliales humanas inmortalizadas por este tipo viral.

Sin embargo, en el caso del HPV-18, aunque se ha reportado la existencia de un sitio presente en la región cercana al promotor P-105, no se ha terminado la caracterización de este elemento y existen algunas interrogantes sobre el papel regulatorio que ejercen los sitios GRE sobre la actividad transcripcional del promotor P-105. Tomando en cuenta estos antecedentes, nos planteamos las siguientes preguntas:

¿Existen otros sitios GRE adicionales en el HPV-18 que participen en el control de la transcripción viral?

¿Cuál es el efecto de alguna mutación en el sitio GRE sobre la actividad transcripcional del promotor viral P-105 de HPV-18?

¿Cuál es el efecto de expresar hbrm sobre la actividad transcripcional del HPV-18 mediada por GR?

Finalmente, ya que la región regulatoria de HPV-18 contiene tanto sitios AP-1, como elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), ¿es posible una interrelación entre estas dos vías en el control de la transcripción del HPV?

Por otra parte, tomando en cuenta el papel determinante que parece jugar el oncogen ras en la capacidad de transformación celular mediada por HPV-18, y

las evidencias que sugieren la importancia de la fosforilación en la regulación de la expresión viral, nos hemos planteado las siguientes preguntas:

¿Es posible que la activación del gen Ha-ras pudiera participar en la regulación de la transcripción temprana de HPV-18?

Ya que ras ha mostrado aumentar la transcripción de promotores dependientes de los sitios AP-1 y tomando en cuenta que la LCR de HPV-18 contiene dos de estos elementos, ¿es posible que ras module la transcripción temprana de HPV a través de estos sitios?

En el caso del HPV-16 se ha observado que la inactivación de la PP2A utilizando OA, incrementa la transcripción del promotor temprano P-97. Tomando en cuenta que este virus está sujeto a una regulación muy similar a la observada en HPV-18. Cual es el efecto de este agente sobre la actividad del P-105 de HPV-18?

En la misma forma resulta interesante determinar si el efecto de OA es mediado por los sitios AP-1 presentes en la LCR de HPV-18.

Asumiendo que la PP2A pudiera interactuar con la vía de Ras, desfosforilando los sustratos de esta vía, la inactivación de esta proteína llevaría a un incremento en los sustratos fosforilados por Ras, ¿cuál sería el efecto de activar Ras e inactivar a la PP2A?

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los GRE de HPV-18 y su interrelación con los sitios AP-1 en el HPV-18.

Establecer posibles mecanismos moleculares involucrados en la cooperación entre el oncogen Ha-ras y el HPV-18, en la transformación de células epiteliales humanas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la participación de los elementos de respuesta a glucocorticoides en la respuesta hormonal del promotor P-105 de HPV-18 y su interacción con los sitios de unión a los factores AP-1.

Establecer si el oncogen Ha-ras modula la expresión de los oncogenes de HPV-18, a través de los sitios AP-1 presentes en la región de control del papilomavirus.

Determinar la posible participación de la PP2A y su cooperación con el oncogen Ha-ras en la regulación del HPV-18.

RESULTADOS

RESULTADOS

Los resultados se presentan en forma de dos manuscritos.

ARTICULO 1.

A SINGLE ELEMENT MEDIATES GLUCOCORTICOID HORMONE RESPONSE OF HPV 18 WITH NO FUNCTIONAL INTERACTIONS WITH AP1 OR HBRM.

Este artículo incluye el análisis de la participación de un segundo sitio de respuesta a glucocorticoides, el cual no parece contribuir en la respuesta que presenta el promotor P-105 a hormonas esteroides, a pesar de que los dos GREs de HPV-18 presentan sinergismo fuera del contexto del promotor. En la misma forma, se caracteriza que el sitio GRE de HPV-18 se une eficientemente al receptor de glucocorticoides purificado, producido en bacteria. Por otra parte, se analiza la cooperación del gen hbrm con el GR sobre la actividad transcripcional del HPV-18. Finalmente, se describe la ausencia de alguna interacción funcional obvia entre estos sitios y los AP-1 presentes en la región activadora de este promotor.

ARTICULO 2.

TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 18 E6 AND E7 ONCOGENES BY ACTIVATED RAS AND INHIBITION OF PROTEIN PHOSPHATASE 2A

Incluye el análisis de la expresión exógena de las versiones normal y mutada de los genes Ha-ras sobre la actividad del promotor P-105. En la misma forma se caracteriza el efecto de la inhibición de la PP2A (por tratamiento con OA) y su cooperación con Ha-Ras. Finalmente, se muestra el efecto que tiene la sobre-expresión de Ha-Ras en la línea celular HeLa, derivada de un carcinoma cervical y positiva para HPV-18.

A SINGLE ELEMENT MEDIATES GLUCOCORTICOID HORMONE RESPONSE OF HPV18 WITH NO
FUNCTIONAL INTERACTIONS WITH AP1 OR HBRM.

Running title : control of HPV18 transcription by glucocorticoid hormone.

Olga Medina-Martinez¹, Néstor Morales-Peza¹, Moshe Yaniv³, Alejandro Garfía-Carrancá^{1,2},
and Françoise Thierry^{3*}

¹Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM,
²División de Investigación Básica, INCan-SS., México, D.F., MEXICO, and ³Unité des Virus
Oncogènes, CNRS URA 1644. Departement des Biotechnologies, Institut Pasteur, Paris,
FRANCE.

* To whom correspondence should be addressed.

Tel : 33-1-45 68 85 26

Fax : 33-1-45 68 87 90

We determined that the HPV18 regulatory region contains one functional GRE sequence that interacts with the glucocorticoid receptor. This sequence conferred a moderate hormonal activation to the HPV18 P105 promoter. Two modulators of glucocorticoid hormone activity, AP1 and hbrm, both involved in P105 transcription, were found not to interfere with this hormonal activation

The human papillomavirus type 18 (HPV18) has been found to be associated with the etiology of cervical carcinomas, along with few other viral types forming the so-called "high risk" group. Members of this group have been shown to express two transforming proteins, E6 which interacts with p53 and induces its degradation and E7 which interacts with the product of the cellular Rb tumor suppressor gene (1, 2). Transcription of these two oncogenes is apparently tightly regulated by a complex array of cellular and viral proteins. This regulation may be modified by integration of the viral genome, an event frequently occurring during carcinogenic progression. The pattern of integration has been shown to be conserved, keeping intact a genomic fragment containing the whole regulatory region and the E6 and E7 genes, with a specific interruption in the downstream E1 and/or E2 ORFs (3, 4). In the free or integrated genomic form, transcription of the viral oncogenes is under the control of numerous cellular factors, among which, steroid hormones receptors. Epidemiological studies have raised the possibility that the hormonal status of the infected person, such as pregnancy, may influence the development of HPV-associated lesions (5).

Sequences resembling glucocorticoid hormone receptor response elements (GREs) have been identified in the regulatory regions of HPVs associated with genital lesions (6). The HPV16 genome has been shown to contain such an element in its transcriptional enhancer (7). In the HPV18 genome, the cell-type specific enhancer has been shown to contain responsive elements for numerous cellular factors including AP1 (8), NF1/CTF and KRF/Oct (9). Additional binding sites for transcription factors are present more proximal to the promoter initiation site, including Sp1 (10, 11), YY1 (12), AP1 and an Oct related site (13). In addition this region also contains binding sites for the viral E2 transcriptional regulator as well as the

origin of viral DNA replication. The E2 binding site most proximal to the promoter TATA box has been shown to mediate repression of the E6/E7 promoter activity by E2 (11, 14), while the three E2 binding sites are crucial for viral DNA replication (15). It should be noted that this region of approximately 200 nt, is devoid of any intrinsic transcriptional activity in the absence of its transcriptional enhancer (13). Within this proximal region, we found by computer search two putative GRE elements, one at position 7756 containing 7 out of 12 conserved residues with regard to the consensus GRE sequence (CCAACA N3 TGTCTA) and a second one at position 7839 containing 9 out of 12 conserved residues (AGCACA N3 TATACT). The existence of two potential sites might be correlated with the bimodal glucocorticoid activation of the LCR of HPV18 linked to the lacZ gene in transgenic mice (16). Analysis by mutagenesis of PCR amplified DNA containing the two putative GRE sites indicated that only the GRE element at position 7839 is hormone responsive (data not shown). Contrary to numerous hormone responsive promoters where synergistic activation between at least two hormone responsive elements occurs (17), the HPV18 P105 promoter thus appears to respond only to a single GRE element. This element, present at position 7839 has been previously mentioned (6, 10).

We further examined whether this GRE sequence could cooperate to increase the hormonal response when multimerized. We synthesized oligonucleotides containing either this HPV18 GRE sequence : (AGCACA N3 TATACT) or a consensus GRE sequence (AGAACA N3 TGTCT), and cloned either one or two copies of them in front of the minimal thymidine kinase (tk) promoter. As shown in Figure 1 panel A, both sequences mediated efficient glucocorticoid receptor (GR) dependent activation of the tk promoter. In addition, both sequences increased the hormonal response when duplicated, although the HPV18 sequence was less efficient than the consensus GRE.

To further compare the activity of the HPV18 GRE with the consensus sequence, both oligonucleotides were used in gel shift assays with a purified GR protein produced in bacteria. Both sequences were bound by the purified GR, however the consensus sequence with a higher efficiency, as shown in direct binding assays in Figure 1 panel B (compare lanes b, GR binding to the HPV18 GRE with lanes d and g, GR binding to the consensus GRE). In competition experiments, with excess unlabelled oligonucleotides, both the GREc and GRE18 sequences

competed for the binding of GR to the consensus sequence (Figure 1 panel B, lanes c to i). In contrast, a mutated oligonucleotide containing a base change in one of the conserved nucleotides of the HPV18 GRE element (AGCAAA N₃ TATACT), was neither bound by the purified GR (Figure 1, panel B, lane a), nor did it compete for GR binding (data not shown).

We next examined whether the P₁₀₅/CAT plasmid, containing the entire regulatory region cloned upstream of the CAT gene (18), could be activated by cotransfection with a constitutively expressed wild type or mutated GR in C33 cells. As shown in Figure 2A, we detected a weak but reproducible transcriptional activation. It should be noted that control experiments (not shown) with highly responsive regulatory regions such as the MMTV promoter showed a very high hormonal activation (30 to 50 fold) in similar conditions. It therefore indicated the presence of high concentrations of endogenous GR upon transfection of the expression plasmid. In order to confirm that the site that we identified by in vitro binding was indeed responsible for this activation of transcription in the context of the whole HPV18 long control region, we introduced the point mutation within the GRE sequence that was shown to abolish GR binding in vitro (Figure 1 panel B, lane a). We found that this mutation decreased the promoter basal level and when cotransfected with the constitutive GR, its transcription was further repressed (Figure 2A). This result unambiguously indicated that the activation observed with the wild-type sequence was due to the presence of an intact GRE sequence. The unusual effect of the point mutation raises the possibility that another cellular factor might bind to this site and cooperate with the glucocorticoid receptor. However, gel shift assays with nuclear extracts failed, until now, to detect such a protein (results not shown). When the levels of both mutated and wild-type P₁₀₅ transcription were compared in the presence of cotransfected GR, the wild-type sequence was tenfold more active than the mutated one (compare the two grey columns in Figure 2, panel A). Direct activation of HPV18 transcription by glucocorticoids could also be observed in HeLa cells, which contain endogenous receptors. A transfected HPV18 P₁₀₅ wild type/CAT plasmid was activated 2 to 3 fold in different experiments by dexamethasone treatment, but not the one containing a mutated GRE sequence (Figure 2 panel B). In contrast, we could not detect hormonal activation of the P₁₀₅ promoter in the mammary

tumor cell line MCF7 which expresses high level of endogenous receptors, but does not support basal P₁₀₅ transcription (data not shown).

Our experiments indicated that a single point mutation in the GRE sequence is sufficient to abolish the glucocorticoid responsiveness of the HPV18 P₁₀₅ promoter. In addition, we have also shown that the single or multimerized GRE sequence of HPV18 can efficiently confer glucocorticoid responsiveness to a minimal promoter. The single point mutation that we have introduced in this GRE (A to C) led to a decrease in the basal activity of the P₁₀₅ promoter. This is in contrast with a double point mutation (AA to GG) introduced in the same element by Butz and Hoppe-Seyler (1993) that led to increased basal activity of this promoter (10). Opposite effects of different GRE mutants could be due to different sequence changes that would affect other regulatory elements located in close proximity, such as a YY1 element located just few bases from the GRE. Another possibility is that endogenous hormonal receptors could interact with this sequence in the absence of transfected GR, and modulate the basal P₁₀₅ activity.

The weak hormonal activation of P₁₀₅ (two to three fold) could result from a putative negative interference of the receptor with AP1, an essential element of the promoter (8), since it is well documented that a complex cross-talk exists between glucocorticoid hormone receptor and the AP1 complex (19, 20). In several cases they antagonize each other while in others they cooperate in transcriptional activation. Since the HPV18 regulatory region contains two AP1 responsive sites and a GRE, we investigated whether these elements interfere or synergize with each other. In agreement with previous results, single or double AP1 mutations in the P₁₀₅ promoter decreased its activity, however all mutants were still activated roughly two fold by glucocorticoid receptor, as observed for the wild-type promoter (Figure 3). These experiments demonstrate that AP1 dependent activation of P₁₀₅ did not imply any obvious negative or positive interference with the hormonal activation. In the converse experiment, GR repressed transcription of a promoter mutated in its GRE (Figure 2, panel A), still raising the possibility that excess GR in the absence of its target DNA sequence, can repress the AP1 activity. The concomitant presence of TREs and GRE in a regulatory region can constitute "composite elements" as in the proliferin gene for instance (21). Regulation of these composite elements led to either activation or repression. Our results indicate that the TRE and GRE of HPV18 do not

constitute composite elements since both sequences are located far from each other, and seem to be regulated independently.

Another explanation for the weak hormonal activation of the HPV18 transcription could be that full activation requires other cellular factor(s). The cellular hbrn protein, a constituent of a complex that modulates chromatin structure, could represent such a candidate since it has been shown to potentiate GR activation (22). We therefore investigated the putative involvement of hbrn in the GR-mediated activation of HPV18 transcription. Cotransfection of a Cytomegalovirus promoter (CMV) hbrn expression plasmid with the P₁₀₅ Cat plasmid in C33 cell line (which do not express endogenous hbrn) produced a dose dependent activation of transcription of the P₁₀₅ promoter (up to 4-fold), as shown in Figure 4. Cotransfected GR further increased this activation, although not in a cooperative manner, at any concentration of hbrn plasmid used in the experiment. Hbrn activation of P₁₀₅ therefore appeared independent from hormonal activation through binding to the HPV18 GRE element since the GRE mutated HPV18 LCR was also activated by hbrn (data not shown). In HeLa cells, that contain endogenous hbrn (22), we did not detect P₁₀₅ activation by increasing its levels with cotransfected hbrn (not shown). In addition, the fact that the hormonal activation reported above in HeLa cells (Figure 2 panel B) was rather weak indicated that there is no obvious cooperation between the transfected GR and the endogenous hbrn. We can conclude from these experiments that the activation of P₁₀₅ by hbrn is not mediated through the hormonal receptor but through other regulatory factor(s) yet to be determined.

We failed to demonstrate in the present study any positive or negative interactions between the GR and other cellular factor(s) in regulating the HPV18 P₁₀₅ transcriptional activity, even though GR has been shown to synergize with many cellular transcription factors in other systems (17, 22, 23). These results raise the question of the exact role of the hormonal regulation in the context of HPV18, although it has been shown that glucocorticoid activates HPV18 transforming genes in HeLa cells (25). We believe that a complex interplay can still exist in vivo between regulatory pathways in which a key element may be the cell specificity. We and others have shown that the HPV early promoters are strictly epitheliotropic and are controlled by a complex array of cellular factors. Among these, the composition of the AP1

factor may be of relevant importance since it has been suggested that specific AP1 combinations are regulated differently by steroid hormones (24, 26). Interestingly, TPA or glucocorticoid hormones are potent modulators of cell proliferation and differentiation. Their potential antagonistic roles in controlling epithelial differentiation may be of extreme importance in the HPV regulation since viral expression tightly depends on the keratinocyte differentiation. In conclusion, modulations by GR/AP1 interactions might involve very complex cell/virus relationship in this specific example.

Acknowledgements:

This work was made possible by a French-Mexican exchange program, between CNRS - CONACYT. We thank B. Bourachot and C. Muchardt for the gift of purified bacterial GR and for the gift of the CMV hbrm expression plasmid. R. Ovseiovich for participating in the generation of the GRE mutant, F. Arnos for technical help, and Christian Desaintes for critical reading of the manuscript. This work was supported in part by grants from CONACYT (1705M9209), and the Miguel Alemán Foundation, the ARC, the LNFCC.

Figure Legends:

Figure 1

A : Activation of GRE tk CAT by the glucocorticoid hormone receptor.

0.5 ug of tk-CAT expression plasmids were cotransfected with 50 ng of either the mutant glucocorticoid receptor (GRm) (black bars) or the wild type GR (grey bars) expression plasmids in C33 cells by the standard calcium phosphate coprecipitation method (27). The constitutive GR and its mutated version were expressed under a CMV promoter, as previously described (28). CAT assays were done 40 hours post transfection, results given are the mean of at least 3 experiments that were standardized with the use of a cotransfected B-Galactosidase reporter plasmid in each plate, error bars are the calculated standard deviations.

B : Binding of purified GR to wild type and mutated GRE sequences.

Purified glucocorticoid hormone receptor obtained from bacterial extracts was used for binding assays with end labelled probes by Klenow filling. Probes contain either wild type (GRE18): AGCACA N3 TATACT or mutated : AGCAAA N3 TATACT sequences from HPV18 or a consensus GRE sequence (GREc) : AGAACA N3 TGTTCT. Binding assays were performed under standard conditions, in the absence of non-specific competitor DNA. Briefly, proteins were incubated with the labelled probes in the presence of 12 mM Hepes (pH 7,9), 0,5 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 60 mM KCl and 20 mM spermidine. Competitions were done on a GREc labelled probe with excess unlabelled oligonucleotides containing the HPV18 or consensus GRE sequences using increasing molar excess as indicated at the top of each lane.

Figure 2. Hormonal regulation of HPV18 P₁₀₅/CAT construct containing either a wild type or mutated GRE.

A : C33 cells were cotransfected with 2 µg of the HPV18 P₁₀₅/CAT plasmids and 50 ng of either GR (grey bars) or mutated GR (white bars) expression plasmids by the standard calcium phosphate cotransfection method (27). The wild type plasmid, P₁₀₅-wt, has been described (8), and P₁₀₅-GREm contains a single-base pair mutation in the GRE, as described in the text

and in the legend of Figure 1. CAT assays were done 40 hrs after transfection. The values given represent the mean of at least three independent transfection experiments.

B : HeLa cells were transfected with either the wild type P₁₀₅ promoter in front of CAT (•), or with the one containing the single GRE mutation (o). Cells were treated during 24 hours with different molar concentrations of dexamethasone, as indicated. Cell extracts and CAT assays were done 40 hours after transfection. Each point is the average of three independent transfection experiments

Figure 3. Transcriptional activation by the glucocorticoid hormone receptor of HPV18 P₁₀₅ promoters mutated in AP1 binding sites.

The HPV18 P₁₀₅/CAT plasmids, either wt or mutated in either one or both AP1 binding sites (8), are schematically represented at the bottom of the Figure (crossed triangles indicate mutated AP1 binding sites). 2µg of each plasmid were cotransfected with 50 ng of GR (grey bars) or GR-mutated (white bars) expression plasmids in C33 cells, as described in Figure 2.

Figure 4. Transcriptional activation by hbrm of the HPV18 P₁₀₅/CAT plasmid.

2µg of wt P₁₀₅/CAT plasmid were cotransfected with 50ng of the GRm or GR expression plasmids in the presence of variable amounts (between 0 and 1µg) of the hbrm expression plasmid in C33 cells. Transfections were done as indicated in the legend of Figure 2. Values plotted on the curves are the result of a typical transfection experiment.

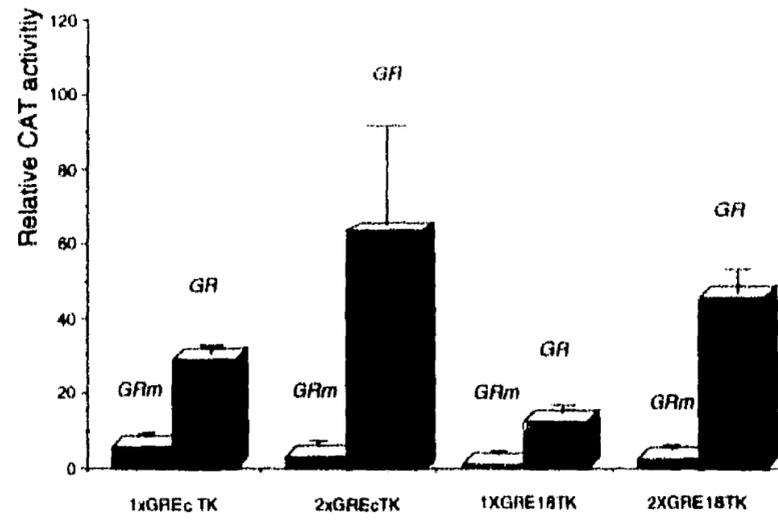
REFERENCES

1. Werness, B. A., Levine, A. J. and Howley, P. M. *Science.*, **248**, 76-79 (1990).
2. Dyson, N., Howley, P. M., Münger K. and Harlow, E. *Science.*, **243**, 934-937 (1989).
3. Schwarz, E., Freese, U.K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stemmlau, A. and zur Hausen, H. *Nature.*, **314**, 111-114 (1985) .

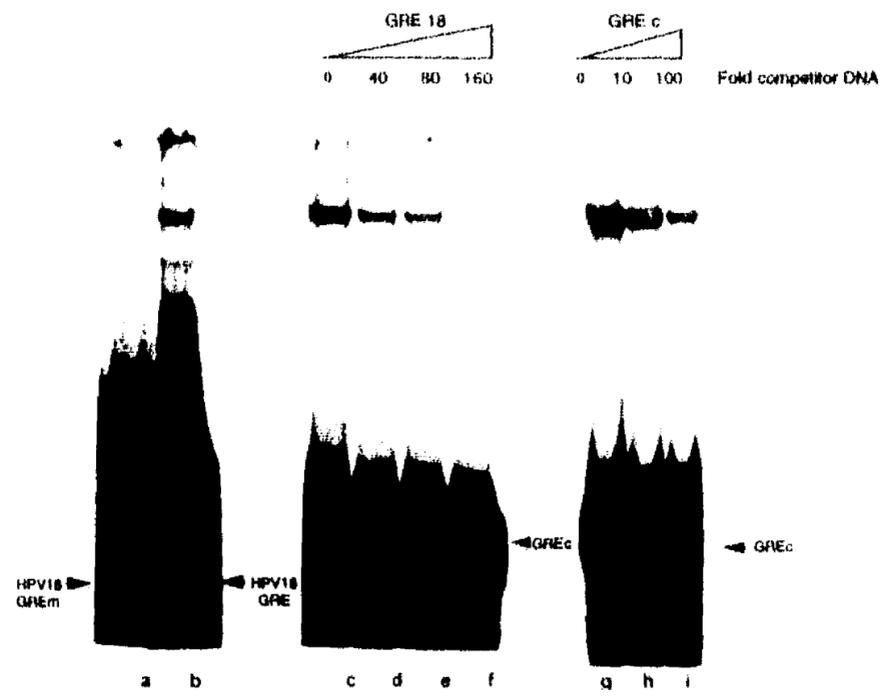
4. Berumen, J., Casas, L., Segura, E., Amezcua, J., and Garcia-Carranca, A. *Int. J. Cancer.*, **56**, 640-645 (1994).
5. Schneider, A., Hotz, M. and Gissmann, L. *Int. J. Cancer.*, **40**, 198-201 (1987).
6. Chan, W. K., Klock, G. and Bernard, H. U. *J. Virol.*, **63**, 3261-3269 (1989).
7. Gloss, B., Bernard, H. U., Seedorf, K. and Klock, G. *EMBO J.*, **6**, 3735-3743 (1987).
8. Thierry, F., Spyrou, G., Yaniv, M. and Howley, P. M. *J. Virol.*, **66**, 3740-3748 (1992).
9. Mack, D. H. and Lamins, L. A. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **88**, 9102-9106 (1991).
10. Butz, K. and Hoppe-Seyler, F. *J. Virol.*, **67**, 6476-6486 (1993).
11. Demeret, C., Yaniv, M. and Thierry, F. *J. Virol.*, **68**, 7075-7082 (1994).
12. Bauknecht, T., Angel, P., Royer, H. D and zur Hausen, H. *EMBO J.*, **11**, 4607-4617 (1992).
13. Garcia-Carranca, A., Thierry, F. and Yaniv, M. *J. Virol.*, **62**, 4321-4330 (1988).
14. Thierry, F. and Howley, P. M. *New Biol.*, **3**, 90-100 (1991).
15. Remm, M., Brain, R. and Jenkins, J. R. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 6015-6021 (1992).
16. Cid, A., Auewarakul, P., Garcia-Carranca, A., Ovseiovich, R., Gaissert, H. and Gissmann, L. *J. Virol.*, **67**, 6742-52 (1993).
17. Schüle, R., Muller, M., Kaltschmidt, C. and Renkawitz, R. *Science.*, **242**, 1418-1420 (1988).
18. Thierry, F. and Yaniv, M. *EMBO J.*, **6**, 3391-3397 (1987).
19. Schüle, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I.M. and Evans, R.M. *Cell*, **62**, 1217-1226 (1990).
20. Yang-Yen, H.F., Chambard, J. C., Sun, Y.L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J. and Karin, M. *Cell*, **62**, 1205-1215 (1990).
21. Mordacq, J. and Linzer, D. *Genes and Dev.*, **3**, 760-769 (1989).
22. Muchardt, C. and Yaniv, M. *EMBO J.*, **12**, 4279-4290 (1993).
23. Strähle, U., Schmid, W. and Schütz, G. *EMBO J.*, **71**, 3389-3395 (1988).
24. Miner, J. N. and Yamamoto, K. K. *Genes and Dev.*, **6**, 2491-2501 (1992).

25. von Knebel-Doeberitz, M., Bauknecht, T., Bartsh, D., and zur Hausen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1411-1415 (1991).
26. Diamond, M. I., Miner, J. N., Yoshinaga, S. K. and Yamamoto, K. R. *Science.*, **240**, 1266-1272 (1990).
27. Wigler, M.S., Silverstein, S., Lee, L.S., Pellicer, A., Cheng, Y. and Axel, R. *Cell.*, **11**, 23-32 (1977).
28. Gauthier, J. M., Dostatni, N., Lusky, M. and Yaniv, M. *New Biol.*, **3**, 498-509 (1991).

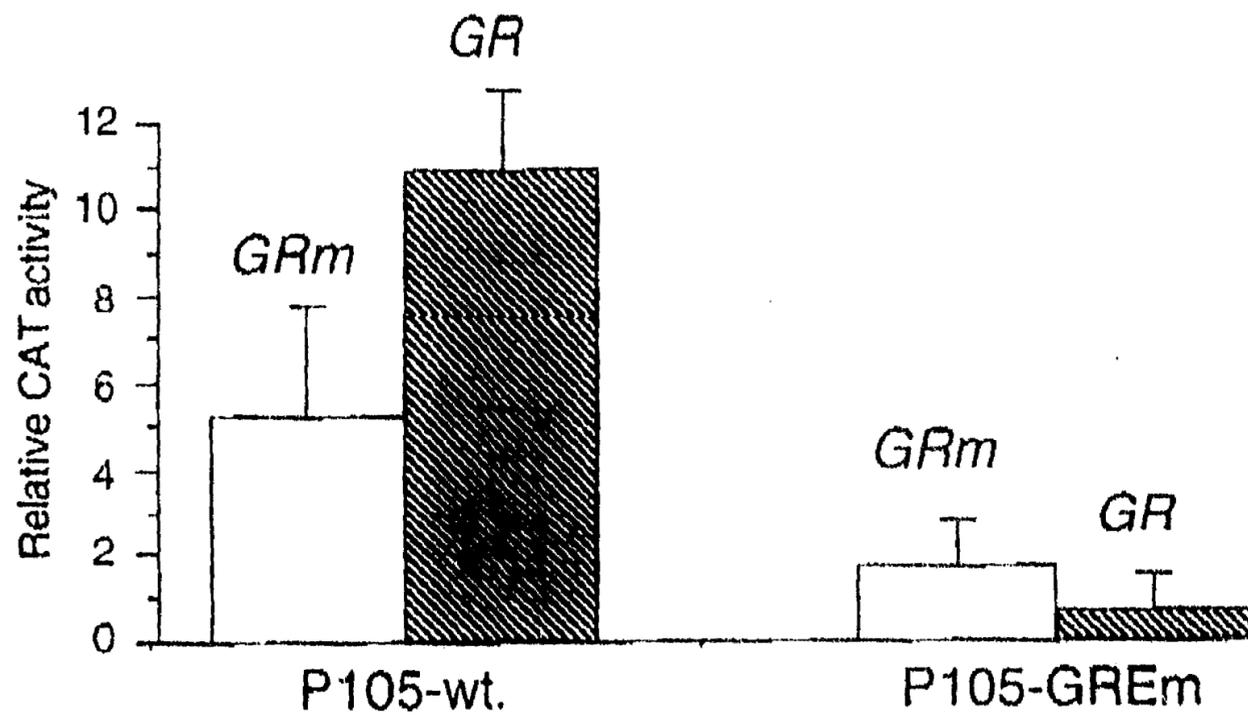
A



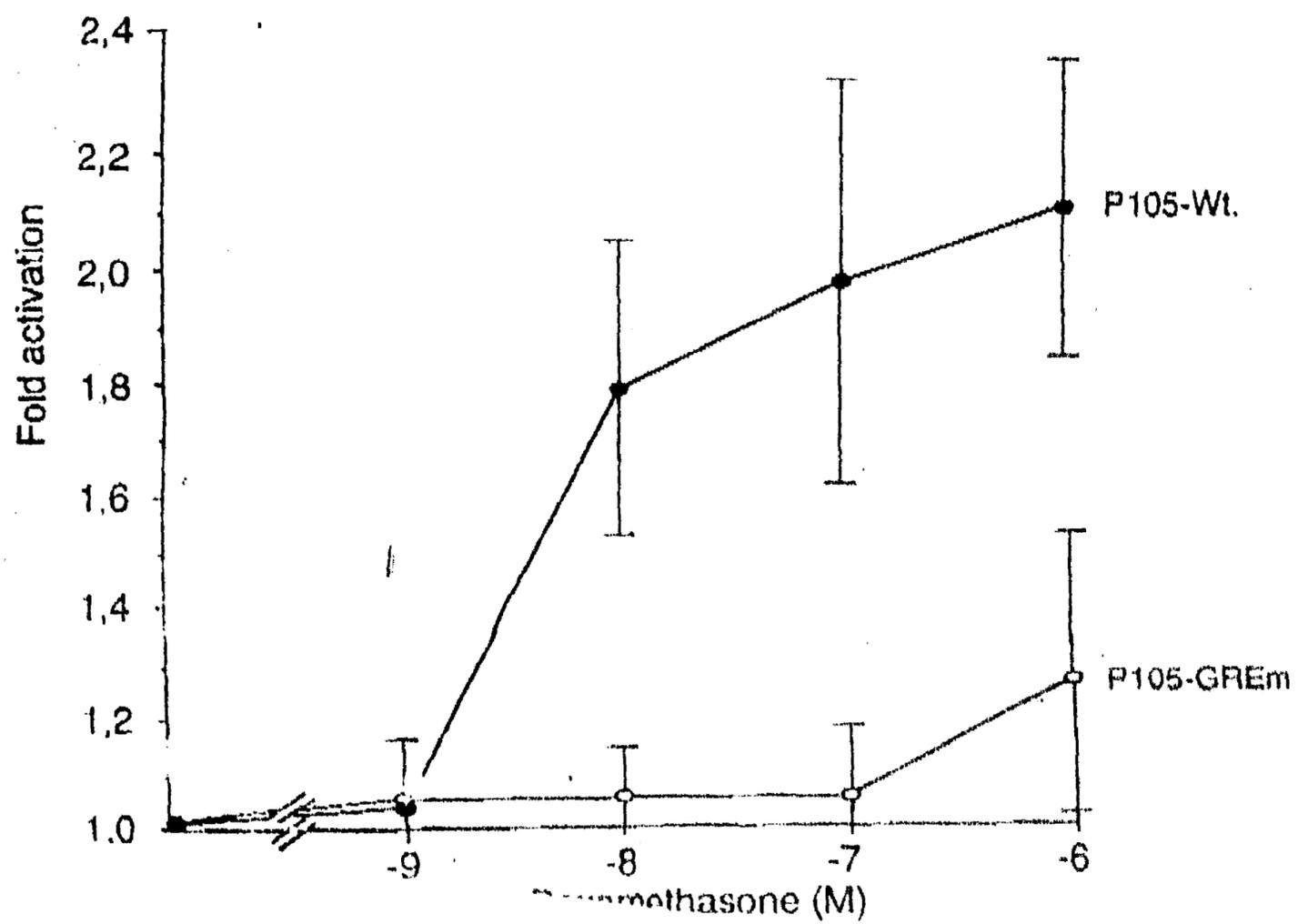
B

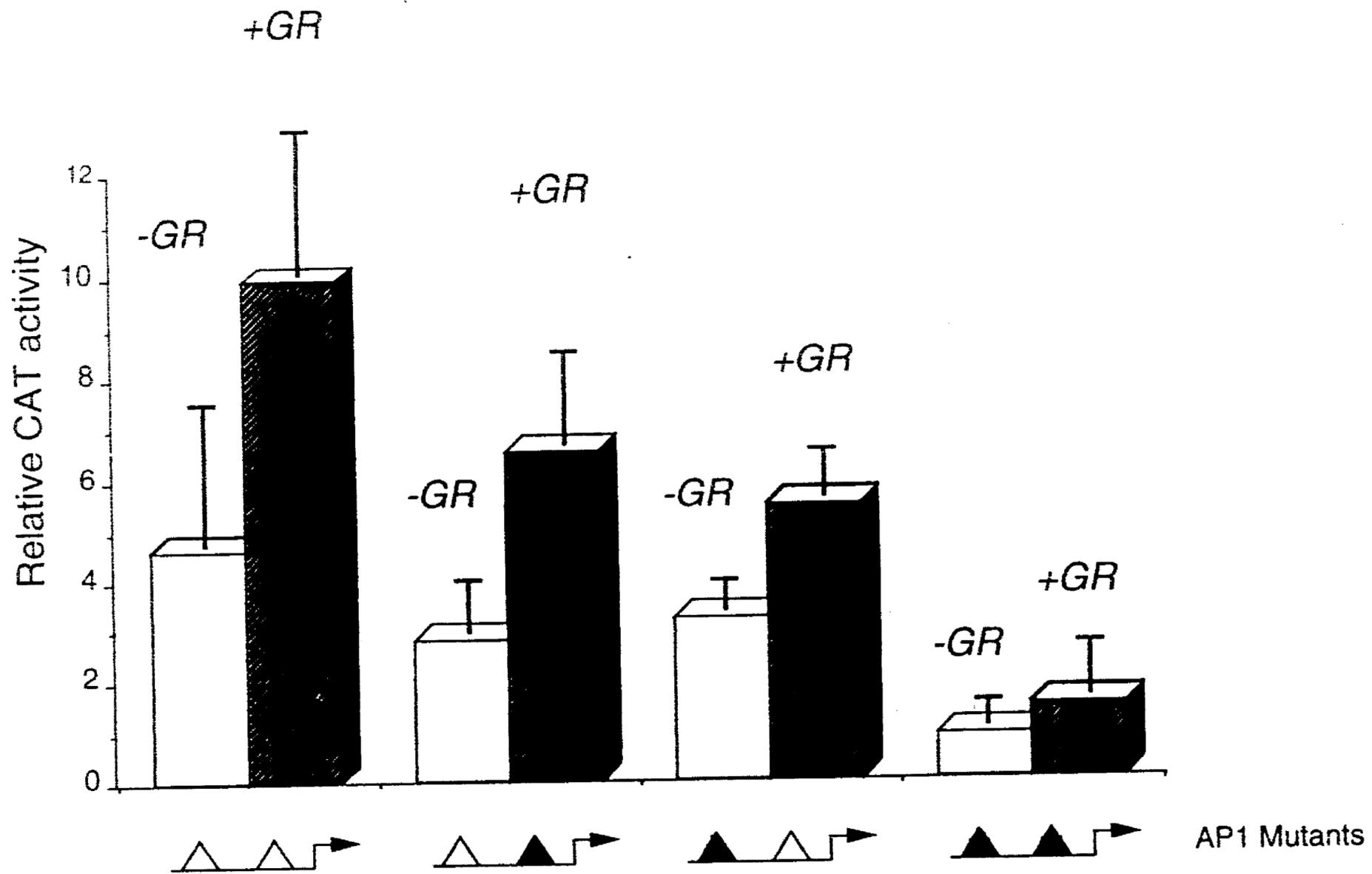


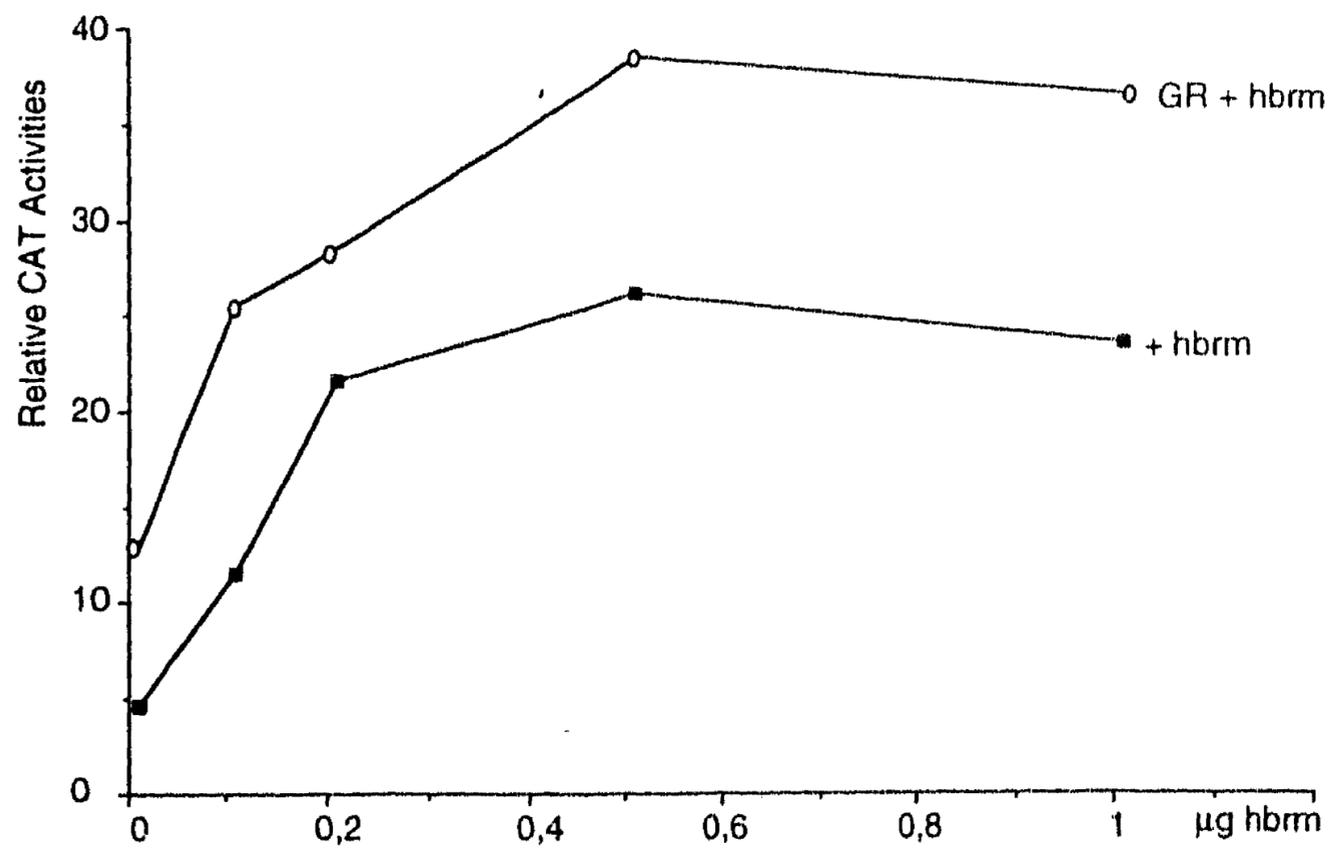
A : C33 Cells



B : HeLa cells







GR 50ng \ hbrm 1μg	-	+
-	1	4,8 (sd 2)
+	3 (sd 1,6)	7,9 (sd 4,3)

Transcriptional activation of human papillomavirus type 18 E6 and E7 oncogenes by activated Ras and inhibition of protein phosphatase 2A.

Olga Medina-Martínez¹, Verónica Vallejo¹ & Alejandro García-Carranca^{1,2}

¹Department of Molecular Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico City

²Division of Basic Research, Instituto Nacional de Cancerología, SS, Av. San Fernando 22, 07000 Mexico City, MEXICO

Correspondence:

Dr. Alejandro García-Carranca
Department of Molecular Biology,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Apartado Postal 70-228
04510 Mexico City

TEL: (52-5) 616 1602 & 622 3891

FAX: (52-5) 622 3891 & 550 0047

email: carranca@servidor.unam.mx

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) E6 and E7 oncogenes are known to cooperate with activated *ras* genes to fully transform epithelial cells. Transcription of HPV type 18 oncogenes is modulated by a complex array of viral and cellular factors, including AP-1. Since Ha-ras and protein phosphatases have been shown to modulate AP-1 activity, we investigated their effect on the transcriptional activity of P105, the HPV18 promoter controlling E6 and E7 expression. We found that while activated Ras, and inhibition of protein phosphatase 2A, induced the transcriptional activity of the viral promoter, the normal gene had a minimal effect. On the contrary, transfection of normal H-ras and simultaneous inhibition of protein phosphatase 2A resulted in a cooperative transactivation. The AP-1 binding sites present in the viral promoter were responsible for the observed effects, and conferred transcriptional induction to a minimal promoter. Furthermore, HeLa cells permanently expressing Ha-ras oncogene, or high levels of the normal allele, exhibited a 2-3-fold increase in the levels of specific E6*E7/E1, and E6*E7 transcripts. We propose that Ras and PP2A control HPV oncogene expression through modulation of AP-1 activity and suggest that increased levels of E6 and E7, resulting from the simultaneous presence of HPV and ras oncogenes could explain their cooperation in transforming human cells.

INTRODUCTION

Human papillomavirus infections usually result in production of benign lesions of the skin and mucosae, with a low proportion of those from the ano-genital mucosae eventually progressing into malignant tumors (zur Hausen & Schneider, 1987). Although more than 25 different HPV subtypes have been specifically associated with lesions from the ano-genital region, only few of them have been implicated with the development of cervical cancer. Among others, HPV-18 belongs to the so-called "high risk group" (Lowy *et al.*, 1994).

The viral genome harbors two oncogenes (E6 and E7) which possess immortalizing potential *in vitro*, that are required for maintenance of a malignant phenotype (Pirisi *et al.*, 1987; Bedell *et al.*, 1989). Although these oncogenes are necessary and sufficient to immortalize primary cells, *ras* oncogenes are required to fully transform them (Matlashewski *et al.*, 1987). Accumulating evidence has indicated how E6 and E7 oncogenes might immortalize human cells. Whereas the E7 oncoprotein binds the P105 retinoblastoma protein (Rb) and inactivates it, E6 binds the p53 protein and promotes its degradation ((Dyson *et al.*, 1989; Scheffner *et al.*, 1990). Since Rb and p53 are critical regulators of the cell cycle, inactivation by E6/E7 is thought to interfere with cell cycle control.

Transcription of E6 and E7 is controlled by the major early promoter, located in the so-called upstream regulatory region (URR), or long control region (LCR), with a complex array of cellular and viral proteins known to regulate its function. In the case of HPV18, the P105 promoter contains binding sites for numerous transcription factors including SP-1, NF- κ B, KRF-1, Oct1, and AP1 (Gloss and Bernard, 1990; García Carrancá *et al.*, 1988; Mack and Laimins, 1991; Hoppe Seyler *et al.*, 1991; Offord & Beard, 1990). Previous work has

indicated that the two AP-1 sites contained in this promoter, play a central role in modulating its transcriptional activity (Thierry *et al.*, 1992) .

The Ras proteins (Ha, Ki and N) belong to the superfamily of small GTP-binding proteins that function as molecular switches by cycling between an active GTP-bound form, and an inactive GDP-bound state. Recent studies have provided evidences indicating that Ha-ras transduces signals from the exterior of the cells to the nucleus, through activation of a conserved cascade of kinases, including raf, MEK and ERK (Kyriakis *et al.*, 1994). Once activated, this cascade results, among others, in phosphorylation of certain AP-1 transcription factors. Indeed, expression of *ras* oncogenes causes a marked increase in the transcriptional activity of promoters containing AP-1 responsive elements, apparently by increasing phosphorylation of c-jun (Binetruy *et al.*, 1991).

In a similar way, events mediated by protein phosphatases have been shown to modulate the activity of AP-1 transcription factors (Schontal *et al.*, 1991). Okadaic acid (OA) has been shown to be a specific inhibitor of two major types of protein phosphatases; PP1A and PP2A (Alexander, 1990). Recently, it has been reported that inhibition of PP2A activity results in transactivation of the HPV-16 promoter (Smits *et al.*, 1992).

Since *ras* oncogenes affect gene expression through AP1 sites, and because HPV types most commonly associated with carcinomas have been shown to cooperate with these oncogenes to fully transform primary cells, it was of particular interest to elucidate the role of *ras* oncogenes in the control of HPV18 E6 and E7 expression.

In this report we show that normal and activated Ha-ras genes, as well as inhibition of PP2A by OA, can stimulate the transcriptional activity of the P105 promoter. We found that

this activation is dependent on the integrity of the AP-1 binding sites present in this promoter. Furthermore, we found that the HPV-18 AP-1 sequences cloned in front of CAT could efficiently respond to OA and Ha-ras, and that c-jun is the major contributor to these effects. In support of these observations we have been able to show that HeLa cells anomalously expressing Ha-ras exhibit a dramatic increase in the levels of E6 and E7 mRNA.

Our data support the notion that Ha-ras participates in the control of HPV-18 E6 and E7 expression, by increasing the activity of specific AP-1 binding proteins. Moreover, we present evidence that PP2A might be involved in the regulation of the activity of transcription factors modulated by Ha-ras, thus contributing to the transcriptional activity of the P105 promoter.

Material and Methods

Plasmids

Plasmids containing the entire long control region (LCR) of HPV18, either wt (P105) or with mutated AP1 binding sites have been described before (Thierry *et al.*, 1992). These plasmids and the one containing five copies of the HPV18 AP1 sequences (5'-TGACTAA-3'), cloned upstream of the tk promoter were a generous gift from Dr. F. Thierry.

Plasmid pEJ, which carries the Ha-ras oncogene from the EJ/T24 human bladder carcinoma cell line, and plasmid pEC with its normal counterpart, both cloned as 6.6 Kb BamHI fragments in pBR 322, were kindly provided by Dr. E. Chang (Tabin *et al.*, 1982).

Different Jun expression plasmids have been previously described (Hirai *et al.*, 1990). Plasmid PK5 contains five copies of the consensus AP1 sequence (5'-TGACTCA-3') cloned in front of the tk promoter (Piette *et al.*, 1986).

Cell cultures

C-33 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium containing either 2% or 7% fetal bovine serum, and transfected with different quantities of reporter plasmids, as indicated in Figure legends. Stable clones of HeLa cells expressing either normal or activated versions of human c-Ha-ras together with a neomycin resistance gene were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% neonatal serum, as recently described (Miranda *et al.*, 1995).

Transfections and CAT assay

C33 cells were transfected by the standard calcium phosphate co-precipitation method in 60 mm Petri dishes (Wigler *et al.*, 1977). For cotransfections, usually 2 μ g of reporter plasmids and 5 μ g of plasmids containing ras genes were used, unless indicated. In some cases cells were treated for 6 hours with 100nM Okadaic acid, 16 hours after transfection. Cells were harvested 48 hours after transfection, lysed with five cycles of freeze-thawing, and extracts cleared by centrifugation. CAT assay were performed using uniform amounts of protein extract, as measured by Bradford (Bradford, 1976). Relative CAT activities were calculated from values determined by scintillation counting of corresponding spots, after TLC and autoradiography.

Nothern blot analysis

HeLa cell stable clones were used to prepare mRNA by guanidinium thiocyanate-N-laurylsarcosyl precipitation method and poly(A) fraction selected by oligo(dt) cellulose affinity chromatography. Samples containing 0.5µg poly (A) mRNA were electrophoresed on 0.8% agarose-formaldehyde gels and blotted onto nylon filters. Hybridizations were performed for 24 hours at 42C using a 2.4 kb Bam HI/Eco RI fragment from HPV18 DNA as probe.

RESULTS

The P105 promoter is transactivated by activated Ha-ras and okadaic acid.

We first examined the effect of activated Ha-ras on the transcriptional activity of the HPV18 early promoter. Plasmid P105, containing the complete long control region of HPV-18 in front of CAT, was co-transfected in the presence of either the normal (Ras^{wt}), or human H-ras oncogene (Ras^{Val12}). We observed a five fold increases of P105 transcriptional activity in the presence of Ras^{Val12}, as shown in Figure 1A.

Inhibition of protein phosphatase 2A activity by okadaic acid was also able to transactivate the HPV18 enhancer-promoter in a similar way, although to a lesser extent (three fold). The effect of okadaic acid, apparently mediated by inhibition of protein phosphatase 2A (PP2A), is very similar to that previously observed with the HPV16 LCR (Smits *et al.*, 1992). The effect of Ras and OA are cooperative, and probably act through different pathways, since a twelve fold increase in transcriptional activity was observed when both were used simultaneously (Figure 1).

Mutations in AP-1 binding sites abolish response to okadaic acid and Ha-ras.

Since Ras is known to increase the activity of transcription factors, including AP-1, we assessed the effect of mutations at these elements, on the transcriptional response of P105 to this oncogene. This promoter contains two AP-1 binding sites, located at positions -171 and -349, and whose integrity has been shown to be crucial for its activity. As shown in Figure 2, P105 constructs containing mutations in any of these two AP-1 elements exhibited a diminished response to both, Ras^{Val12} (Figure 2A), and okadaic acid (Figure 2B), while mutations in both AP-1 elements completely abolish the transcriptional response to them.

Transcriptional activation is mediated by isolated AP1 binding sites.

To further assess the participation of the AP-1 elements found in HPV18, we next examined whether isolated AP-1 sequences could confer Ras and OA responsiveness to a minimal promoter. We used constructs containing five AP-1 elements, either from a consensus sequence (5'-TGACTCA-3', PK5), or from the HPV18 P105 promoter (5'-TGACTAA-3', AP18), cloned in front of a minimal tk promoter. As shown in Figure 3, both sequences were capable of conferring a transcriptional response to a minimal promoter, both to Ras and OA. Moreover, isolated AP-1 sequences responded cooperatively to them in a similar way, since CAT activity was augmented five and threefold, respectively, when Ras^{wt}, and OA were used.

To further analyze the cooperative effect between okadaic acid and Ras, we transfected cells with plasmid AP18, along with different concentrations of Ras^{wt}, or Ras^{Val12}, in the presence or absence of OA. As shown in Figure 4, the effect of both *ras* genes was

potentiated by OA severalfold, in a dose-dependent manner. It is worthnoting that simultaneous inhibition of PP2A and expression of Ras^{wt} cooperate to transactivate the P105 promoter to similar levels as the oncogene alone.

Effect of Jun family members on the transcriptional response to Ras.

Since the above mentioned results suggested us that PP2A and Ha-ras affected HPV18 early transcription through AP-1 family of transcription factors, we examined the consequence of individual members of the Jun family; c-jun, junB, and junD, on this effect. We found that while c-jun increases the transcriptional activity of the P105 promoter in a concentration-dependent fashion, as shown in Figure 5, neither jun B, nor jun D, activated this promoter, even at high concentrations (data not shown). Simultaneous expression of activated Ha-ras and c-jun resulted in an additive transcriptional activation of P105, although previous reports have shown that Ha-ras potentiates the effect of c-jun in a cooperative way (Binétruy *et al.*, 1991). Possibly, this effect is consistent with the high AP-1 activity detected in established cell lines (Wasylyk *et al.*, 1988). The activity of Jun B or Jun D was not affected by Ha-ras, and even we could observe a reproducible inhibition of P105 by *ras* oncogene, in the presence of. these two transcription factors.

HeLa cells abnormally expressing Ha-ras genes exhibited increased levels of endogenous E6 and E7 oncogenes.

Modification of the activity of proteins that modulate AP-1 activity resulted in an increased transcriptional activity of the HPV-18 P105 early promoter in transient transfection

experiments. To further analyse the functional role of altering H-ras and PP2A activity *in vivo*, we used a cell line that expresses E6 and E7 oncogenes from HPV18. HeLa cells are known to contain around 10 - 50 copies of integrated viral sequences that include notably the LCR (P105 promoter), E6, and E7 (Schwarz *et al.*, 1985). Recently, HeLa cells abnormally expressing either wt or mutated H-ras have been described. (Miranda *et al.*, 1995). They exhibit gross alterations of cell morphology, and induction of what has been called "mitotic death." We asked whether in these cell lines, permanently expressing high levels of *ras*, E6 and E7 transcription are indeed augmented, as suggested from our previous results. We performed Northern blot analysis of these clones, with E6/E7 as probes and confirmed that Ras positively modulate E6 and E7 expression (Figure 6).

DISCUSSION

Cervical carcinomas eventually develop in only a small percentage of women infected with "high risk" HPVs. This and other observations suggest that although infection with HPV constitutes a major event contributing to cervical carcinogenesis, other factors are clearly needed. Indeed, progression of HPV-immortalized cells to a fully transformed phenotype is observed upon transfection of activated *ras* oncogenes (Matlashewski *et al.*, 1987; DiPaolo *et al.*, 1989), or after continuous passages *in vitro* (Pecoraro *et al.*, 1991). Some observations support the notion that cellular changes leading to deregulated expression of viral E6 and E7 oncogenes have a central role for the development of cervical carcinoma (zur Hausen, 1986).

In this work we have analyzed the effect of Ha-ras gene expression, and inactivation of PP2A, on the control of HPV18 E6 and E7 transcription. We demonstrate that the

activity of the E6 and E7 promoter was significantly induced in the presence of oncogenic ras (Ras^{Vall2}), while the normal allele (Ras^{wt}) produced only a marginal effect. We observed that this activation is mediated by the AP-1 binding sequences present in the HPV18 LCR, since mutations in both AP-1 binding sites completely abolished its induction.

AP-1 binding sites, or TRE, have been identified in many cellular and viral promoters/enhancers. The P105 promoter has previously been shown to bear two AP-1 binding sites (García Carrancá *et al.*, 1988), that are vital for its activity (Thierry *et al.*, 1992). The mechanism by which activated Ha-ras induces the activity of some promoters through AP-1 factors, is apparently by stimulating three different types of specific proline-directed MAP kinases; the ERK's, JNK's, and FRK's, each of them affecting transcriptional activity through phosphorylation of different AP-1 family members (Karin, 1995).

Additionally, previous reports have involved protein phosphatases as important negative regulators of AP-1 activity. Several studies using OA, an specific inhibitor of PPIA and PP2A, have shown that MAPK-dependent phosphorylation is increased *in vivo* (Haystead, 1990). We found that OA treatment resulted in activated transcription from the HPV-18 LCR, in agreement with previous observations indicating that inhibition of PP2A resulted in activation of the HPV-16 early promoter in diploid fibroblasts (Smits *et al.*, 1992). As observed for Ras, the two AP-1 binding sites present in the LCR were essential for the observed effect, suggesting that increased AP-1 activity results from inactivation of PP2A by OA. Although the exact mechanisms underlying this phenomenon

are not known, it is possible that an increased phosphorylation of AP-1 factors could be involved.

Interestingly, simultaneous inhibition of PP2A and expression of either mutated or activated Ha-ras produced a synergistic activation of the HPV-18 LCR. Indeed, the activation observed when OA and the normal allele were used was similar to that obtained when the oncogene was used alone. These effects were also observed when heterologous promoters containing several AP-1 responsive elements were used. These results suggested us that either Ras and PP2A participate in complementary pathways, or that Ras activity is regulated somehow by protein phosphatase 2A. In both scenarios, the simultaneous inactivation of PP2A, together with activation of Ha-ras, may result in a net increase in the activity of AP-1 factors. Since PP2A might balance MAPK activity by dephosphorylating substrates of this cascade, inhibition of PP2A, with concomitant activation of the MAPK cascade by activated Ha-ras, could result in an increased phosphorylation of specific MAPK substrates, including jun proteins. Possibly, following activation of Ras dependent kinases leading to an increased AP-1 activity, PP2A could be necessary to turn off this activity, possibly by dephosphorylating c-jun. Although previous results have shown that, *in vitro*, PP2A can completely dephosphorylate c-jun that has been phosphorylated by CK II (Alberts *et al.*, 1993), it still remains to confirm that this occurs *in vivo*. Another possibility is that PP2A could modulate at other levels the MAPK cascade, since previous results have shown that treatment with OA increase MEK activity, suggesting that it is indeed regulated by PP2A (Samuels *et al.*, 1993).

Although the effects of Ras activation and PP2A inhibition on P105 and AP-1 responsive promoters were similar, we observed some differences. Treatment with OA usually resulted in a transactivation that was less efficiently than the one observed with activated Ras, but higher than the one obtained with normal ras alone. This could possibly reflect the contribution of multiple phosphorylation-dephosphorylation events in the regulation of AP-1 activity. Although completely dephosphorylated c-jun is capable of DNA binding (Baker *et al.*, 1992), it is only partially active in transactivation, since combined phosphorylation of serines at the N-terminus, together with dephosphorylation of residues at the C-terminus produce a fully active component.

Simultaneous treatment of cells that were transfected by either ras gene, with OA, produced an increased transcriptional response, both with the HPV promoter, or with the AP-1 responsive constructs. One possibility is that OA increases endogenous jun family genes expression, that then could be positively modulated by Ha-ras. In previous reports it has been observed that treatment with OA induces the expression of junB, and to a lesser extent c-jun, with only a marginal effect on junD expression (Schöntal *et al.*, 1991). However, when Ha-ras genes were cotransfected with different jun family members, we did observe an increase in the activity of the HPV18 promoter only when c-jun was used. Interestingly, we reproducibly observed that activation by ras oncogene was even reduced in the presence of exogenous junB, or junD. It has been previously reported that JunB was the predominant Jun member binding to the HPV-18 AP-1 elements (Thierry *et al.*, 1992). Our finding that c-jun is a more potent activator than jun B, or Jun D, raises the possibility that a very complex control on AP-1 transcription factors may be involved. Indeed, AP-1

DNA binding activity does not necessarily mirrors its transcriptional activity (Karin 1995), and junB, a weak transactivator that is expressed at relatively high levels in the skin, and most particularly in epidermis, is possibly reduced during the process of tumor progression (Wilkinson *et al.*, 1989).

Recently, HeLa cells abnormally expressing Ha-ras genes have been shown to exhibit dramatic morphological alterations, including the appearance of giants cells with multiple nuclei, and formation of micronuclei. These giants cells only undergo a very limited number of divisions, before dying. In this case, similar effects were observed with both normal and mutated versions of Ha-ras, although the proportion of giant multinucleated cells was larger in clones transfected with oncogenic Ras. Other alterations observed in these cells included an increased number of chromosomes, and the appearance of populations of cells containing an increased content of DNA, typically observed in cells that exhibit abnormalities in checkpoints arrest. When we analyzed the expression of E6 and E7 oncogenes in these cells, by Northern Blot, we observed that abnormal expression of Ha-ras induces the two major RNA species (3.5 and 1.6 Kb) usually found in HeLa cells. These results confirmed our previous observations using transient transfection of Ras, and indicate that the inappropriate expression of Ha-ras, either by overexpression of a normal allele, or by the presence of oncogenic mutations produce similar effects on E6 and E7 expression. These results and observations of a high incidence of Ki-ras mutations in cervical adenocarcinomas (M. Lizano, unpublished observations), and of amplification of Ras genes in cervical tumors (Kiroshita *et al.*, 1994), suggest that overexpression of E6 and E7 could result from abnormal expression of *ras* genes. The data available suggests that

high levels of E6 and E7 expression are needed for maintaining the proliferative and malignant phenotype of HPV-positive cervical cancer cells. Apparently, normal cells exhibit a tight regulation of viral oncogene expression, preventing the progression of lesions of latently infected cells, so different cellular events that eventually disrupt the cascade of intracellular regulation of viral expression could be involved in the initial phases of carcinoma development (zur Hausen, 1994). Additionally, inhibition of PP2A and Ha-ras activation may further contribute to up-regulation of HPV oncogene expression. Possibly the regulation of P105 promoter may require the action of multiple phosphorylation-dephosphorylation steps, some of them Ha-ras and PP2A dependent. In this context, it is possible that activation of the HPV18 promoter, through its AP-1 binding elements, could involve both, the activation of protein kinases modulated by ras, and the inactivation of protein phosphatases (PP2A).

These data suggest that Ha-Ras could constitute an important cellular control on the transcriptional activity of HPV oncogenes, and possibly could explain in part the oncogenic cooperation between Ras and HPV in fully transforming epithelial cells. Further experiments are necessary to elucidate their exact contribution in the carcinogenesis of the cervix.

ACKNOWLEDGEMENTS

F. Thierry for plasmids

M. Guido for excellent technical assistance

?? for Critical reading of the manuscript

This work was supported in part by grants from CONACYT (1705-M9209), and PAPIIT (IN211394 & IN212895).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Transcriptional activation of the HPV18 P105 promoter by Ha-ras and okadaic acid. A construct containing the P105 promoter in front of CAT was used to cotransfect C-33 cells with plasmids containing either the wild type human Ha-ras gene (Ras^{wt}), or an activated version (Ras^{Val12}), as indicated. In some cases, cells were incubated with 100nM of okadaic acid (OA) for 6 hours, and CAT activity measured 48 hours after transfection.

A, Relative CAT activity (\pm S.E.) was determined from at least three independent experiments. **B**, Representative assay.

Figure 2. Oncogenic Ras and OA activate the P105 promoter through its AP-1 binding sites. To evaluate the contribution of the AP-1 binding sites present in P105, different constructs containing normal (white triangles) or mutated (black triangles) AP-1 sites were used. **A**, C-33 cells were transfected with reporter plasmids alone (black bars), or in the presence of oncogenic Ha-ras gene (slashed bars). **B**, Cells were transfected with reporter plasmids, and incubated in the absence (black bars), or presence (slashed bars) of okadaic acid, as described in Figure 1. Relative CAT activities were determined and the results expressed as the average (\pm S.E.) of at least three independent experiments.

Figure 3. Isolated AP1 sites confer high inducibility to a heterologous promoter. Okadaic acid stimulates the activity of isolated AP1 binding sites from the P105 promoter, and potentiates the effect of normal and activated Ha-ras genes. Cells were

cotransfected with 0.5 μ g of CAT plasmids containing 5' AP-1 binding sequences, either consensus (PK5), or from P105 (AP-18), in front of a minimal tk promoter, together with 5 μ g of normal, or activated Ha-ras. Where indicated, transfected cells were incubated with 100 nM of okadaic acid (OA), as described before. Control transfection (—, solid bars); Ras^{wt} (—, hatched bars); Ras^{Val} (—, dotted bars). A, Relative CAT activities correspond to an average (\pm S.E.) calculated from four independent experiments.

Figure 4. Inhibition of PP2A confers high responsiveness to normal Ras.

Cells were cotransfected with 0.5 μ g of a CAT plasmid containing 5' AP-1 sequences from P105, in front of a minimal tk promoter (AP-18), and different concentrations of either Ras^{wt} (Panel A), or Ras^{Val} (Panel B). Transfected cells were incubated either with 0.5% bovine serum (O, open circles), or 100 nM of okadaic acid (O, closed circles), as described above. Relative CAT activity (\pm S.E.) was calculated from three independent experiments.

Figure 5. Exogenous c-Jun increases the transcriptional response of P105 to both normal and oncogenic Ras.

Cells were cotransfected with 2 μ g of P105 CAT plasmid and 2 μ g of plasmids expressing c-jun, junB, or junD, alone (—, solid bars), or in the presence of oncogenic ras (—, dashed bars), as indicated. Relative CAT activities were calculated as described before.

cotransfected with 0.5 μ g of CAT plasmids containing 5 AP-1 binding sequences, either consensus (PK5), or from P105 (AP-18), in front of a minimal tk promoter, together with 5 μ g of normal, or activated Ha-ras. Where indicated, transfected cells were incubated with 100 nM of okadaic acid (OA), as described before. Control transfection (, solid bars); Ras^{wt} (, hatched bars); Ras^{Val} (, dotted bars). **A**, Relative CAT activities correspond to an average (\pm S.E.) calculated from four independent experiments.

Figure 4. Inhibition of PP2A confers high responsiveness to normal Ras.

Cells were cotransfected with 0.5 μ g of a CAT plasmid containing 5 AP-1 sequences from P105, in front of a minimal tk promoter (AP-18), and different concentrations of either Ras^{wt} (Panel **A**), or Ras^{Val} (Panel **B**). Transfected cells were incubated either with 0.5% bovine serum (O, open circles), or 100 nM of okadaic acid (O, closed circles), as described above. Relative CAT activity (\pm S.E.) was calculated from three independent experiments.

Figure 5. Exogenous c-Jun increases the transcriptional response of P105 to both normal and oncogenic Ras.

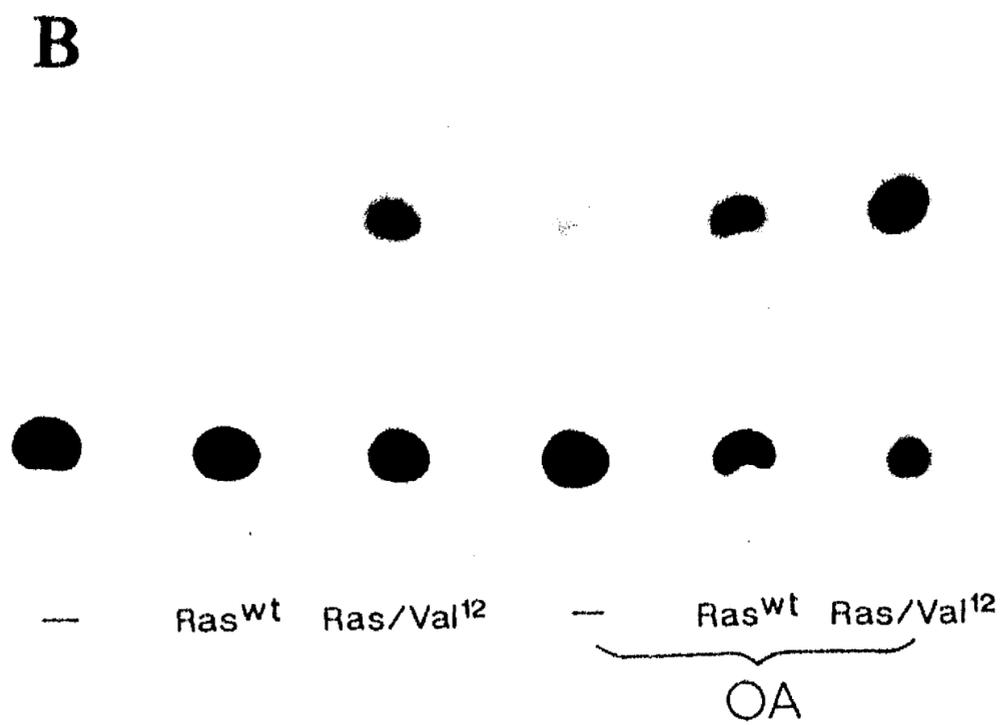
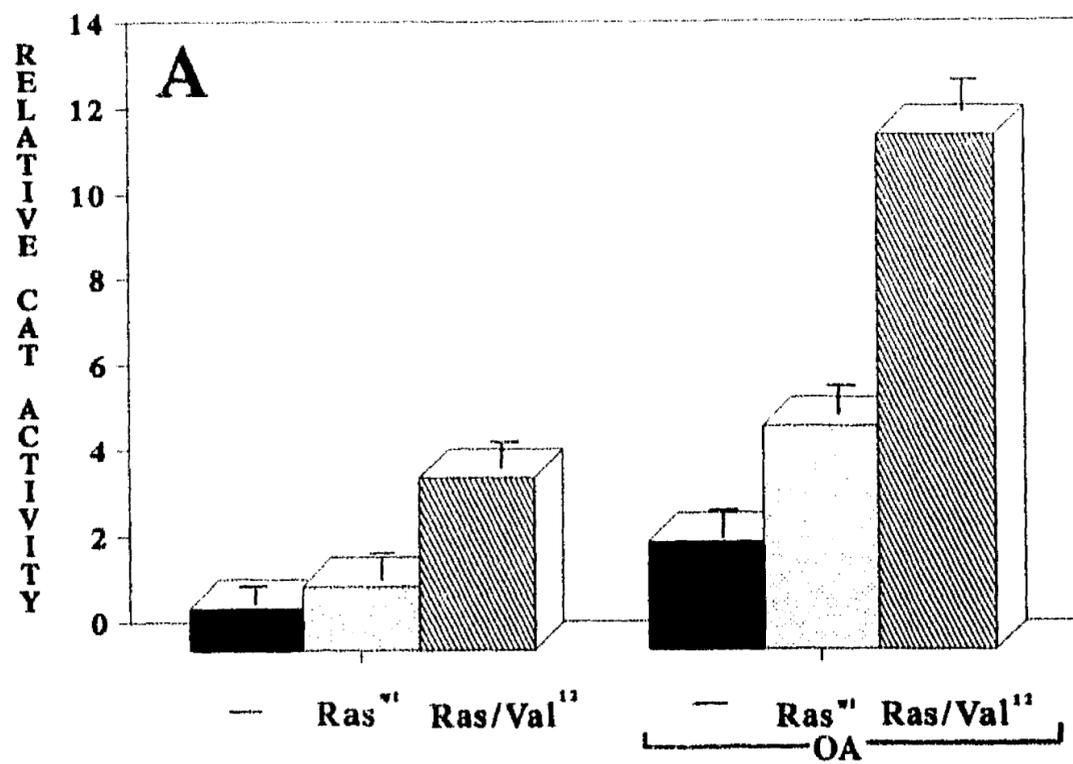
Cells were cotransfected with 2 μ g of P105 CAT plasmid and 2 μ g of plasmids expressing c-jun, junB, or junD, alone (, solid bars), or in the presence of oncogenic ras(, slashed bars), as indicated. Relative CAT activities were calculated as described before.

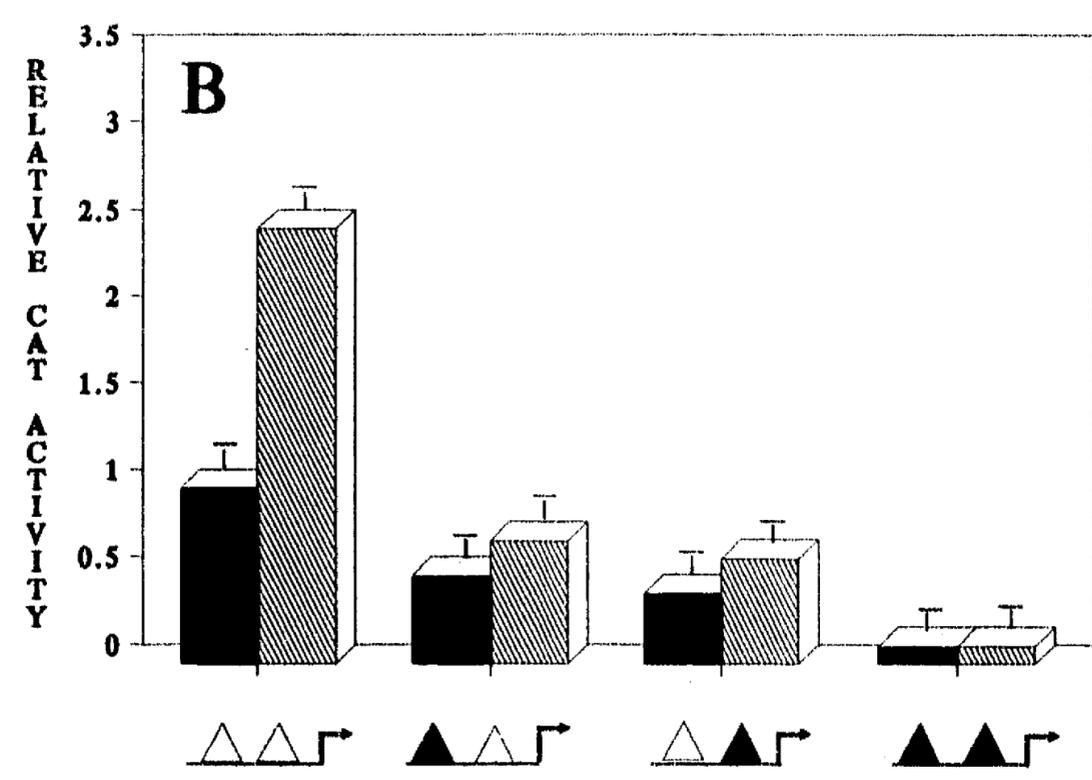
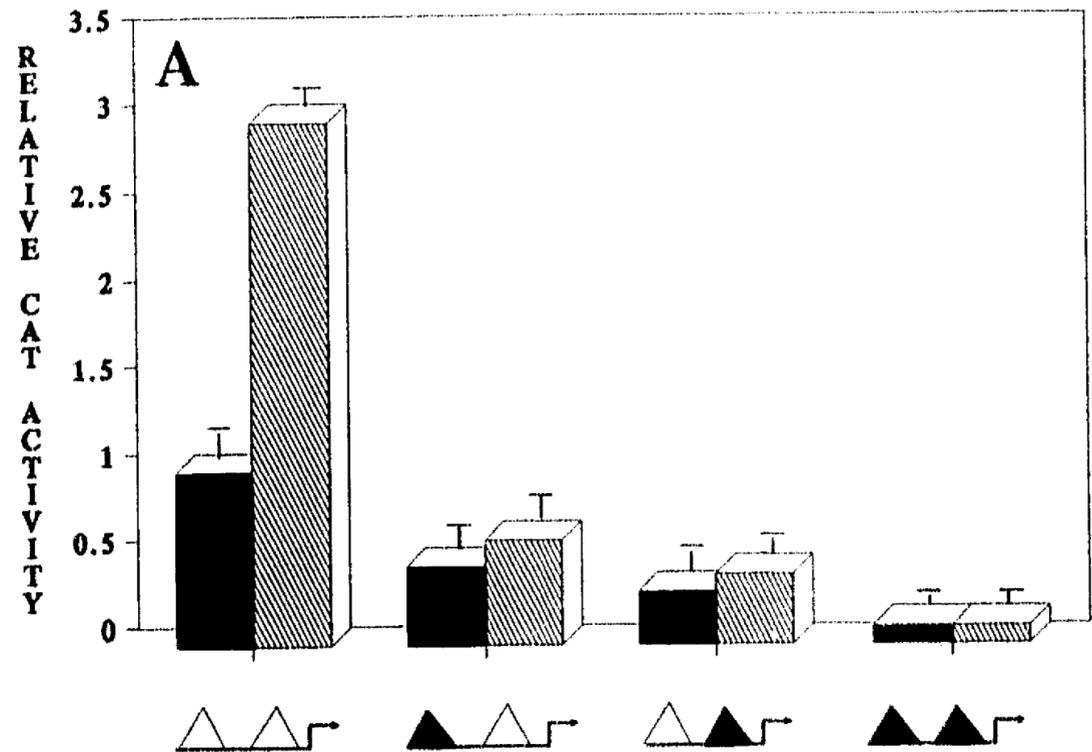
Figure 6. HeLa cells abnormally expressing Ha-ras genes exhibit a dramatic increased expression of viral E6 and E7 oncogenes. Northern Blot analysis of poly(A)⁺ mRNA from different HeLa cell clones, permanently transfected with normal, or oncogenic *ras* was performed as described in Material and Methods. Lane a, HeLa cells; lane b, HeLa/Ras^{wt} clone; lane c, HeLa/Ras^{Val} clone. A 2.4 Kb BamHI/EcoRI fragment from the HPV-18 genome was radiolabelled and used as probe. Bars indicate the position of 18S and 28S ribosomal RNAs, used as size markers.

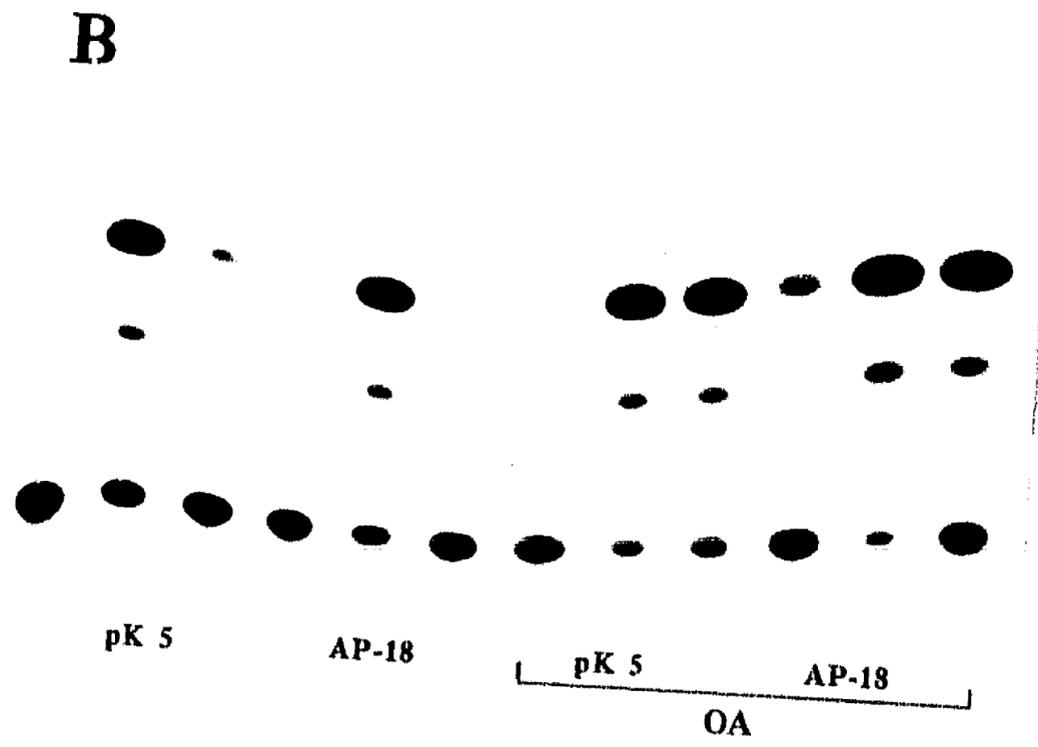
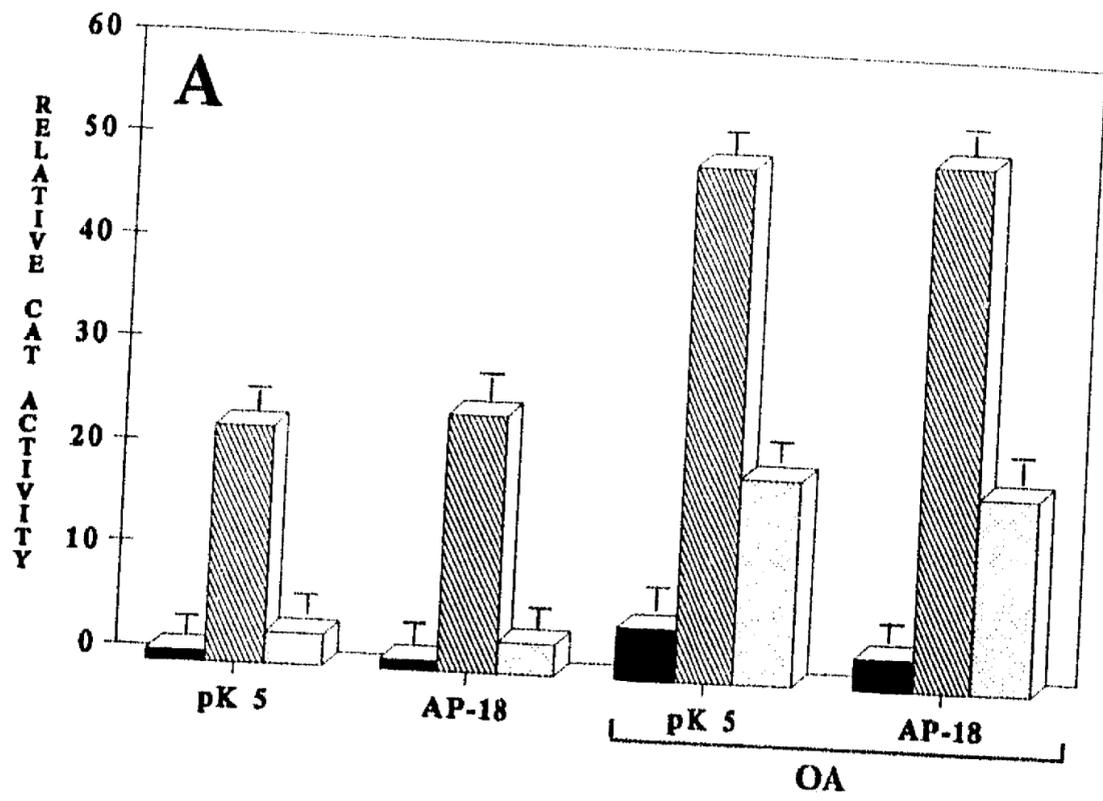
REFERENCES

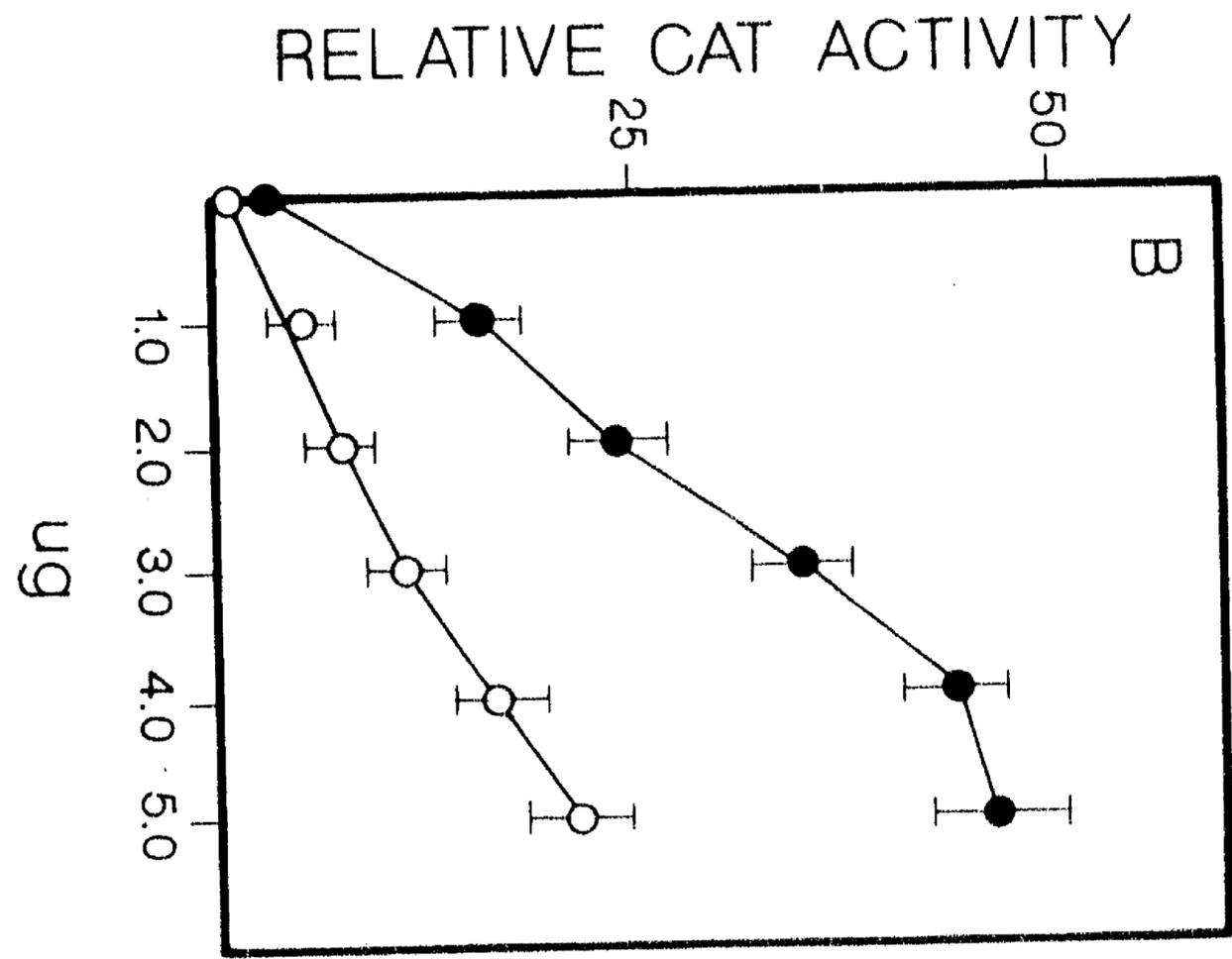
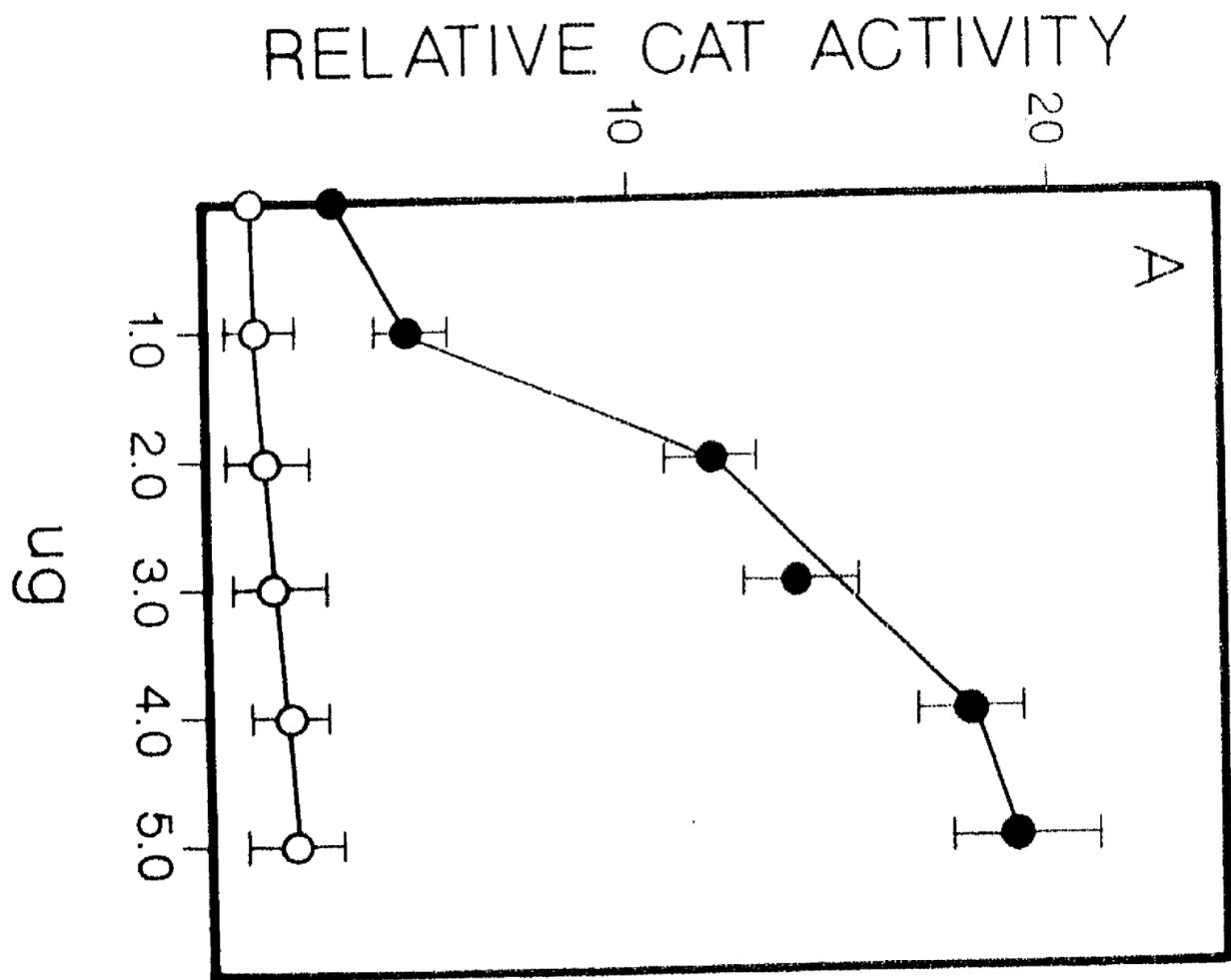
- *Alberts A. S., Deng T., Lin A., Meinkoth J.L., Schöntal A., Mumby M. C., Karin M. & Feramisco J.R. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2104-2112.
- *Alexander D.R. (1990) *New Biol.* **2**, 1049-1062.
- *Baker S. J., Kerppola T. J., Luk D., Vanderberg M.T., Marshak D. R., Curran T. & Abate C (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 4694-4705.
- *Bedell, M. A., Jones K.H., Grossmann S.R. & Laimins L.A. (1989) *J. Virol* **63**, 1247-1255.
- *Binétruy, B., Smeal T. & Karin M. (1991). *Nature* **351**, 122-127.
- * Bradford M.M. (1976) *Anal Biochem* **72**, 248
- *Di Paolo, J.A., Woodworth C.D., Popescu N.C., Notario V. & Doninger J. (1989). *Oncogene* **4**, 395-399.
- *Dyson N, Howley PM, Münger K. & Harlow E (1989) *Science* **243**, 934-936
- *García-Carrancá, A., Thierry F. & Yaniv M. (1988). *J. Virol* **63**, 4321-4330.
- *Gloss B. & Bernard H.U. (1990) *J. Virol.* **64**, 5577-5584.
- *Haystead T. A. J., Weiel J. E., Litchfield D.W., Tsukitani Y., Fischer E. H. & Krebs E. G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 16571-16580
- * Hirai, S.I., Bourachot B. & Yaniv M. (1990). *Oncogene.* **5**, 39-46.
- * Hoppe- Seyler F., Butz K. & zur Hausen H. (1991) *J. Virol* **65**, 5613-5618.
- *Karin M (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 16483-16486.
- *Kyriakis, J.M., Banerjee P., Nikolakaki E., Dai T., Rubie E.A. , Ahmad M.F. , Avruch J. & Woodgett J. R. (1994). *Nature* **369**, 156-160.
- *Kiroshita M., Katsuragi K., Shin S.& Aono T. (1994) *Biomedical Research* **14**, 403-
- *Lowy DR, Kirnbauer R, Schiller JT (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2436
- *Mack D.H. & Laimins L.A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9102-9106.

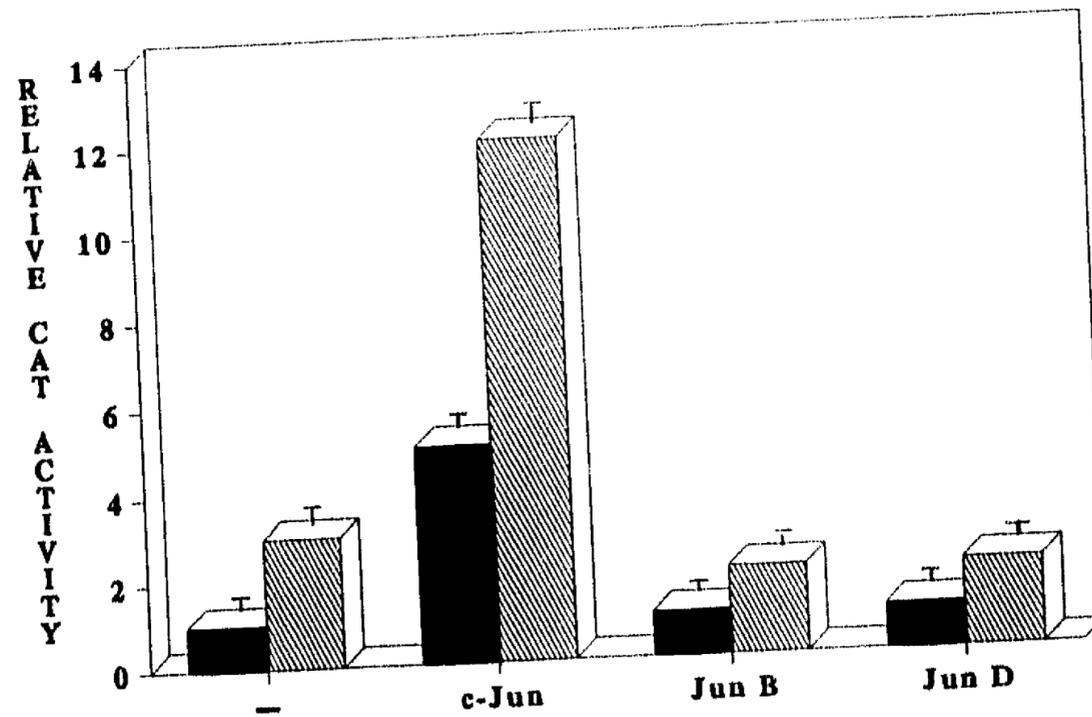
- *Matlashewski, G., Schneider J., Banks L., Jones N., Murray A. & Crawford L. (1987). *EMBO J.* **6**, 1741-1746.
- *Miranda, E.I., Santana, C., Rojas, E., Hernández, S., Ostrosky-Wegman, P. & García-Carrancá A. *Mutation Res* (1995, In Press).
- *Offord E.A. & Beard P. (1990) *J. Virol.* **64**, 4792-4798.
- *Pecoraro, G., Lee M., Morgan D. & Defendi V. (1991). *American Journal of Pathology* **173**, 1-8.
- *Piette, J., Hirai, S. & Yaniv M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3401-3405
- *Pirisi L, Yasumoto S., Fellery M., Doninger J.K. Di Paolo J.A. (1987) *J. Virol* **61**, 1061-1066.
- *Samuels M. L., Weber M. J., Bishop J. M. & Mc Mahon M. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6241-6252.
- *Smits, P.H.M., Smits H.L., Minnaar R.P., Hemmings B.A., Mayer-Jackel R.W., Schuurman R., Vander Noordaa J. & ter Shegget J. (1992). *EMBO-J.* **11**, 4601.
- *Scheffner M., Werness B.A. Huibregtse J M, Levine A J & Howley P M 1990 *Cell* **63**, 1129-1136.
- *Schöntal A., Alberts A. S. Frost J.A. & Feramisco J.R. (1991) *New. Biol.* **3**, 977-986.
- *Schwarz E., Freese U. K., Gissmann L. Mayer W. Roggenbuck B., Stremlau A. & zur Hausen H (1985) *Nature* **314**, 111-114.
- *Tabin C.J., Bradley S.M., Bargmann C.I., Weinberg R.A., Papageorge A.G.; Scolnick E.M., Dhar R., Lowy D.R. & Chang E.H. (1982) *Nature* **300**, 143-149.
- *Thierry, F., Spyrou G., Yaniv M & Howley P. (1992). *J. Virol* **66**, 3740-3748.
- *Wigler, M.S., Silverstein S., Lee L.S., Pellicer A., Cheng Y., & Axel R. (1977). *Cell* **11**, 223-232.
- *zur Hausen H (1986) *Lancet* **2**, 489-491.
- *zur Hausen H. & Schneider A. (1987) The role of papilloma-viruses in human anogenital cancers In Salzman N, Howley P.M. (eds) *The Papoviridae Vol 2. The papillomaviruses* Plenum New York pp 245-263

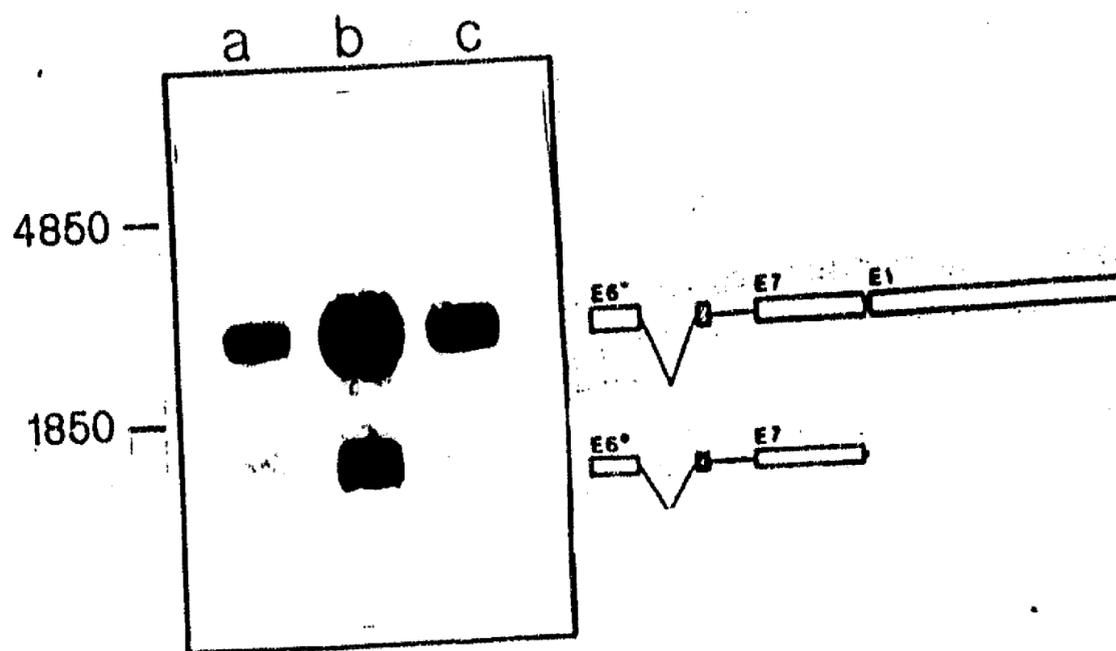












GAPDH

Detailed description: This section shows three dark bands corresponding to GAPDH, used as a loading control. The bands are located below the main blot area and are roughly aligned with the positions of samples 'a', 'b', and 'c' from the blot above. The bands are of similar intensity, indicating that approximately equal amounts of total RNA were loaded in each lane.

DISCUSSION

DISCUSIÓN

Los carcinomas cervicales se desarrollan eventualmente en sólo un pequeño porcentaje de mujeres infectadas con los tipos de alto riesgo de HPVs. Aunque ya existe un gran número de evidencias que apuntan a estos virus como el más significativo de los factores de riesgo asociados con el desarrollo de este tipo de cáncer, pareciera que la infección por sí misma es sólo uno de los pasos en la progresión hacia el estado de completa transformación (Lowy *et al.* 1994).

En células inmortalizadas por HPV la progresión hacia un estado transformado es posible sólo después de largos períodos en cultivo (Pecoraro *et al.* 1991), o bien por la transfección de un gen ras activado (Di Paolo *et al.* 1989). Estas observaciones implican que se requieren eventos celulares adicionales para el desarrollo del cáncer cervical.

Los eventos moleculares y las consecuencias biológicas de éstos no se entienden del todo, pero se ha propuesto que algunos de estos cambios ocasionan desregulación en la transcripción de los oncogenes virales de HPV (zur Hausen 1986).

La actividad transcripcional del promotor viral P-105 que modula la expresión de las proteínas E6/E7 ha sido motivo de un gran número de estudios entre los que destacan los trabajos iniciales desarrollados en el Instituto Pasteur que mostraron que en la región de control del HPV-18 se unen diversos factores de transcripción celulares y virales que interactúan con sitios específicos localizados en esta región (García-Carrancá *et al.* 1988). Estudios posteriores realizados por diferentes grupos han mostrado el papel que juegan elementos individuales en la actividad transcripcional y es claro que la integridad de ciertos sitios de unión es determinante para la actividad de este promotor.

HORMONAS ESTEROIDES Y LA EXPRESION DE LOS ONCOGENES VIRALES

Una característica interesante de todos los HPVs genitales, independientemente de su asociación con la progresión de la carcinogenesis, es que presentan una secuencia actuando en *cis*, muy similar al elemento de respuesta a glucocorticoides y progesterona o GRE (Chan *et al.* 1989). Por otra parte, algunas evidencias epidemiológicas sugieren que las hormonas esteroides pueden incrementar el riesgo de CaCu en mujeres infectadas por HPV.

En el caso del HPV-16, uno de los virus de alto riesgo mas comúnmente asociado con el cáncer genital, inicialmente se mostró que contiene este elemento localizado dentro de su activador transcripcional constitutivo (Gloss *et al.* 1987). Análisis posteriores demostraron la funcionalidad de este elemento, en células conteniendo los receptores apropiados (Chan *et al.* 1989).

Por el contrario, la región activadora de la LCR del HPV-18, ha mostrado contener sitios de unión para diversas proteínas celulares como AP-1, KRF, OCT pero no contiene GRE. Sin embargo, en la región mas próxima al promotor P-105, previamente se ha descrito la presencia de una secuencia AGCACATACTATACT llamada GRE1 en la posición 7838, que ha mostrado ser inducible por dexametasona y progesterona, cuando se usa un oligonucleótido aislado conteniendo esta secuencia enfrente de un promotor heterólogo y un gen reportero (Chan *et al.* 1989)

En esta región proximal hemos encontrado por análisis de secuencia, que HPV-18 contiene otro sitio potencial GRE al que denominamos GRE2, situado 82 nucleótidos arriba del sitio GRE1 y que exhibe una similitud más débil que este último en comparación con la secuencia GRE consenso, 7 de un total de 12 pares de bases. La presencia de este segundo sitio sugería la posibilidad de que la activación hormonal ocurriera cooperativamente, ya que en algunos promotores sensibles a esteroides es común observar este efecto entre por lo menos dos de estos elementos (Jantzen *et al.* 1987).

Sin embargo, encontramos que algunos cambios en la secuencia del sitio GRE1, son suficientes para perder completamente la respuesta a la versión activada del receptor a glucocorticoides (GR), mientras que las mutaciones en el sitio GRE2 no afectan la respuesta del promotor P-105 al GR, lo que indica que GRE2 por sí mismo, no contribuye considerablemente a la inducción por el GR. Aunque la secuencia GRE de HPV-18, puede responder eficientemente a la activación por GR, cuando se multimeriza e inclusive es capaz de cooperar para dar más que una respuesta aditiva.

Algo que es importante recalcar es que a diferencia de lo observado en HPV-18, en HPV-16 se han encontrado por lo menos 3 sitios GRE y la pérdida de funcionalidad por mutación en un sólo sitio o en dos de los GRE no han mostrado ser suficiente para eliminar la respuesta a esteroides. Solamente cuando se introducen cambios en los tres sitios GRE potenciales, es posible observar una falla en la inducción por estas hormonas (Mittal *et al.* 1993).

Esto nos muestra que en HPV-16 la regulación es mediada por los tres sitios GRE, en contraste a lo que ocurre con HPV-18, donde una mutación en un único nucleótido, en el sitio GRE1, es suficiente para eliminar completamente la respuesta a glucocorticoides del P-105. Estas diferencias de regulación por

hormonas esteroideas podrían estar relacionadas con el hecho de que HPV-16 se encuentra como el tipo viral asociado mas frecuentemente con la etiología del CaCu. Sin embargo no existen datos epidemiológicos que sustenten que las hormonas esteroideas incrementen el riesgo de cáncer cervical en relación a un tipo viral específico, en parte porque la mayoría de las evidencias epidemiológicas que han sido reportadas, toman en cuenta únicamente la presencia o ausencia de HPV, pero no el tipo viral.

Sorprendentemente la mutación en el sitio GRE1 afecta la transcripción basal del promotor, como si su actividad basal dependiera de la integridad de la secuencia GRE1. Mientras que la comparación en los niveles de transcripción del promotor silvestre y el mutado cotransfectados con el GR constitutivo, muestran que mientras en el silvestre el GR activa la transcripción basal, ligera pero siempre reproduciblemente, en la mutante, inesperadamente, el GR ocasiona mas represión que activación.

Posiblemente en el caso de nuestra mutante, el efecto observado se debe a que esta nueva conformación del GRE interfiere con la actividad transcripcional del sitio AP-1. En otros genes se ha mostrado que la aparente disminución en la actividad transcripcional mediada por los sitios GRE se debe a una interferencia entre receptores y factores de transcripción como los AP-1, por inhibición mutua de unión a DNA debido a interacciones proteína-proteína .

Es posible que la mutación en el GRE ocasione que el GR activado ya no pueda unirse al sitio y al quedar libre interaccione con proteínas que participan en la formación del dímero AP-1 y de esta manera se observe una disminución en la actividad del promotor, en presencia del receptor. De hecho se ha mostrado que la dexametasona es un potente inhibidor de la inducción del gen de la colagenasa durante la proliferación celular o la inflamación. En este caso, se identificó al factor AP-1 como el blanco para este efecto. Una serie de evidencias posteriores demostraron que los dímeros AP-1 interactúan con el receptor de glucocorticoides para formar un complejo que es incapaz de unirse a sus correspondientes elementos.

Otra posibilidad para explicar la disminución en la actividad basal del promotor al introducir la mutación puntual, es que posiblemente se interfiriera con la unión de otro factor celular, sin embargo cuando se utilizó otra sonda conteniendo 9 nucleótidos adicionales hacia arriba del sitio GRE, fue posible observar una débil unión con el factor SP1 purificado. El análisis de la secuencia muestra la presencia de un sitio SP1 putativo, que se sobrelapa con una parte del GRE, tal como se muestra en la siguiente secuencia:

AGGTTGGGCAGCACATACTACTTT
 SP1 GRE

En términos de regulación pudiera ser interesante el hecho de que sólo sería posible la interacción de un factor a la vez, esto significa que cuando se encontrara el sitio SP1 unido a su secuencia, no sería posible la unión de un GR activo y viceversa. Sin embargo, consideramos que esta débil unión del factor SP1, podría deberse a la inespecificidad de dicha unión, más aún si tomamos en cuenta que SP1 muestra afinidad por secuencias ricas en G/C.

Nuestra conclusión es que no existe un factor celular obvio que interactúe con o en la vecindad de la secuencia GRE que pudiera explicar la disminución en la actividad basal del promotor P-105 mutado.

Por otra parte, se ha reportado que una doble mutación puntual en el mismo elemento GRE1 (AA a GG) ocasiona un incremento en la actividad basal de este promotor (Butz & Hoppe Seyler 1993). Podemos atribuir estos resultados en apariencia controversiales, a que cada una de las mutantes ocasiona diferentes cambios conformacionales. Es posible que la doble mutante provoque un cambio estructural que inactive al elemento regulador negativo YY1 que se encuentra en la vecindad del elemento de respuesta a glucocorticoides.

FACTORES QUE INTERACTUAN CON EL GRE1 DE HPV-18

Una parte interesante del análisis de la importancia y funcionalidad de un sitio GRE consiste en la demostración de la unión directa del receptor activado al sitio. En este estudio se realizaron ensayos de retardo en la movilidad de una secuencia GRE marcada radiactivamente utilizando extractos nucleares de hígado de rata, endometrio de coneja y de células Hela, queratinocitos tratadas con dexametasona, o células C-33 transfectadas con el GR, con el propósito de identificar si el GR o algún otro factor celular es capaz de interactuar con el sitio GRE1. Aunque en la mayoría de los casos se observaron bandas de movilidad retrasada, no fue posible demostrar su especificidad cuando se utilizaron competidores tanto específicos como inespecíficos. En el caso de HPV-16, ensayos similares han mostrado la unión del GR a los sitios GRE de HPV-16 (Mittal *et al.* 1993), aunque es interesante recalcar que en muchos reportes se menciona que ha sido difícil observar este tipo de complejos, aparentemente porque el GR es muy lábil.

Por el contrario cuando se utiliza un GR purificado a partir de un sistema de traducción bacteriano *in vitro*, se encontró que un fragmento conteniendo la secuencia GRE1 de HPV-18 se une específicamente al GR purificado. Sin embargo la comparación de la unión del sitio GRE consenso con la de GRE1, muestra que la unión de este último es mas débil que la que se observa al sitio GREc. Sin embargo, un desoxiilgonucleótido conteniendo la mutación descrita no parece unirse al GR purificado.

LA PROTEÍNA brahma NO COOPERA CON EL GR PARA ACTIVAR LA TRANSCRIPCIÓN DEL HPV-18

Una posible explicación para la débil activación de la transcripción del HPV-18 por las hormonas esteroides podría ser que la activación total requiere de la interacción con otros factores celulares determinantes.

La proteína brahma (hbrm) es un componente de un complejo proteico que modula la estructura de la cromatina. En un trabajo previo (Muchardt & Yaniv 1993) se mostró que esta proteína potencia la activación mediada por GR. El papel potencial que hbrm podría representar en la activación mediada por GR del HPV-18 nos llevó a analizar el efecto de la expresión de este gen en la línea celular C-33 (la cual ha mostrado no expresar hbrm endógeno).

La expresión de hbrm exógeno fue capaz de activar al promotor P-105 aún en ausencia de GR, de una manera dependiente de la cantidad de hbrm expresado. Esto podría significar que:

- El efecto de hbrm es independiente de la activación mediada por glucocorticoides.
- O bien existe una mínima cantidad de receptores endógenos que por sí mismos no son capaces de expresar ninguna actividad, pero al cooperar con hbrm evidencian su presencia.

Esta última posibilidad se descarta, ya que la activación del promotor P-105 por hbrm mostró ser independiente de la activación mediada por glucocorticoides, pues el promotor P-105 con la mutación en el sitio GRE también es activado por hbrm.

Por otra parte, la expresión de GR incrementa la activación de este promotor mediada por hbrm de manera aditiva y no cooperativa como ha sido reportada en el caso de otros promotores. Nuestra conclusión es que no existe cooperatividad entre hbrm y GR para activar el GRE de HPV-18, lo que podría explicar el ligero aumento transcripcional del P-105 que promueve el GR.

LOS SITIOS AP-1 EN LA ACTIVACIÓN DEL GRE1

Una alternativa de regulación de los GRE implica la interacción funcional con otros factores de transcripción esenciales. Si las dos vías de activación se encontraran interfiriéndose de manera negativa, un promotor mutado en los sitios AP-1 debería ser activado más eficientemente por el GR que en la secuencia silvestre. Sin embargo, el uso de promotores conteniendo mutaciones en uno de

los dos sitios AP-1 o en ambos, no mostró una mejor activación por el GR, que la observada en el promotor intacto.

Por otra parte, en una serie de experimentos realizados por V. Vallejo (resultados no publicados) utilizando el promotor P-105 con el sitio GRE1 mutado, no observamos una mejor activación de los sitios AP-1 en comparación con el promotor silvestre. Por lo que podemos concluir que aparentemente no existe una interacción obvia entre estas dos vías de activación. Sin embargo, no podemos descartar que *in vivo* pueda existir una interacción muy compleja entre estas dos vías de regulación ya que estudios de expresión de los papillomavirus en ratones transgénicos han mostrado que la actividad transcripcional de la LCR de HPV-18 es regulada por los glucocorticoides *in vivo* de una manera compleja incluyendo efectos tanto positivos como negativos y que la actividad de los factores AP-1 y de los glucocorticoides se interfiere mutuamente en sus efectos respectivos sobre la transcripción (Cid *et al.* 1993).

Sin embargo todos estos resultados nos llevan al cuestionamiento de cuál es el papel de las hormonas esteroides en el control de la transcripción de las oncoproteínas virales de HVP-18. Aunque como hemos mostrado el receptor se une a su secuencia correspondiente y activa ligeramente la transcripción, es posible que el efecto de las hormonas esteroides *in vivo* sea mucho más complejo de lo que nuestros estudios *in vitro* nos permiten dilucidar. Una posibilidad es que las hormonas esteroides actúen más por mecanismos independientes que por transactivación directa del promotor, por ejemplo se ha sugerido que combinaciones específicas del factor AP-1 son reguladas diferencialmente por la presencia de hormonas esteroides (Diamond *et al.* 1990). De esta manera resulta muy interesante estudiar el papel funcional que podrían jugar los esteroides en determinar la presencia de algunos factores de transcripción.

Esto significa que la inducción directa de la expresión viral por hormonas esteroides constituye sólo un evento marginal que no explicaría el riesgo que representan en el desarrollo del CaCu, por lo que resulta interesante estudiar otros posibles mecanismos que expliquen las evidencias epidemiológicas que sugieren que las hormonas esteroides incrementan el riesgo del desarrollo del CaCu (Brinton *et al.* 1990) y cuáles de estos eventos se encuentran relacionados con los HPVs.

LA FOSFORILACIÓN EN EL CONTROL DE LA TRANSCRIPCIÓN VIRAL

Un blanco común para muchos virus transformantes involucra a las vías reguladas por fosforilación de proteínas. El control bioquímico de la actividad de muchas proteínas es regulado por las actividades relativas de proteínas cinasas y fosfatasas.

Uno de los factores de transcripción que se caracteriza por modificar su actividad por fosforilación, es precisamente el complejo AP-1 y de este complejo mas específicamente c-jun.

El papel de la fosforilación en el control de la expresión temprana de los HPVs ha comenzado solo hasta muy recientemente ha hacerse evidente, entre los trabajos iniciales se ha mostrado que el ester de forbol 12-O-tetradecanoilphorbol 13-acetato (TPA) induce la transcripción del HPV-16 a través de la activación de la proteína cinasa C o PKC (Chan *et al.* 1990)

Por otra parte, recientemente se encontró que la inhibición de la actividad de la PP2A es capaz de transactivar al promotor P-97 localizado en la LCR de HPV-16, en fibroblastos humanos en donde normalmente no se observa ninguna actividad. Basándose en estos resultados se ha propuesto que la fosforilación podría tener un papel muy importante en el control de la expresión de las oncoproteínas virales de HPV-16 (zur Hausen 1994).

La transcripción temprana de HPV-16 al igual que la de HPV-18 es regulada por una serie de factores celulares muy ubicuos como el factor NF-1, CTF, OCT 1, AP-1 y aunque existen algunas discrepancias en la localización y el número de elementos en cis presentes en las LCR, se supone que ambos están sujetos a una regulación muy similar.

En la misma forma que para HPV-16 encontramos que la inhibición de la PP2A por ácido okadaico, resulta en la transactivación del promotor P-105 de HPV-18. Por lo anterior, es posible que tal como se había propuesto, la fosforilación de factores celulares juegue un papel importante en la regulación de la expresión temprana de este virus.

Desde este punto de vista, resultaba muy interesante determinar el efecto del gen Ha-ras sobre la expresión de los oncogenes virales de HPV-18 por las siguientes razones:

- a) Como se sabe, Ha-ras activado incrementa la transcripción de muchos promotores celulares que contienen sitios AP-1 por cambios en el estado de fosforilación del dominio de activación de c-jun, a través de la activación de una cascada muy específica de cinasas, que ya se ha descrito.
- b) El LCR de HPV-18 contiene 2 sitios AP-1 que han mostrado ser cruciales para la actividad del promotor P-105.
- c) El HPV-18 es capaz de inmortalizar células epitellales en cultivo pero sólo puede transformarlas en cooperación con Ha-ras

activado.

En este trabajo nosotros mostramos que la expresión del gen Ha-ras mutado aumenta la actividad transcripcional de la LCR, en comparación con el ligero incremento observado cuando se cotransfecta la versión normal de este gen. Estos resultados muestran que la LCR de HPV-18 es un blanco potencial de Ras activado.

Por otra parte, encontramos que el tratamiento de las células C-33 con ácido okadaico potencia la activación de la LCR mediada por Ras. Resalta el hecho de que el OA modifica la actividad de Ras normal, de tal manera que ahora es capaz de activar la transcripción tanto como lo hace la expresión de Ras mutado.

EL EFECTO DE RAS Y DE OA DEPENDE DE LA INTEGRIDAD DE LOS SITIOS AP1

Un gran número de evidencias han mostrado que Ras activado induce indirectamente la transcripción de genes que son regulados por promotores que contienen sitios AP-1 y que esta inducción es mediada por la fosforilación de c-jun por proteínas cinasas activadas por Ras.

Nuestros resultados con las mutantes de la LCR de HPV-18 nos muestran que el efecto de Ras activado así como la inhibición de la proteína fosfatasa 2A son mediados por los sitios AP-1 presentes en la LCR de HPV-18. Esto nos hace suponer que los factores de transcripción que se unen a los sitios AP-1 de HPV-18 podrían ser blancos de regulación tanto de PP2A como de Ha-ras.

En concordancia con esta suposición, observamos que un plásmido conteniendo 5 elementos consenso AP-1 (pK5), en comparación con otro con el mismo número de elementos AP-1 de HPV-18 (AP-18) dirigiendo al promotor heterólogo de timidín cinasa TK, son activados tanto por Ha-ras como por OA. El efecto potenciador de OA sobre Ha-ras antes descrito, se observa incluso mucho más claro, que sobre la LCR.

Aunque los efectos de los genes Ras y la inhibición de la PP2A sobre el P-105 y los promotores heterólogos sensible a AP-1 fueron similares, observamos algunas diferencias interesantes. Por una parte el efecto de los genes ras sobre la LCR es más pequeño que el que logra sobre los promotores heterólogos, esto podría deberse simplemente al número de sitios AP-1 presentes en los promotores.

Sin embargo, en el caso de la inhibición de la PP2A por ácido okadaico, el efecto sobre la LCR es muy similar al que se observa sobre los promotores heterólogos. Estas diferencias podrían posiblemente reflejar la contribución de múltiples eventos de fosforilación-desfosforilación en la regulación de la actividad AP-1. En

el caso de c-jun por lo menos se ha mostrado que cuando este se encuentra completamente desfosforilado aunque es capaz de unirse al DNA, es sólo parcialmente activo como transactivador (Baker *et al.* 1992) ya que es necesario la combinación de fosforilación en residuos de serinas en el dominio amino terminal de la proteína, junto con algunos residuos desfosforilados en el lado carboxilo para producir un componente totalmente activo.

La fosforilación de los residuos Ser-73 y Ser-63 localizados dentro del dominio transactivador de c-jun aumenta su habilidad para activar la transcripción en forma de homodímero (Smeal *et al.* 1991) o como heterodímero con Fos (Deng & Karin 1994). Estos residuos son fosforilados por las MAPKs o las JNKs, cuya actividad es rápidamente estimulada en respuesta a la activación de Ha-Ras por factores de crecimiento o por radiación UV respectivamente (Karin 1995).

En el caso de los otros miembros de la familia Jun, se ha observado que la actividad tanto de Jun B como de Jun D no es afectada por la expresión de Ha-ras. A pesar de que Jun B también se une a las JNKs, no es fosforilado por estas proteínas ya que sus residuos homólogos de las Ser-63 y Ser-73 no son seguidas por prolinas.

Estos datos concuerdan con la observación de que Jun-B muestra una débil capacidad de transformación en cooperación con Ha-ras, mientras que Jun D ha mostrado incluso antagonizar la transformación mediada por este gen (Pfarr *et al.* 1994).

c-Jun activa a P-105 de manera dependiente de la concentración, mientras que Jun B y Jun D no lo hacen e incluso provocan una ligera disminución en la actividad basal de este promotor.

Como puede observarse, el efecto de c-Jun aumenta en presencia de Ha-ras, solamente que a diferencia de lo mostrado para otros promotores, este efecto es realmente la suma del efecto de Ha-ras más el de c-Jun. La ausencia de cooperatividad entre ambos efectos, puede deberse a la actividad AP-1 tan alta que se ha reportado en diversas líneas celulares establecidas (Wasylyk *et al.* 1988). La actividad de Jun B o Jun D no cambia en presencia de Ha-Ras.

Sin embargo, previamente se ha mostrado que a la secuencia AP-1 de HPV-18 se une preferencialmente Jun B (Thierry *et al.* 1992). Estos datos, aparentemente en controversia, podrían representar eventos de regulación. En general los homodímeros de Jun B y Jun D son transactivadores muy pobres y de hecho son capaces de reprimir la actividad de c-Jun. Curiosamente, Jun B y Jun D son expresados a niveles basales relativamente altos en muchos tejidos (Hirai *et al.* 1989). Posiblemente la activación de c-jun mediada por Ras ocasione que éste compita por el sitio de unión AP-1 mas efectivamente que cuando no se encuentra

fosforilado, desplazando a Jun B.

POSIBLE PARTICIPACION DE LA PP2A EN LA VIA DE RAS

En general las células tratadas con OA responden con un incremento neto en la fosforilación de muchas proteínas celulares y con aumentos en la expresión de algunos de los llamados genes tempranos, entre los que se incluyen c-fos, c-jun y Jun B (Schönthal *et al.* 1991). El aumento en estas proteínas podría explicar el efecto cooperativo que observamos entre la inhibición de la PP2A por OA y la expresión de Ras, sin embargo, el efecto que nosotros observamos sobre los sitios AP-1 tanto consenso como los de HPV-18, no se pueden explicar únicamente por la inducción de estos genes, ya que como hemos discutido anteriormente, el aumento en la concentración de los diferentes Jun en presencia de Ras mutado o de Ras normal, no tienen un efecto tan dramático, como el observado por el tratamiento con OA.

El evento de cooperatividad entre la PP2A y Ha-Ras implicaría que ambas moléculas funcionan en vías complementarias o bien que la actividad de una de ellas aumenta la actividad de la otra.

Tratando de probar si Ha-ras tenía algún efecto sobre la actividad de la PP2A, se utilizaron células transfectadas con las dos versiones del gen Ha-Ras, sin embargo no se observó ningún cambio aparente en la actividad de la PP2A. Resulta interesante que incluso el efecto inhibitorio del OA sobre la actividad de la PP2A no se observa en los extractos celulares crudos tratados con OA, aunque la actividad de la subunidad catalítica de PP2A purificada de músculo cardíaco de bovino es completamente inhibida en presencia de OA. Una posible explicación para estos resultados podría ser la necesidad de un extracto celular mas purificado, que lo haga adecuado para el estudio de regulación que se plantea. Sobre todo si tomamos en cuenta el hecho de que la PP2A es una enzima multimerica, que existen diversos tipos de fosfatasas y que el ensayo que se realiza no es específico para la PP2A.

La participación de las fosfatasas en la cascada de transducción de señales mediada por Ras, comienza apenas a ser estudiado. Recientemente se ha mostrado que la inactivación de las Tyr/Thr fosfatasas puede activar tanto las MAPKs como las MAPKKs. De esta manera, pareciera que la activación de las MAPKs pudiera involucrar tanto activación de cinasas como inactivación de fosfatasas (Alessi *et al.* 1993). De hecho se ha caracterizado la fosfatasa MKP-1, que ha mostrado ser altamente específica para la MAPK (Charles *et al.* 1992).

Aparentemente, después de la activación de la cascada de las MAPKs por Ras, sería necesario inicialmente la inactivación de una fosfatasa con el propósito

de potenciar la señal. Posteriormente se requeriría su activación para que ésta actuara como un switch o regulador, inactivando la cascada de las MAPKs. El uso del OA ha mostrado que uno de sus efectos es precisamente el aumentar la actividad de las MAPKs (Samuels *et al.* 1993), lo que indica que en la misma forma que las fosfatasas de tirosina, también participan las de serina-treonina. Esto hace suponer que diversas fosfatasas regularían puntos diferentes de la vía.

Específicamente la PP2A ha mostrado ser capaz de defosforilar *in vitro* a c-Jun en los sitios de regulación negativa. Sin embargo, aún queda por determinar si esta proteína es un sustrato de esta enzima *in vivo* (Alberts *et al.* 1993). De esta manera podríamos explicar la potenciación de la actividad de la transcripción de HPV-18 por el aumento en la fosforilación de c-Jun, logrado por el efecto dual de la activación de la cascada de Ras y la inactivación de la PP2A.

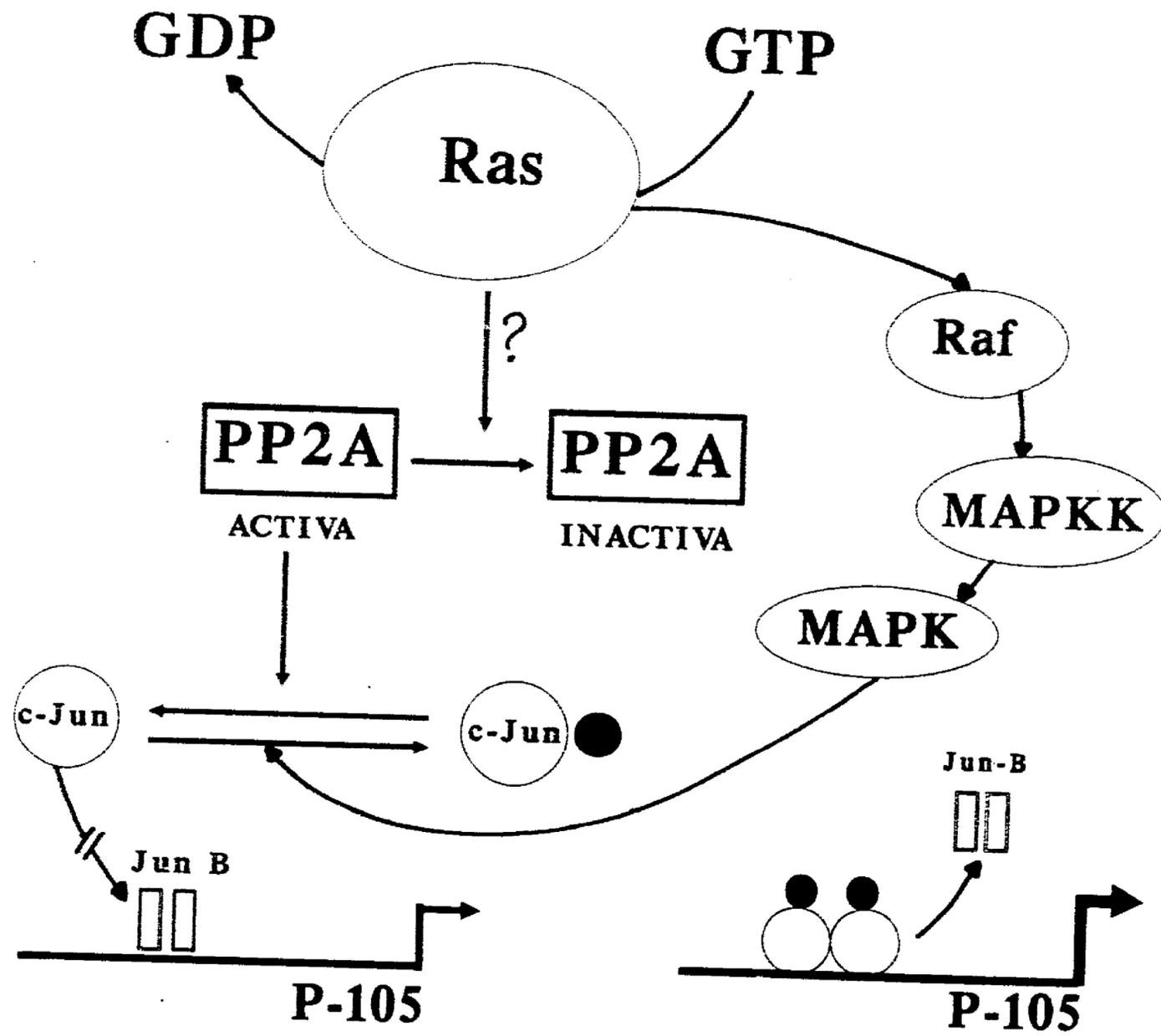
La regulación utilizando a las fosfatasas introduce una nueva faceta de control. ¿Qué determinaría estos ciclos de activación/inactivación de las fosfatasas? Una posibilidad que nosotros hemos considerado es que el mismo Ras pudiera controlar estos ciclos de activación dependiendo del nucleótido que tiene unido o lo que es lo mismo su estado de activación (Fig. 8)

EFECTO DE Ha-Ras Y OA EN LA EXPRESION DE E6/E7 DE HPV-18

Un gran número de reportes han indicado que la expresión de la proteína E7 de HPV-16 puede inducir alteraciones cromosómicas en queratinocitos (Hashida 1991). Por otra parte, se ha observado que fibroblastos humanos que expresan las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 muestran alteraciones en el ciclo celular (representado por fallas para detener la progresión del ciclo celular en respuesta a señales negativas de crecimiento) y poliploidía (White 1993).

Es interesante que las células HeLa positiva para HPV-18 que de manera estable expresan ya sea la versión mutada o la normal del gen Ha-ras muestran algunas alteraciones morfológicas dramáticas entre las que se incluyen la aparición de células gigantes multinucleadas y con formación de micronúcleos. Estas células gigantes llevan a cabo un número muy limitado de divisiones antes de morir. Entre otras alteraciones observadas en estas células se observa que hay un incremento en el número de cromosomas y hay un aumento en la población de células con un gran contenido de DNA (Miranda *et al.* en prensa).

Una posible explicación es que los cambios observados en las células He-La transfectadas con Ha-ras se deba a que tanto la versión normal como la mutada de este gen inducen los principales transcritos observados en He-La. La expresión aumentada de E6/E7 destruye los puntos de control del ciclo celular y lleva a diversas alteraciones en los cromosomas y finalmente sobre la estructura nuclear.



Algunos experimentos preliminares han mostrado que la línea celular C-33 negativa para HPV transfectada con Ha-ras no muestran los cambios morfológicos tan dramáticos observados en las células He-La (C. Santana comunicación personal), lo que refuerza la idea de que el fenotipo de estas células podría deberse a la alta expresión de E6/E7.

El hallazgo de que tanto la expresión de la versión normal o mutada de Ha-ras induce la expresión de los principales transcritos de E6/E7 en células He-La, indican que la actividad inapropiada de Ha-ras tanto por sobreexpresión de un alelo normal o por una mutación activante ocasionan similares efectos tanto sobre la expresión de E6/E7 y las alteraciones morfológicas antes mencionadas. Estos resultados resultan muy atractivos ya que en algunos reportes se ha encontrado la amplificación de genes Ha-ras en tumores de CaCu (Kiroshita 1994), y en el laboratorio se ha observado una incidencia muy alta de mutaciones en Ki-ras en adenocarcinomas cervicales (M. Lizano, resultados sin publicar).

Los datos disponibles sugieren que la expresión de E6/E7 de los HPVs de alto riesgo son decisivos para el fenotipo proliferativo y maligno del CaCu. Aparentemente en una célula normal existiría una estricta regulación de la expresión de los oncogenes virales, lo que evitaría el avance de lesiones de las células infectadas de manera latente. En las fases iniciales del desarrollo de un carcinoma ocurriría la destrucción de la cascada de regulación intracelular (zur Hausen 1994). Nuestros datos sugieren que Ha-ras y PP2A constituyen puntos importantes de control intracelular sobre el control de la transcripción de los oncogenes de HPV y posiblemente explicaría en parte la cooperación entre Ras y HPV para transformar células epiteliales.

¿RAS Y LA PP2A SON CIF?

Es difícil contestar esta pregunta, existen muchos datos que apuntan a las fosfatasa como supresores normales del crecimiento. Sin embargo, específicamente la sobreexpresión de la PP2A provoca la activación de los sitios AP-1 (Alberts *et al.* 1993), lo que significa que no es únicamente la actividad de esta enzima la que confiere la característica de una actividad normal, sino que es necesario una actividad controlada.

Si como nosotros suponemos Ras podría modular la actividad de la PP2A y viceversa, entonces cada una de estas proteínas representaría uno de los elementos de una vía de control intracelular normal que impide la desregulación de la expresión de los oncogenes virales de HPV.

Muchas evidencias han mostrado que la expresión del oncogen Ha-ras activado no es suficiente para inducir crecimiento maligno, sino que aparentemente

es necesaria la inactivación de un gen supresor para alcanzar el estado transformado. Tomando en cuenta el modelo de interferencia celular propuesto (zur Hausen 1994), es posible añadir a ras como uno de los participantes en esta vía de control intracelular.

Dentro del modelo de control celular sobre la expresión viral propuesto por zur Hausen, podríamos establecer que el estado de fosforilación de los factores AP-1 sería determinante en la expresión de los oncogenes virales. De tal manera que no sólo la inhibición de la PP2A provocaría un aumento en la fosforilación de estos factores, sino también el incremento en la actividad de H-Ras cooperando con PP2A (Fig. 9)

Sin embargo, la sobreexpresión de las proteínas virales no es suficiente para explicar la transformación maligna y son necesarios eventos adicionales para llevar a una célula hacia la tumorigenicidad.

Es claro que el aumento en la expresión de las proteínas virales podría no ser el único evento promovido por la activación de Ras, sino que al mismo tiempo provocaría el mismo efecto sobre algunos genes celulares dependientes de promotores AP-1, que participarían en la progresión del estado transformado de la célula. Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión de Ha-Ras aumenta la transcripción del gen MDR1, que es un gen que confiere a las células resistencia a las drogas citotóxicas, utilizadas comúnmente como quimioterapia (Chin *et al.* 1992). Mientras que en fibroblastos transformados por Ras se ha observado un patrón alterado en la expresión de proteasas en comparación con el normal (Zhang & Schultz 1992).

De esta manera, resultaría interesante estudiar qué otros genes son alterados en su expresión por Ha-Ras y la inactivación de la PP2A y el papel que juegan en la progresión del cáncer cervical. Posiblemente algunos de estos genes estarían involucrados en el compromiso de una célula con un determinado programa, como el de proliferación.

Por otra parte, es posible que otros efectos de Ras y PP2A sobre las oncoproteínas virales sean necesarios para explicar la transformación maligna. De esta forma es claro que se necesita continuar esta investigación para aclarar la contribución exacta de esta vía en los procesos de carcinogénesis del cérvix y otros posibles efectos de Ha-ras en la progresión del fenotipo maligno.

FACTORES HUMORALES

↓
RECEPTORES

↓
Ras

↓ **Proteína fosfatasa 2A**

Cinasas moduladas por Ras ↓

↓
FOSFORILACION DE FACTORES AP-1

↓
**DESREGULACION POR AUMENTO EN LA
TRANSCRIPCION DEL PROMOTOR P-105**

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos del presente trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

Respecto al elemento de respuesta a glucocorticoides:

- 1.- Existe un único sitio GRE en la región control del papilomavirus tipo 18, el otro sitio potencial no contribuye a la respuesta a hormonas esteroides.
- 2.- Una mutación puntual en el sitio GRE1 es suficiente para perder la respuesta inducida por una versión activada del receptor a glucocorticoides.
- 3.- El sitio GRE de HPV-18 actúa como un modulador positivo de la transcripción.
- 4.- La secuencia GRE de HPV-18 se une a un receptor GR purificado a partir de un sistema de traducción bacteriano. Esta unión es más débil a la observada con el sitio GRE consenso, pero no es reproducida por un oligo conteniendo la mutación descrita.
- 5.- No existe ninguna interacción obvia entre algún factor celular y la secuencia GRE de HPV-18 o en la vecindad.
- 6.- La proteína brahma, componente de un complejo proteico que modula la estructura de la cromatina y que ha mostrado cooperar con el GR en la activación de promotores dependientes de glucocorticoides, no mostró este comportamiento al activar la transcripción de HPV-18.
- 7.- No se observó ninguna interacción funcional con los factores de transcripción AP-1, a pesar de que ha sido reportado para otros promotores, la existencia de interacciones tanto positivas como negativas entre los GRE y los AP-1.
- 8.- Todos estos resultados nos llevan a la conclusión de que el papel exacto de la regulación hormonal sobre el HPV-18 podría ser a un nivel más complejo que el de únicamente el control de la transcripción de los oncogenes de HPV-18.

Respecto a la regulación por Ha-Ras y la PP2A encontramos:

- 1.- La versión mutada del oncogen Ha-Ras incrementa la actividad transcripcional del HPV-18, por lo menos tres veces en comparación con el incremento marginal que promueve la versión normal de este gen.

2.- La inhibición de la PP2A por el ácido o adaico, incrementa la actividad del HPV-18 en forma similar a lo previamente reportado para el HPV-16.

3.- El tratamiento con OA incrementa la actividad tanto del Ha-Ras normal como la del mutado, más que un efecto aditivo.

4.- Los efectos de la versión mutada de Ha-Ras y OA depende de la integridad de los sitios AP-1.

5.- El elemento AP-1 de HPV-18 fuera del contexto del promotor puede ser activado por Ha-Ras (ambas versiones) y por OA tan eficientemente como el sitio AP-1 consenso.

6.- El promotor P-105 de HPV-18 es activado por c-Jun de una manera dependiente de la dosis, mientras que Jun D y Jun B no lo hacen e incluso disminuyen ligeramente la actividad del promotor. El efecto de c-Jun se suma al efecto obtenido por Ha-Ras, de una manera aditiva y no cooperativa como ha sido reportada para otros promotores.

7.- Utilizando la línea celular HeLa positiva para HPV-18 expresando de manera estable la versión normal del gen Ha-ras provoca un ligero aumento en la expresión de los oncogenes virales (evaluada por la cantidad de transcrito E6/E7), mientras que la versión mutada provoca un aumento mayor.

8.- La fosforilación de factores de transcripción específicos parecen tener claras implicaciones en la actividad del promotor viral de HPV-18.

REFERENCIAS.

Alberts AS, Deng T, Lin A, Meinkoth JL, Schöntal A, Mumby MC, Karin M, Feramisco JR (1993) Protein phosphatase 2A potentiates activity of promoters containing AP-1 binding elements. *Mol. Cell Biol.* 13:2104.

Alessi D, Smythe C, Keyse S (1993) The human CL100 gene encodes a Tyr/Thr protein phosphatase which potently and specifically inactivates Map kinase and suppresses its activation by oncogenic Ras in *Xenopus* oocyte extracts. *Oncogene* 8:2015.

Androphy EJ, Lowy DR, Schiller JT (1987) Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature* 325:70.

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

Angel P & Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation *Biochem. Biophys. Acta* 1072: 129.

Atkin NB & Baker MC (1988) Deficiency of all or part of chromosome 11 in several types of cancer: significance of the reduction in the number of normal chromosome 11. *Cytogenet Cell Genet* 47:106.

Baker SJ, Kerppola TJ, Luk D, Vanderberg MT, Marshak DR, Curran T, Abate C (1992) Jun is phosphorylated by several protein kinases at the same sites that are modified in serum stimulated fibroblast. *Mol. Cell. Biol.* 12:4694.

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

Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT (1989) Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc binding proteins *J. Virol.* 63: 1404.

Bartsch D, Boye B, Baust C, zur Hausen H, Schwarz E (1992) Retinoic acid-mediated repression of human papillomavirus 18 transcription and different ligand regulation of the retinoic acid receptor β gene in non-tumorigenic and tumorigenic HeLa hybrid cells. *EMBO. J.* 11:2283.

Bauknecht T, Angel P, Royer HD, 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.

- Beato M (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56:335.
- Binétruy B, Smeal T, Karin M (1991) Ha-ras augments c-jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* 351: 122
- Brinton LA, Reeves WC, Breinas MM, Herrero R, de Britton RC, Gaitan E, Tenorio F, García M, Rawis WE (1990) Oral contraceptive use and risk of invasive cervical cancer. *Int. J. Epidemiol.* 19:4.
- Bishop JM (1987) The molecular genetic of cancer. *Science* 235:305.
- Blenis J (1993) Signal transduction via the MAP kinases: Proceed at your own RSK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5889.
- Bos JL (1989) ras oncogenes in human cancer. *Cancer Res.* 49: 4682.
- Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H (1984) A new type of papillomavirus DNA its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer *EMBO J.* 3:1151.
- Bremmer R & Balmain A (1990) Genetic changes in skin tumor progression: correlation between presence of a mutant ras gene and loss of heterozygosity on mouse chromosome 7. *Cell* 61:407.
- Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojkier M, Karin M (1989) Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor α . *Nature* 337:661.
- Butz K & 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.
- Chan WK, Klock G, Bernard HV (1989) Progesterone and glucocorticoid control elements occur in the long control regions of several human papillomavirus involved in anogenital neoplasia. *J. Virol.* 63:3261.
- Chan WK, Chong T, Bernard HU, Klock G (1990) Transcription of the transforming genes of the oncogenic human papillomavirus-16 is stimulated by tumor promoters through AP-1 binding sites. *Nucleic. Acid. Research* 18:763.
- Charles C, Ablar A, Lau L (1992) cDNA Sequence of a growth factor-inducible immediate early gene and characterization of its encoded protein. *Oncogen* 7:187.
- Chiang CM, Ustar M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT (1992) Viral E1 and

E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomavirus origin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89: 5799.

Chin KV, Veda K, Pastan I, Gottesman MM (1992) Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 255:459.

Cid-Arregui A, Auewarakul P, García Carrancá A, Ovselovich R, Gaissert H, Gissmann L (1993) Characterization of the human papillomavirus (HPV) type 18 Upstream Regulatory Region in transgenic mice. *J. Virol* 67:6742.

Cobrinik D, Dowdy SF, Hinds PW, Mittnacht S, Weinberg RA (1992) The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *TIBS* 17:312.

Cohen P (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 58:453.

Cohen JB & Levinson AD (1988) A point mutation in the last intron responsible for increased expression and transforming activity of the c-Ha-ras oncogene. *Nature* 334:119.

Curran T & Morgan J (1985) Superinduction of c-fos by Nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines. *Science* 229:1265.

Davis RJ (1993) The mitogen-activated protein Kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 268:14553.

de Ronde A, Sol CJA, Van Strien A, ter Schegget J, van der Noorda J (1989) The SV 40 small t antigen is essential for the morphological transformation of human fibroblast. *Virology* 171:260.

De Villiers EM (1989) Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J. Virol.* 63: 4898.

Deng T & Karin M (1994) c-fos transcriptional activity stimulated by H-Ras activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* 371:171.

Der C, Krontiris T, Cooper G (1982) Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:3637.

Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barret T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994) JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-jun activation domain. *Cell* 76:1025.

Devary Y, Gottlieb RA, Lau LF, Karin M (1991) Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2804.

Di Paolo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Notario V, Doninger J (1989) Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey-ras. *Oncogene* 4:395.

Diamond MI, Miner JN, Yoshinaga SK, Yamamoto KR (1990) Transcription factors interaction: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* 240: 1266.

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

Dürst M, Croce CM, Gissmann L, Schwarz E, Huebner K (1987) Papillomavirus sequence integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1070.

Dürst M, Gallahan D, Jay G, Rhim JS (1989) Glucocorticoid enhanced neoplastic transformation of human Keratinocytes by human papillomavirus type 16 and an activated ras oncogene *Virology* 173: 767.

Dürst M, Gilitz D, Schneider A, zur Hausen H (1992) Human papillomaviruses type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by *in situ* hybridization. *Virology* 189:132.

Epstein MA, Achong BG, Barr YM (1964) Virus particles in cultured lymphoblasts of Burkitt's lymphoma. *Lancet* i:702.

Essex M, Todaro G, zur Hausen H (1980) Viruses in naturally occurring cancers. *Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation* Vol. 7.

Finney RE & Bishop JM (1993) Predisposition to neoplastic transformation caused by gene replacement of H-ras 1. *Science* 260:1524.

Firzlaff JM, Galloway DA, Eisenman RN, Lüscher B (1989) The E7 protein of human papillomavirus type 16 is phosphorylated by casein Kinase II. *New Biologist* 1: 44.

Garcia-Carrancá A, Thierry F, Yaniv M (1988) Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus 18. *J. Virol* 63:4321.

Gissman L & zur Hausen H (1976) Human papilloma viruses: Physical mapping and

genetic heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:569.

Gloss B, Bernard HU, Seedorf K, 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.

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

Gloss B & Bernard HV (1990) The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant SP-1 distal element *J. Virol* 64:5577.

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

Herschman HR (1991) Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters *Ann. Rev. Biochem* 60: 281.

Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M (1993) Identification of an oncoprotein and UV responsive protein kinase that bind and potentiate the c-jun activation domain. *Genes Dev.* 7:2135.

Hildesheim A, Reeves WC, Brinton LA, Lavery C, Brenes M, De la Guardia ME (1990) Association of oral contraceptives use and human papillomaviruses in invasive cervical cancers. *Int. J. Cancer* 45:680.

Hirai S, Ryseck RP, Mehta F, Bravo R, Yaniv M (1989) Characterization of jun D: a new member of the jun proto-oncogen family. *EMBO J.* 8:1433.

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

Hunter T & Pines I. (1994) Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79:573.

Ishiji T, Lace MJ, Parkhinen S, Anderson RD, Hangen TH, Cripe TP, Xiao JH, Davidson I, Chambon P, Turek LP (1992) Transcriptional enhancer factor (TEF-1) and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J.* 11:

2271.

Jantzen HM, Sträle U, Gloss B, Stewart F, Schmid W, Boshart M, Miksicek R, Schültz G (1987) Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene. *Cell* 49:29.

Joshi B & Rundell K (1990) Association of simian virus 40 small t antigen with the 61-kilodalton component of a cellular protein complex. *J. Virol* 64:5649.

Kalderon D & Smith AE (1984) In vitro mutagenesis of a putative DNA binding domain of SV 40 large T. *Virology* 139: 109.

Kanda T, Watanabe S, Yoshiike K (1988) Immortalization of primary rat cells by human papillomavirus type 16 subgenomic fragments controlled by the SV40 promoter. *Virology* 165: 321.

Karin M (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 270:16483.

Kataoka T, Powers S, Cameron S, Fasano O, Goldfarb M, Broach J, Wigler M (1985) Functional homology of mammalian and yeast ras genes. *Cell* 40:19.

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

Kiroshita M, Katsuragi K, Shin S, Aono T (1994) Amplification and point mutation alterations of oncogenes in patients with cervical cancer-associated human papillomavirus. *Biomedical Research* 14(6):403.

Kruijer W, Cooper JA, Hunter T, Verma IM (1984) Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein.

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB (1992) Wild type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:7491.

Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD (1992) Altered cell cycle arrest and gene amplification potentials accompany loss of wild-type p53. *Cell* 79:573.

Lowy DR, Kirnbauer R, Schiller JT (1994) Genital human papillomavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2436.

Lucibello FC, Slater EP, Jooss KU, Beato M, Muller R (1990) Mutual transrepression of Fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in Fos

which is absent in Fos B. EMBO J. 9:2827.

Mack DH & Laimins LA (1991) A Keratinocyte-specific transcription factor, KRE-1, interacts with AP-1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci USA 88: 9102.

Marshall CJ (1994) MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. Genetic & Development 4:82.

Martin P, Vass WC, Schiller JT, Lowy DR, Velu TJ (1989) The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1 receptors. Cell 59: 21.

Marx J (1994) Oncogenes reach a milestone. Science 266:1942.

Mc. Cormick F (1993) How receptors turn Ras on. Nature 363:15.

Mechta F, Plette J, Hraiss, Yaniv M (1989) Stimulation of protein Kinase C or protein Kinase A mediated signal transduction pathways shows three modes of response among serum inducible genes. New. Biol. 1: 297.

Mittal R, Pater A, Pater RR (1993) Multiple human papillomavirus type 16 glucocorticoid response elements functional for transformation, transient expression and DNA-protein interactions. J. Virol. 67:5656.

Moodle SA & Wolfman (1994) The 3 Rs of life. Ras, Raf and growth regulation. TIG 10: 44.

Muchardt C & Yaniv M (1993) A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SW12 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. EMBO. J. 12:4279.

Münger K, Phelps WC., Bubb V, Howley PM, 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.

Murray AW (1992) Creative blocks, cell cycle checkpoints and feedback controls. Nature 359:599.

Ofir R, Duaki VJ, Rashid D, Verma I (1990) Phosphorylation of the c-terminus of Fos protein is required for transcriptional trans-repression of the c-fos promoter. Nature 348:80.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1993) Estimates of the worldwide incidence of eighteen mayor cancers. *Int. J. Cancer* 54:594.

Pater MM & Pater A (1991) RU 486 inhibits glucocorticoid hormone-dependent oncogenesis by human papillomavirus type 16 DNA. *Virology* 183:799.

Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase. *EMBO J.* 10:885.

Pecoraro G, Lee M, Morgan D, Defendi U (1991) Evolution of *In vitro* transformation and tumorigenesis of HPV-16 and HPV-18 immortalized primary cervical epithelial cells. *American J. Phathol.* 173:1.

Pelech SL & Sanghera JS (1992) Mitogen-Activated Protein Kinases: Versatile Transducers for Cell signalling. *Trend Biochem. Sci.* 17:233.

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

Pfarr CM, Mehta F, Spyrou G, Lallemand D, Carillo S, Yaniv M (1994) Mouse Jun D negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell* :746.

Rahmsdorf HJ, Schonthal A, Angel P, Litfin M, R  ther U, Herrlich P (1987) Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA expression. *Nucleic. Acid. Research* 15:1643.

Rauscher FJ, Cohen DR, Curran T, Bos TJ, Vogt PK, Bohmann D, Tjian R, Franza BR Jr. (1988) Fos-associated protein (p39) is the product of the jun proto-oncogene. *Science* 240:1010.

Rigoni-Stern D (1842) Fatti statistic relativi alle malatia cancerose. *G. Serv. Prog. Pathol. Therap* 2: 507.

Romanczuk H, Thierry F, Howley PM (1990) Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 p97 and type 18 p105 promoters. *J. Virol.* 64: 2849.

R  sl F, D  rst M, zur Hausen H (1988) Selective supression of human papillomavirus transcription in non tumorigenic cell by 5-aza-cytidine. *EMBO J.* 7:1321.

Ryseck RP, & Bravo R (1991) c-jun, JUN B and JUN D differ in their binding

affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of Fos proteins. *Oncogene* 6:533.

Samuels ML, Weber MJ, Bishop JM, Mc Mahon M (1993) Protein phosphatase 2A potentiates activity of promoters containing AP-1 binding elements. *Mol. Cell. Biol.* 13:2104.

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

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63:1129.

Schöntal A, Herrlich P, Rahmsdorf HJ, Ponta H (1988) Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation for collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell* 54:325.

Schöntal A, Alberts AS, Frost JA, Feramisco JR (1991) Differential regulation of jun family gene expression by the tumor promoter okadaic acid. *New. Biol.* 3:977.

Schütte J, Minna JD, Birrer MJ (1989) Deregulated expression of human c-jun transform primary rat embryo cells in cooperation with an activated c-Ha-ras gene and transforms Rat 1a cells as a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2257.

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

Smeal T, Binetruy B, Mercola DA, Birrer M, Karin M (1991) Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-jun on serines 63 and 73. *Nature* 354:494.

Smeal T, Binetruy B, Mercola D, Grover B.A, Heldecker G, Rapp U.R. Karin M (1992) Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73. *Mol. Cell. Biol.* 12: 3507.

Smits HL, Raadsheer E, Rood Ise, Mehendale S, Slater RM, van der Noorda J, ter Schegget J (1988) Induction of anchorage-independent growth of human embryonic fibroblasts with a deletion in the short arm chromosome 11 by human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virol.* 62:4538.

Smits PH, Smits HL, Jebbink MF, ter Shegget J (1990) The short arm of chromosome 11 likely is involved in the regulation of the human papillomaviruses

type 16 early enhancer-promoter and in the suppression of the transforming activity of the viral DNA. *Virology* 176:158.

Smits PHM, de Ronde A, Smits HL, Minnaar RP, van der Noorda J, ter Schegget J (1992a) Modulation of the human papillomavirus type 16 induced transformation and transcription by deletion of loci on the short arm of human chromosome 11 can be mimicked by SV-40 small t. *Virology* 190:40.

Smits PHM, Smits HL, Minnaar RP, Hemmings BA, Mayer-Jaekel RE, Schuurman R, van der Noorda J, ter Schegget J (1992b) The 55 KDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A plays a role in the activation of the HPV-16 long control region in human cells with a deletion in the short arm of chromosome 11 *EMBO J.* 11:4601.

Smotkin D, Prokoph H, Wettstein FO (1989) Oncogenic and non oncogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J. Virol.* 63: 1441.

Standbridge EJ (1990) Human tumor suppressor genes *Annu. Rev. Genet.* 24:615.

Temeles GL, Gibbs JB, D'Alonzo JS, Sigal IS, Scolnick ME (1985) Yeast and mammalian Ras proteins have conserved biochemical properties. *Nature* 313:700.

Thierry F & Yaniv M (1987) The BPV-1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV-18 regulatory region. *EMBO J.* 6:3391.

Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, Howley P (1992). Two AP-1 sites binding Jun B are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J. Virol* 66:

Wasylyk C, Wasylyk B, Heidecker G, Huleihel M, Rapp URR (1989) Expression of raf oncogenes activates the PEA1 transcription factor motif. *Mol. Cell. Biol.* 9:2247.

Werness BA, Levine AJ, Howley PM (1990) Association of human papillomavirus types 16 and 18 with p53. *Science* 248:76.

Werness BA, Münger K, Howley PM. (1991) Role of the human papillomaviruses in Human Cancer, *Cancer Res* 51:5019

White AE, Livanos EM, Tlsty TD (1994) Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes & Dev.* 8:666.

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D (1993) p21 is a

universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366:701.

Yang L, Li R, Mohr IS, Clark R, Botcham MR (1991) Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factors E2. *Nature* 353: 628.

Yang SI, Lickteig RL, Estres RC, Rundell K, Walter G, Mumby MC (1991) Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small t antigen. *Mol. Cell. Biol.* 64:1988.

Yokota J, Tsunetsugu-Yokota Y, Battifora H, Le Fevre C, Cline MJ (1986) Alterations of myc, myb and Ha-ras proto-oncogenes in cancer are frequent and show clinical correlation. *Science* 231:261.

Zhang JY & Schultz RM (1992) Fibroblast transformed by different ras oncogenes show dissimilar patterns of protease gene expression and regulation. *Cancer Res.* 52:6682.

zur Hausen H (1986) Intracellular surveillance of persisting viral infections. *Lancet* ii: 489-491.

zur Hausen H. (1987) The role of papillomaviruses in human anogenital cancers In: *The Papoviridae* Vol. 2 p. 245 Plenum Press, New York.

zur Hausen H (1991) Viruses in human cancer. *Science* 254: 1167.

zur Hausen H (1994) Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. In *Human Pathogenic Papillomaviruses Current Topics in Microbiology and Immunology* Vol. 186 pp 131-156.