

109



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

“PAPILOMAVIRUS HUMANO Y CANCER”

Tesis que presenta

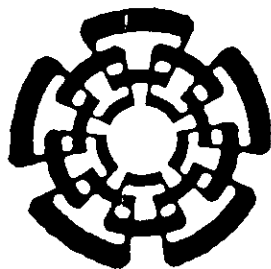
MARÍA DEL ROCÍO L. ZAMORANO ULLOA

Para obtener el título de

B I O L O G O

2000

Los Reyes Iztacala, Edo. Méx., junio del 2000.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Con todo mi amor dedico esta tesis a mis padres que en vida me alentaron siempre a seguir adelante, por todas sus enseñanzas, por su amor y protección que aún después de muertos me acompañan a todas partes.

A mi amado esposo Gerardo, por su apoyo incondicional, sus valiosos consejos y enseñanzas.

A mis hijas: Andrea y Mariana, que son mi más grande alegría y mi mayor estímulo.

Agradecimientos:

A todos los integrantes de los Laboratorios 24 y 25 del Departamento de Genética y Biología Molecular: Ricardo Rosales, José L. Ramírez, Consuelo Rodríguez, Lorena Gutiérrez, Rodolfo Ocadiz, Miguel Cruz, Alejandro García Carrancá, Miriam Guido, Efraín Garrido, Luis Marat Alvarez, Esther López, Enrique Miranda, Mauricio Salcedo, Rene Saucedo, Elba Carrillo, Enrique García, Cristina Castañeda, Adriana Lemarroy, Luis Jabe, Araceli Velásquez, Alberto Marroquí, Luz María Rangel, Ma. Eugenia Manjarrez, Rosa María Cruces, Gabriela Mora, Guadalupe Villasana.

A mis compañeros de la segunda generación del Plan Modular de la Carrera de Biología, especialmente a “las locuras”: Edith, Aurora, Refugio y Pilar; por todas la experiencias que vivimos juntos durante cuatro inolvidables años y porque hemos seguido alimentando una amistad que será para toda la vida.

A mis amigos Pedro Chávez, Carolina Miranda, Elena Castro y Edith Garay, por su apoyo en momentos difíciles, por compartir mis alegrías y por permitirme ser parte de sus vidas.

A mis hermanos: Jorge, Miguel, Armando, Rafael, José, Dulce, Gina, Sergio, Lourdes y José Antonio, por su apoyo, por su cariño y por la unión que existe entre nosotros, que es la mejor herencia que nuestros padres pudieron darnos.

A mi “otra familia”: Tito, Daniel, Margarita, Paty, Chelo, Rafa, Cony y todos los demás, por ser tan buena honda. Especialmente a Raquel por haberme brindado su ayuda, comprensión y apoyo incondicional.

Agradezco muy especialmente al Dr. Patricio Gariglio Vidal, Profesor Titular del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación durante 15 años, durante los cuales conté con su apoyo, asesoría y dirección en mi desarrollo profesional.

Al Dr. Juan Gerardo Valadez Sánchez por su asesoría en la redacción y revisión del presente manuscrito, por su apoyo y valiosas observaciones.

A los doctores Ignacio Peñalosa Castro, Sergio Vaca Pacheco, Rafael Jiménez y Diego Arenas, sinodales en mi examen de grado, por sus atinados comentarios, críticas y sugerencias, así como por la buena disposición mostrada.

INDICE

PARTE I: ANTECEDENTES PROFESIONALES	Pág. i
ANEXO I: CONTRATOS LABORALES	vi
ANEXO II: COMPROBANTES DE CONGRESOS	vii
ANEXO III: ARTICULOS PUBLICADOS	viii
ANEXO IV: CURSOS DE ESPECIALIZACIÓN	ix
ANEXO V: REPORTE TÉCNICO	x
ANEXO VI: PREMIO "ISMAEL COSÍO VILLEGAS"	xi
PARTE II: PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) Y CANCER	1
A. INTRODCCIÓN	1
1. Biología Molecular del Cáncer	1
2. Aspectos generales del cáncer cérvico-uterino	1
3. Biología Molecular de los papilomavirus humanos (HPV)	2
3.1. Composición de los viriones y organización general del genoma	2
3.2. Región grande de control (LCR) y regulación de la transcripción temprana	3
3.3. La proteína E2 de HPV	5
3.4. Proteínas E6 y E7 de HPV	7
3.5. Especificidad tisular de los papilomavirus	7
3.6. Posibles mecanismos de transformación por HPV	8
B. METODOLOGÍA Y RESULTADOS	10
C. DISCUSION	11
D. REFERENCIAS	13

PARTE I: ANTECEDENTES PROFESIONALES

Después de haber concluido los módulos 1-5 del Plan Modular de la carrera de Biología en la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Campus Iztacala, UNAM, me incorporé al laboratorio a cargo del Dr. Patricio Gariglio Vidal, Profesor titular del Departamento de Genética y Biología Molecular, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I. P. N. a fin de prestar mi Servicio Social del 5 de julio de 1982 al 5 de febrero de 1984. Este consistió en la obtención y purificación de anticuerpos específicos contra la Proteína 32 (P32) del bacteriófago T4. El programa de actividades del Servicio Social consistió en:

- a) La obtención de anticuerpos específicos contra (P32) por medio de inmunizaciones periódicas.
- b) Purificación parcial de dichos anticuerpos empleando precipitaciones diferenciales con sulfato de amonio.
- c) Purificación de inmunoglobulinas gama totales (IgG) utilizando columnas de afinidad de Proteína A-Sefarosa.
- d) Ensayo de Ribonucleasas contaminantes en la IgG purificadas.

Una de las líneas de Investigación en el laboratorio a cargo del Dr. Patricio Gariglio era a purificación de genes activos en transcripción. Se empleaba como modelo el minicromosoma del virus de simio 40 (SV40) por su simplicidad y semejanza con la cromatina celular. Los anticuerpos purificados durante mi Servicio Social fueron utilizados para intentar la purificación de los complejos activos en transcripción en la tesis doctoral del M. en C. José Luis Rosales Ramírez y en la tesis de licenciatura del P. de Biol. Ricardo Rosales Ledesma.

Mi participación en la obtención y purificación de dichos anticuerpos me brindó la oportunidad de asistir como coautor a un congreso:

1. Rosales, R., J. L. Ramírez, R. Zamorano, P. Gariglio y A. Chestier. "Avances en la purificación de genes activos en transcripción". XIV Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Guadalajara, Jal. México. Noviembre de 1982.

Otra estrategia propuesta para lograr el objetivo de la purificación de los minicromosomas transcripcionalmente activos, fue utilizar anticuerpos producidos por pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico; los cuales, se pensaba, al reaccionar con los complejos ribonucleoproteicos, inmunoprecipitarían con el minicromosoma de SV40 activo en transcripción. En esta segunda estrategia participé de 1983 a 1986, teniendo la oportunidad de colaborar con otros profesionistas relacionados con el campo de la Biomedicina y de la Biología Molecular, permitiéndome así un mejor desarrollo y superación académica y originando las siguientes comunicaciones a congresos:

1. Zamorano, R., C. Rodríguez y P. Gariglio. "Uso de anticuerpos de Enfermos con Lupus Eritematoso para la purificación de complejos Ribonucleo-protéicos". XV Congreso Nacional de Microbiología. Veracruz, Ver. México. Junio de 1984.
2. Chávez-O., P., C. Fernández-T., A. García-C., R. Zamorano-U. y P. Gariglio. "Microscopía electrónica de macromoléculas aplicada a estudios de virus". XV Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Morelia, Mich., México. Agosto de 1984.
3. Miranda-Peralta, E., R. Zamorano-Ulloa, T. E. Garay-Rojas y P. Gariglio-Vidal. "El minicromosoma de SV40 como modelo para el estudio de la regulación de la expresión genética en eucariontes". XVI Congreso Nacional de Microbiología. Ciudad de México. Junio de 1986.
4. Zamorano, R., P. Gariglio y M. Cruz. "Inmunodetección de antígenos nucleares reconocidos por pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES)". XVI Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Xalapa, Ver., México. Noviembre de 1986.

Paralelamente y como parte del grupo de investigación del Dr. Gariglio, tomé mi primer curso de especialización:

- "Curso teórico-práctico de microscopía electrónica de macromoléculas", impartido por el Dr. Charles Dauguet del Departamento de Virología del Instituto Pasteur, París, Francia y por el Dr. Charles Braker de la Universidad de Purdue, Indiana, E.U.A.

El curso se verificó en el Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, México del 23 al 25 de noviembre de 1983.

Debo mencionar que a partir del 16 de enero de 1984, el Dr. Patricio Gariglio Vidal me brindó la oportunidad de permanecer en su grupo de investigación, ahora como trabajador del CINVESTAV con el nombramiento de Auxiliar de Investigación "A". Al cabo de 6 meses de contrataciones temporales obtuve mi plaza definitiva como trabajador de base a partir del 16 de julio de 1984. Desde esa fecha hasta ahora, he obtenido constantes promociones y actualmente me desempeño como Auxiliar de Investigación "I", una de las más altas categorías del escalafón.

La segunda etapa de mi formación en investigación científica en el área de Biología Molecular, estuvo relacionada con la Biología Molecular del cáncer. En ella participé de 1988 a 1998 en los siguientes proyectos de investigación:

1. Transactivación del promotor tardío de SV40 por el producto del gen E2 de papilomavirus bovino tipo 1.

2. Detección y tipificación de Papilomavirus humano (HPV) en muestras de pacientes con papilomatosis laríngea.
3. Construcción de ratones transgénicos que expresan los oncogenes virales E6 y E7 de HPV tipo 16.
4. Análisis de mutaciones en el proto-oncogén *c-myc* en muestras de cáncer cérvico-uterino.
5. Efecto del compuesto químico "Proqui D-0234" sobre la expresión de oncogenes celulares y virales en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino.

Mi participación en estos proyectos de investigación en colaboración con algunos integrantes del laboratorio originó dos publicaciones en revistas indexadas, doce comunicaciones a congresos, un reporte técnico a la compañía farmacéutica Proquifim y el premio "Dr. Isamael Cosío Villegas" al mejor trabajo en investigación clínica, por el trabajo presentado durante las XXVII Jornadas Médico-Quirúrgicas, en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias S. S. A., en septiembre de 1995.

Publicaciones:

1. Guido, M. C., Zamorano, R., Garrido-Guerrero, E., Gariglio, P. and García-Carrancá, A. (1992). Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product. *Journal of General Virology*. **73**: 1395-1400.
2. Garrido-Guerrero, E., Carrillo, E., Guido, M., Zamorano, R., García-Carrancá, A. and Gariglio, P. (1996). Different arrangement of human papillomavirus E2 binding sites distinguishes cutaneous types from those associated with mucosal lesions. *Archives of Medical Research*. **27**(3): 389-394.

Congresos:

1. García-Carrancá, A., M.C. Guido, R. Zamorano and P. Gariglio. "The full length BPV-1 E-2 gene product repress transcription from SV40 Chimeric promoters by interfering with formation of polimerase II committed complex". Papillomavirus Workshop 1990. Heidelberg, Rep. Fed. Alemania. Mayo de 1990.
2. Garcia-Carrancá Alejandro, Zamorano Rocio, Guido Miriam C, y Gariglio Patricio. "La proteína E2 regula diferencialmente la expresión temprana de papilomavirus humano que infectan la piel y las mucosas genitales". III Congreso Argentino de virología. Santa Fe. Argentina. Octubre de 1990.

3. Zamorano, R., A. García-Carrancá, M. Guido y P. Gariglio. "El producto del gen E2 del papilomavirus bovino tipo 1 (PVB-1) reprime la transcripción de promotores quiméricos del SV40 interfiriendo con la formación de complejos comprometidos de la RNA polimerasa II" XVIII Congreso de la Sociedad de Bioquímica. San Luis Potosí, S. L. P., México Noviembre de 1990.
4. Salcedo-Vargas, M., Chávez-Olmos, P., Zamorano-Ulloa, R. y Gariglio, P. "Integración del virus de papiloma humano junto al oncogén c-myc en cáncer genital". X Encuentro de Investigación Biomédica. Monterrey, N. L. México. Octubre de 1992.
5. Zamorano, R. y Gariglio P." Efecto inhibido de la proteína E2 en la transcripción de los oncogenes de los papilomavirus genitales". III Congreso de Investigación en Salud Pública. Cuernavaca Mor., México, Enero de 1992.
6. Chávez-Olmos, P., Salcedo-Vargas, M., Zamorano-Ulloa, R. y Gariglio-Vidal, P. "Integración del virus del papiloma humano junto al oncogén c-myc en cáncer genital". IV Congreso Nacional de Investigación en Salud Publica. Cuernavaca, Mor., México. Enero de 1993.
7. Carrillo, E. D., Garrido-Guerrero, E., Zamorano, R. y Gariglio, P. "Mecanismo de represión por la proteína viral E2 sobre la actividad transcripcional del HPV-18: Efecto de la distancia "caja TATA"-E2". XX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Zacatecas. Zac., México. Octubre de 1994.
8. Manjarrez, M. E., Zamorano, R., Uranga, D., Méndez, J., Soda, A. y Gariglio P. "Presencia y tipificación de HPV en muestras de papilomatosis laríngea". XXVII Jornadas Médico-Quirúrgicas. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. México D.F., México. Octubre de 1995.
9. Recillas, F., Escalante, D., Zamorano, R., Chávez, P., Gariglio, P. and Covarrubias, L. " Transgenic mice expressing human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes under the control of a keratin promoter". IV Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Biología Celular. Oaxtepec, Mor., México. Octubre de 1995.
10. Zamorano, R., Manjarrez, M. E., Make, E., Uranga, D., Méndez, J., Soda, A. y Gariglio, P. "Papilomatosis laríngea y papilomavirus humano". XX Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Genética Humana, A. C. San Luis Potosí, S. L. P., México. Octubre de 1995.
11. Recillas, F., Escalante, D., Chávez, P., Zamorano, R., Gariglio, P., Arenas, F. y Covarrubias, L. "Ratones transgénicos que expresan los oncogenes

virales E6 y E7 de papilomavirus humano tipo 16". XXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Colima. Col., México. Noviembre de 1996.

12. Manjarrez, M. E., Zamorano, R., De la Torre, C., Villalba, J., Selman, M. y Gariglio, P. "Papilomatosis laríngea y virus del papiloma humano". Primera Reunión de la Rama de Bioquímica y Biología Molecular de Virus. Sociedad Mexicana de Bioquímica. Oaxtepec, Mor., México. Enero de 1998.

Reporte técnico:

1. "Estudio de la actividad biológica del compuesto Proqui D-0234". Reporte técnico a la compañía farmacéutica Proquifim S. A. de C. V. México, D. F. Noviembre de 1988.

Durante esta segunda parte de mi desarrollo profesional también asistí a 6 cursos de especialización que apoyaron a los proyectos de investigación en los que he participado:

1. "Curso básico de seguridad radiológica". Impartido por el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares en el CINVESTAV-IPN. México D. F., México. Noviembre 23 a 25 de 1988.
2. "Signal transduction-second messengers". Impartido por el Dr. Jean Zwiller, Unidad 338 del INSERM: Biologie Communication Cellulaire, Francia, en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias en el CINVESTAV-IPN, México D. F., México. Agosto 12 a 25 de 1992.
3. "Curso de seguridad radiológica en investigación para personal ocupacionalmente expuesto". Con autorización # A00.212/1855/93 de la Comisión de Seguridad Nuclear y Salvaguarda. México D. F., México. Octubre de 1993.
4. "Segundo curso internacional de Biomedicina Molecular". Impartido por Beckman Instruments de México S. A. de C. V. en el Instituto Politécnico Nacional. México D. F., México. Octubre 15 a 17 de 1996.
5. "Detección de genes y proteínas mediante métodos no radioactivos". Impartido por Amersham International en el Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA) del I. P. N. y en el CINVESTAV-IPN. México D.F., México. Septiembre 22 a 26 de 1997.
6. "III Curso Internacional de Biomedicina Molecular". Impartido en la Escuela Superior de Medicina del I. P. N. y en el Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del I. P. N. México D. F., México. Octubre 22 a 24 de 1997.

De septiembre de 1998 a octubre de 1999 trabajé como Auxiliar de Investigación en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV-IPN en el laboratorio a cargo del Dr. Arturo Ponce Balderas. Durante este periodo, el proyecto de investigación en el cual participé fue: "Distribución de canales de potasio en neuronas de hipocampo de rata". En ese proyecto participé en la puesta en marcha de las siguientes metodologías:

- Establecimiento de las condiciones de cultivo *in vitro* de neuronas de hipocampo de rata.
- Transfección transitoria de neuronas de hipocampo con plásmidos recombinantes que contienen genes que codifican para canales de potasio dependiente de voltaje.
- Detección inmuno-citoquímica de los canales de potasio en neuronas de hipocampo de rata transfectadas.

Debido a que el tema de investigación relacionado con los canales de potasio no satisfacía por completo mis expectativas profesionales, solicité mi cambio de adscripción al Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN a fin de incorporarme al grupo de investigación del Dr. Juan Gerardo Valadez Sánchez. Una de las líneas de investigación en el laboratorio del Dr. Valadez está relacionada con el efecto de mutágenos sobre secuencias codificantes y no codificantes del genoma humano. De noviembre de 1999 a la fecha, he estado a cargo del proyecto "Desarrollo de un sistema *in vivo* para detectar el efecto de mutágenos sobre la actividad transactivadora del gen humano supresor de tumores *p53*".

ANEXO I: CONTRATOS LABORALES

CONTRATO INDIVIDUAL DE TRABAJO POR TIEMPO DETERMINADO QUE CELEBRAN, POR UNA PARTE, EL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS, REPRESENTADO POR SU ADMINISTRADOR EL C.P. J. JESUS LIZARDI NUÑEZ, Y POR LA OTRA LA SRITA. MA. DEL ROCIO L. SAMORANO ULLOA

A QUIENES EN EL CURSO DE ESTE CONTRATO SE DESIGNARA COMO "EL CENTRO" Y "EL EMPLEADO" RESPECTIVAMENTE DE ACUERDO CON LOS ANTECEDENTES Y CLAUSULAS SIGUIENTES:

A N T E C E D E N T E S

a).- El Ejecutivo Federal por Decreto del 17 de abril - 1961, publicado en el Diario Oficial de la Federación del 6 de mayo del mismo año, creó el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.

b).- EL CENTRO es un organismo descentralizado de interés público, con personalidad jurídica y patrimonio propios, con domicilio en Avenida Instituto Politécnico Nacional No. 1333, esquina con Tizman en México 14, Distrito Federal.

c).- Para el desarrollo de las funciones de EL CENTRO, es necesaria la contratación de los servicios del personal indispensable para su operación.

d).- EL EMPLEADO, por sus generales declara: Fecha y lugar de nacimiento: 5 de mayo de 1960 en México, D.F.
Edad: 23 años. Sexo: Femenino. Nacionalidad: Mexicana.
Estado Civil: Soltera. Teléfono: 781-54-51
Domicilio: Primavera # 39-1, Col. Industrial, México 14, D.F.
Registro Federal de Causantes: ZAUR 600505
Horario: Variable. Jornada: De lunes a viernes.

e).- Por lo expuesto, EL CENTRO y EL EMPLEADO Celebran el presente contrato, con sujeción a las siguientes:

C L A U S U L A S

PRIMERA.- EL EMPLEADO se obliga a prestar sus servicios a EL CENTRO como Auxiliar de Investigación "A" en el Departamento de Genética y B.M.

SEGUNDA.- EL CENTRO se obliga a pagar a EL EMPLEADO, por los servicios que preste de acuerdo con este contrato, la cantidad de \$43,313.00 (CUARENTA Y TRES MIL TRESCIENTOS TRECE PESOS 00/100 M.N.) mensuales, que se cubrirá por quincenas, de acuerdo con el calendario de pagos que se fije en lugar visible anualmente.

TERCERA.- La duración del presente contrato será de dos meses a partir de la fecha de su firma.

CONTRATO INDIVIDUAL DE TRABAJO POR TIEMPO DETERMINADO QUE CELEBRAN, POR UNA PARTE, EL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS, REPRESENTADO POR SU ADMINISTRADOR EL C.P. J. JESUS LIZARDI NUNEZ, Y POR LA OTRA LA SRITA. MA. DEL ROCIO L. ZAMORAÑO ULLOA A QUIENES EN EL CURSO DE ESTE CONTRATO SE DESIGNARA COMO "EL CENTRO" Y "EL EMPLEADO" RESPECTIVAMENTE DE ACUERDO CON LOS ANTECEDENTES Y CLAUSULAS SIGUIENTES:

A N T E C E D E N T E S

- a).- El Ejecutivo Federal por Decreto del 17 de abril - 1961, publicado en el Diario Oficial de la Federación del 6 de mayo del mismo año, creó el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.
- b).- EL CENTRO es un organismo descentralizado de interés público, con personalidad jurídica y patrimonio propios, con domicilio en Avenida Insurgentes Sur, Edificio Nacional No. 2808, esquina con Piedad de México 14, Distrito Federal.
- c).- Para el desarrollo de las funciones de EL CENTRO, es necesaria la contratación de los servicios del personal indispensable para su operación.
- d).- EL EMPLEADO, por sus generales declara: Fecha y lugar de nacimiento: 5 de mayo de 1960 en México, D. F.
Edad: 23 años Sexo: Femenino Nacionalidad: Mexicana
Estado Civil: Soltera Teléfono: 781-54-41
Domicilio: Primavera No. 39-1 Col. Industrial México 14, D. F.
Registro Federal de Causantes: 2807-010008
Horario: Variable Jornada: De Lunes a viernes
- e).- Por lo expuesto, EL CENTRO y EL EMPLEADO Celebran - el presente contrato, con sujeción a las siguientes:

C L A U S U L A S

PRIMERA.- EL EMPLEADO se obliga a prestar sus servicios a EL CENTRO como Auxiliar de Investigación "A" en el Departamento de Genética y E.M.

SEGUNDA.- EL CENTRO se obliga a pagar a EL EMPLEADO, por los servicios que preste de acuerdo con este contrato, la cantidad de \$55,874.00 (CINCUENTA Y CINCO MIL OCHOCIENTOS SETENTA Y CUATRO PESOS, 00/100 mensuales, que se cubrirá por quincenas, de acuerdo con el calendario de pagos que se fije en lugar visible anualmente. M.H

TERCERA.- La duración del presente contrato será de dos meses a partir de la fecha de su firma.

CONTRATO INDIVIDUAL DE TRABAJO POR TIEMPO DETERMINADO QUE CELEBRAN, -
POR UNA PARTE, EL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS, -
REPRESENTADO POR SU SECRETARIO ADMINISTRATIVO EL C.P. J. JESUS LICAR-
DI NUÑEZ, Y POR LA OTRA LA SRITA. MA. DEL ROCIO L. ZAMORANO ULLOA - -
- - - - - A QUIENES EN EL CURSO DE ESTE CONTRATO SE DE--
SIGNARA COMO "EL CENTRO" Y "EL EMPLEADO" RESPECTIVAMENTE DE ACUERDO -
CON LOS ANTECEDENTES Y CLAUSULAS SIGUIENTES:

A N T E C E D E N T E S

a).- El Ejecutivo Federal por Decreto del 17 de abril de 1961, -
publicado en el Diario Oficial de la Federación del 6 de mayo del mis-
mo año, creó el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.

b).- EL CENTRO es un organismo descentralizado de interés públi-
co, con personalidad jurídica y patrimonio propios, con domicilio en-
Avenida Instituto Politécnico Nacional No. 2508, esquina con Ticomán-
en México 14, Distrito Federal.

c).- El presente contrato se celebra de acuerdo con el artículo 123 del -
Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos y el artículo 123 -
del Reglamento de la Ley Federal del Trabajo.

d).- El EMPLEADO, por sus generalidades declara: Fecha y lugar -
de nacimiento: 5 de mayo de 1930 en México, D. F.
Edad: 23 años Sexo: Femenino Nacionalidad: Mexicana
Estado Civil: Soltera Teléfono: 781-54-71
Domicilio: Primavera No. 39-1 Col. Industrial, México 14, D. F.
Registro Federal de Causantes: ZAUA-600505
Horario: Variable Jornada: De lunes a viernes

e).- Por lo expuesto, EL CENTRO y EL EMPLEADO celebran el pre-
sente contrato, con sujeción a las siguientes:

C L A U S U L A S

PRIMERA.- EL EMPLEADO se obliga a prestar sus servicios a EL -
CENTRO como **Auxiliar de Investigación "A"** - - - - -
en el Departamento de Genética y B. M.

SEGUNDA.- EL CENTRO se obliga a pagar a EL EMPLEADO, por los -
servicios que preste de acuerdo con este contrato, la cantidad de --
\$ 57,374.00 (CINCUENTA Y CINCO MIL SETECIENTOS TREINTA Y CUATRO PESOS, 00/100 -
mensuales, que se cubrirá por quincenas, de acuerdo con el calenda-
rio de pagos que se fije en lugar visible anualmente.

TERCERA.- La duración del presente contrato será de dos meses
a partir de la fecha de su firma.

CONTRATO INDIVIDUAL DE TRABAJO POR TIEMPO INDEFINIDO QUE CELEBRAN, POR UNA PARTE, EL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS-
AVANZADOS, REPRESENTADO POR SU ADMINISTRADOR, EL C. P. JESUS-
LIZARDI NUNEZ, Y POR LA OTRA LA SRTA. MA. DEL ROCIO L. ZAMORANO ULLOA

A QUIEN EN EL CURSO DE ESTE CONTRATO SE DESIGNARA COMO "EL CENTRO" Y "EL EMPLEADO" RESPECTIVAMENTE, DE ACUERDO CON LOS ANTECEDENTES Y CLAUSULAS SIGUIENTES:

A N T E C E D E N T E S

a).- El Ejecutivo Federal por Decreto del 17 de abril de 1961, publicado en el Diario Oficial de la Federación del 6 de mayo del mismo año, creó el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.

b).- EL CENTRO es un organismo descentralizado de interés público, con personalidad jurídica y patrimonio propios, con domicilio en Avenida Instituto Politécnico Nacional # 2508 es-
tado de México 14, Distrito Federal.

c).- El Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, para la administración de los servicios del personal individual necesario para su operación.

d).- EL EMPLEADO, por sus generales declara: Fecha y lugar de nacimiento: 5 de mayo de 1960 en México, D.F.
Edad: 24 años. Sexo: Femenino. Nacionalidad: Mexicana.
Estado Civil: Soltera. Matrón: 931-54-51
Domicilio: Primavera # 33-1, Col. Industrial, México 14, D.F.
Registro Federal de Causantes: ZAUR 609505
Horario: Variable. Jornada: De lunes a viernes.

e).- Por lo expuesto, EL CENTRO y EL EMPLEADO celebran el presente contrato, con sujeción a las siguientes:

C L A U S U L A S

PRIMERA.- EL EMPLEADO se obliga a prestar sus servicios a EL CENTRO como Auxiliar de Investigación B en el Departamento de Genética y E.M.

SEGUNDA.- EL CENTRO se obliga a pagar a EL EMPLEADO, por los servicios que presta de acuerdo con el presente contrato, la cantidad de \$69,000.00 (SESENTA Y NUEVE MIL PESOS 00/100) mensuales, que se cubrirá por quincenas, de acuerdo con el calendario de pagos que se fije en lugar visible anualmente.

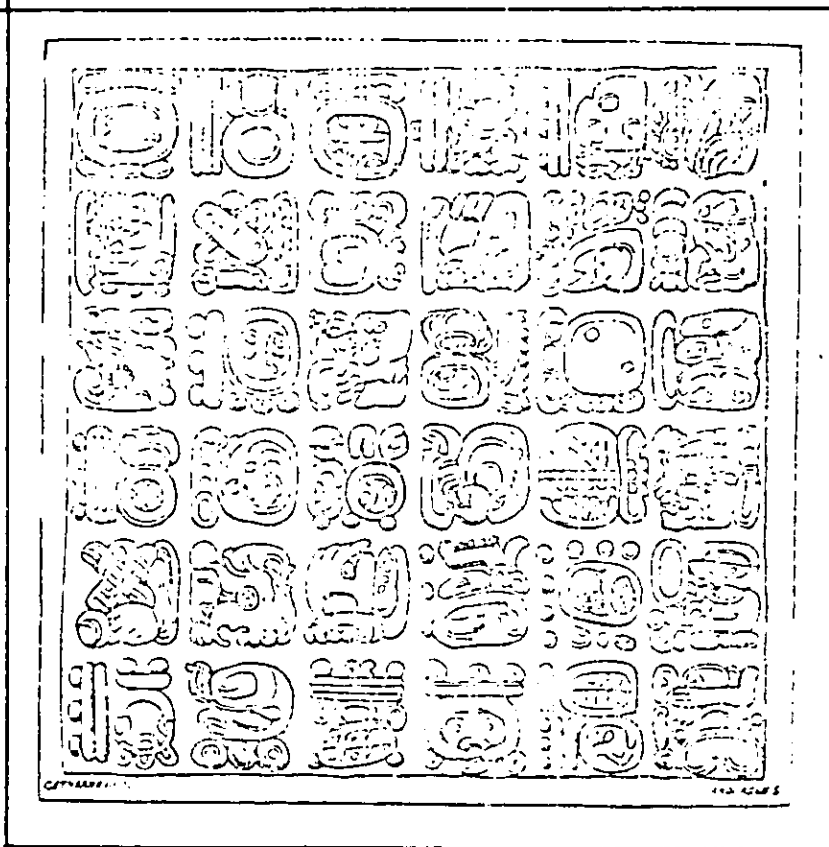
TERCERA.- La duración del presente contrato será por tiempo indefinido a partir de la fecha de su firma.

ANEXO II: COMPROBANTES DE CONGRESOS



SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUIMICA, A. C.

XIV CONGRESO NACIONAL—



7 al 12 de Noviembre de 1982

Facultad de Medicina

Universidad de Guadalajara

Guadalajara, Jalisco

AVANCE EN LA PURIFICACION DE GENES ACTIVOS EN TRANSCRIPCION. -
Rosales, J.L. Ramirez, R. Zamorano, P. Gariglio y A. Ches--
er, Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV
PN.

El genoma de SV40 está organizado de una manera similar a -
la cromatina celular y para la formación de nucleosomas el vi-
rus utiliza las histonas del huésped. Gariglio y Mousset han -
demostrado la presencia de un complejo viral activo en trans--
cripción (C.T.V.) formado éste por DNA de SV40 y RNA polimera-
sa Tipo II; tal complejo aparece durante el período tardío de
la infección. Posteriormente, se determinó bioquímicamente y por
microscopía electrónica la presencia de nucleosomas en el C.T.
Estos hechos nos muestran que el C.T.V. es un modelo exce--
lente para el estudio de mecanismos de transcripción en euca--
riontes. Por otro lado, sabemos que la proteína 32 (P32) codifi-
cada por el gene 32 del bacteriófago T4, posee gran afinidad -
para unirse a ácidos nucleicos de cadena simple (tanto DNA co-
mo RNA). Presentamos la metodología que se sigue para la puri-
ficación del C.T.V. Hemos logrado precipitar complejos de Pro-
teína 32 unida a DNA de simple cadena (tanto del virus SV40 co-
mo de células CV1) con anticuerpos Anti P32 usando como aca-
ntador a la Proteína A-Sepharosa. Actualmente, estamos preci-
pitando RNA de SV40 por el método anteriormente mencionado, pa-
ra después precipitar el complejo de transcripción de SV40.



Asociación Mexicana de Microbiología

APARTADO POSTAL NO. 466

MEXICO, D.F.

XV CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA

3 AL 7 DE JUNIO DE 1984.

VERACRUZ, VER.

MESA DIRECTIVA 1932-1983

PRESIDENTE

R. EMILIANO CABRERA JUAREZ

Lab. de Genética Molecular

Departamento de Bioquímica

E. N. C. B. I. P. N.

VICE-PRESIDENTE

M. en C. ARMANDO LEMOS

PASTRANA

Director

E. N. C. B. I. P. N.

SECRETARIA

A. ANA MARIA MESTA HOWARD

Lab. de Microbiología General

Departamento de Microbiología

E. N. C. B. I. P. N.

TESORERA

RA. ALICIA ESPINOSA LARA

Lab. de Genética Molecular

Departamento de Microbiología

E. N. C. B. I. P. N.

VOCAL

en C. ROGELIO MALDONADO

RODRIGUEZ

Lab. de Acidos Nucleicos

Departamento de Bioquímica

E. N. C. B. I. P. N.

C. R. ZAMORANO.

P R E S E N T E

COMUNICAMOS A USTED QUE SU TRABAJO TITULADO: Uso de anticuerpos de enfermos con lupus eritematoso para la purificación de complejos ribonucleoproteínicos.

HA SIDO ACEPTADO Y SERÁ INCLUIDO EN EL PROGRAMA DE ESTE CONGRESO PARA SER PRESENTADO EL DÍA

6 DE JUNIO A LAS 18.00 H. EN LA SALA

5 EN LA SECCIÓN DE BIOQ. MICROBIANA IV

LE RECORDAMOS QUE PARA PRESENTAR EL TRABAJO CUANDO MENOS UNO DE LOS AUTORES DEBERÁ ESTAR INSCRITO AL CONGRESO. SI REQUIERE DIAPOSITIVAS DEBERÁN SER CLARAS Y VISIBLES DESDE CUALQUIER PUNTO DE LA SALA, DISPONIENDO DE DIEZ MINUTOS PARA SU EXPOSICIÓN.

MÉXICO, D.F., ABRIL DE 1984.

A T E N T A M E N T E

EL COMITÉ ORGANIZADOR.

HOJA DE RESUMEN

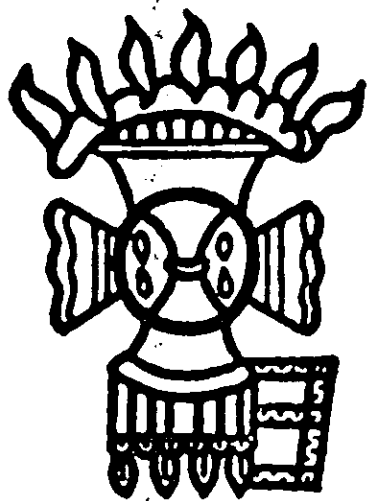
- 1.- FECHA LIMITE: 2 DE MARZO DE 1984.
- 2.- TITULO DEL TRABAJO (RECUADRO A).
- 3.- NOMBRE DE LOS AUTORES (APELLIDO DEL PRIMER AUTOR, INICIALES, PUNTO Y COMA, INICIALES DEL SEGUNDO AUTOR Y OTROS AUTORES SEGUIDAS DEL APELLIDO. SEPARE CON PUNTO Y COMA LOS NOMBRES DE CADA AUTOR. USE EL SIGNO " & " COMO CONJUNCION. TODOS LOS NOMBRES Y APELLIDOS DEBEN SER ESCRITOS CON MAYUSCULAS), INSTITUCION, DIRECCION. SUBRAYE EL NOMBRE DEL AUTOR QUE LO PRESENTA (RECUADRO B).
- 4.- TEXTO DEL RESUMEN (RECUADRO C), QUE DEBERA INCLUIR BREVEMENTE: INTRODUCCION, OBJETIVOS, RESULTADOS, DISCUSION Y CONCLUSIONES. SUBRAYE LOS NOMBRES CIENTIFICOS DE ESPECIES.
- 5.- ESCRIBA, DE PREFERENCIA EN MAQUINA ELECTRICA, A RENGLON SEGUIDO, NO REBASE LAS LINEAS DEL CUADRO.
- 6.- PARA LA ACEPTACION DEL TRABAJO ES INDISPENSABLE QUE AL MENOS UNO DE LOS AUTORES ESTE INSCRITO AL CONGRESO.
- 7.- EL COMITE ORGANIZADOR SE RESERVA EL DERECHO DE ACEPTAR O RECHAZAR EL TRABAJO
- 8.- FAVOR DE ENVIAR ESTA HOJA Y DOS COPIAS XEROX A:

ANA MARIA MESTA HOWARD
 XV CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA
 APARTADO POSTAL 4-069
 06400, MEXICO, D. F.

A USO DE ANTICUERPOS DE ENFERMOS CON LUPUS ERMATEMATOSO PARA LA PURIFICACION DE COMPLEJOS RIBONUCLEOPROTEICOS.

B SANORANO, R., C. RODRIGUEZ y P. GARIGLIA.
 Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. Depto. Genética y Biología Molecular.
 Apartado Postal 14-740. México 14, D.F.

C En células eucarióticas, el control de la expresión del genoma se encuentra principalmente a nivel de la regulación de la transcripción y debido al grado de complejidad que presenta el genoma eucariote, un gran problema es entender los mecanismos que la regulan.
 Por otro lado, existen evidencias de que el RNA recién transcrito (pre-mRNA) se asocia con proteínas altamente conservadas formando complejos ribonucleoprotéicos.
 En base a estos antecedentes nos hemos propuesto purificar complejos ribonucleoprotéicos empleando técnicas inmunológicas utilizando anticuerpos contra RNP provenientes de pacientes con Lupus Eritematoso, con el objeto de emplear posteriormente el sistema en la purificación del complejo viral activo en transcripción (CAV) del virus de simio 40 (SV40), el cual por sus características es un modelo excelente para el estudio de mecanismos de transcripción en eucariotas.
 En la actualidad hemos logrado precipitar complejos de Ribonucleoproteínas de las células de riñón de mono de la línea CV1 en un sistema de doble anticuerpo.



Asociación Mexicana de Microbiología

CONSTANCIA DE ASISTENCIA

Por medio de la presente se hace constar que el (la)

C. ROCIO ZAMORANO ILLLOA.

asistió al XV CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA que se llevó a cabo en la Ciudad de Veracruz, Ver., del 3 al 7 de Junio de 1984.

A T E N T A M E N T E

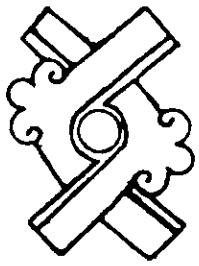
DR. EMILIANO CABRERA JUÁREZ -

Presidente de la A. M. M.

I.B.O. LUIS DAVID PATIÑO H.

Coordinador en Veracruz.

**XV CONGRESO NACIONAL DE LA
SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUIMICA, A.C.**



**Noviembre 11-15, 1984
Centro de Convenciones
Morelia, Michoacán**



La Universidad en la Cultura

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE MACROMOLECULAS APLICADA A ESTUDIOS DE VIRUS.
Chávez O.P., Fernández T. C., García C. A., Zamorano U. R., Gariglio P.
Depto. de Genética y Biología Molecular. Centro de Investigación y de
Estudios Avanzados del IPN. México, D. F.

Hemos utilizado esta metodología en algunos de los proyectos bioquímicos de nuestro departamento como por ejemplo para la observación por tinción negativa de virus: polio, SV40 y el bacteriófago T₄.

Hemos montado la inmunodecoración de macromoléculas para visualizar la presencia de antígenos de la capsida del virus de la polio mediante anticuerpos contra dichas proteínas.

Mediante la técnica descrita por Kleinschmidt visualizamos moléculas de DNA provenientes de virus y fagos. Esta técnica es la base para la visualización de heteroduplex.

Estamos utilizando la metodología descrita por Dubochet para la visualización de minicromosomas de SV40: esta técnica nos permite visualizar la interacción de proteínas asociadas a DNA o RNA. Dentro de los proyectos que actualmente se apoyan en esta metodología se encuentran:

- a) Caracterización de complejos virales replicativos y su relación con una región de cromatina viral desprovista de nucleosomas ("gap")
- b) Caracterización de complejos virales activos en transcripción
- c) Visualización de moléculas de RNA polimerasa II unidas a microsomoma viral.

Estas técnicas, de las cuales se presentan resultados, han sido desarrolladas en la Unidad de Microscopía Electrónica de Macromoléculas, dado que complementa la información bioquímica obtenida en varios proyectos de investigación, entre otros: estructura y penetración viral, replicación y transcripción de genes virales, etc. Además esta Unidad está en condiciones de entrar en la tercera fase del proyecto, es decir, proporcionar servicios a otras instituciones.

XVI CONGRESO NACIONAL DE LA
SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUIMICA

Resumen para comunicaciones libres

PARA USO EXCLUSIVO DEL
COMITÉ ORGANIZADOR

Area IV
Resumen No 457
Sesión 4
Día JUEVES
Hora —
Presentación:
oral
cartel
Socio numerario:
—

INMUNODETECCION DE ANTIGENOS NUCLEARES RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO (LES).

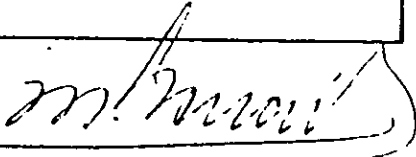
R. Zamorano, P. Gariglio y M. Cruz, Departamento de Genética y Biología Molecular. CINVESTAV del IPN. 07000 México, D. F. y Hospital de Especialidades CM La Raza, IMSS.

Los pacientes con enfermedades autoinmunes producen anticuerpos contra componentes nucleares: DNA, histonas, no-histonas, RNA, RNPs, y algunos otros antígenos.

Las pruebas de laboratorio tradicionalmente utilizadas son de gran utilidad para definir los diferentes tipos de autoanticuerpos. Sin embargo, estas pruebas no permiten la agrupación de los pacientes de acuerdo a la especificidad de sus anticuerpos, lo cual limita su sensibilidad. La técnica de inmunotransferencia ha permitido la detección molecular de estos autoanticuerpos. Utilizando como Antígeno extractos nucleares de células HeLa se analizó un grupo definido con LES donde se encontró mayor frecuencia de anticuerpos contra Sm de peso molecular 28 y 29 Kd con respecto a los anticuerpos detectados contra RNP de 68 Kd, así como de otros antígenos nucleares. Estos resultados nos permiten definir el estado del paciente, su diagnóstico, y empezar a entender esta enfermedad a nivel molecular.

IMPORTANTE
El resumen se debe escribir en el cuadro marcado en azul, y acompañarse de 5 fotocopias.

Su resumen será fotografiado y aparecerá en las Memorias del Congreso tal como lo entregue. Lea cuidadosamente las instrucciones de la hoja adjunta antes de mecanografiarlo, consulte el ejemplo en la parte inferior



Por favor proporcione tres palabras o frases que describan su resumen.
Lupus Eritematoso Sistémico
inmunotransferencia
Antígenos Sm y RNP

EXPOSICION: desde las 8:00 a.m.
ASISTENCIA DE AUTOR(ES): 16:00 - 16:50 h
DISCUSION: 17:00 - 18:30 h

Ejemplo:

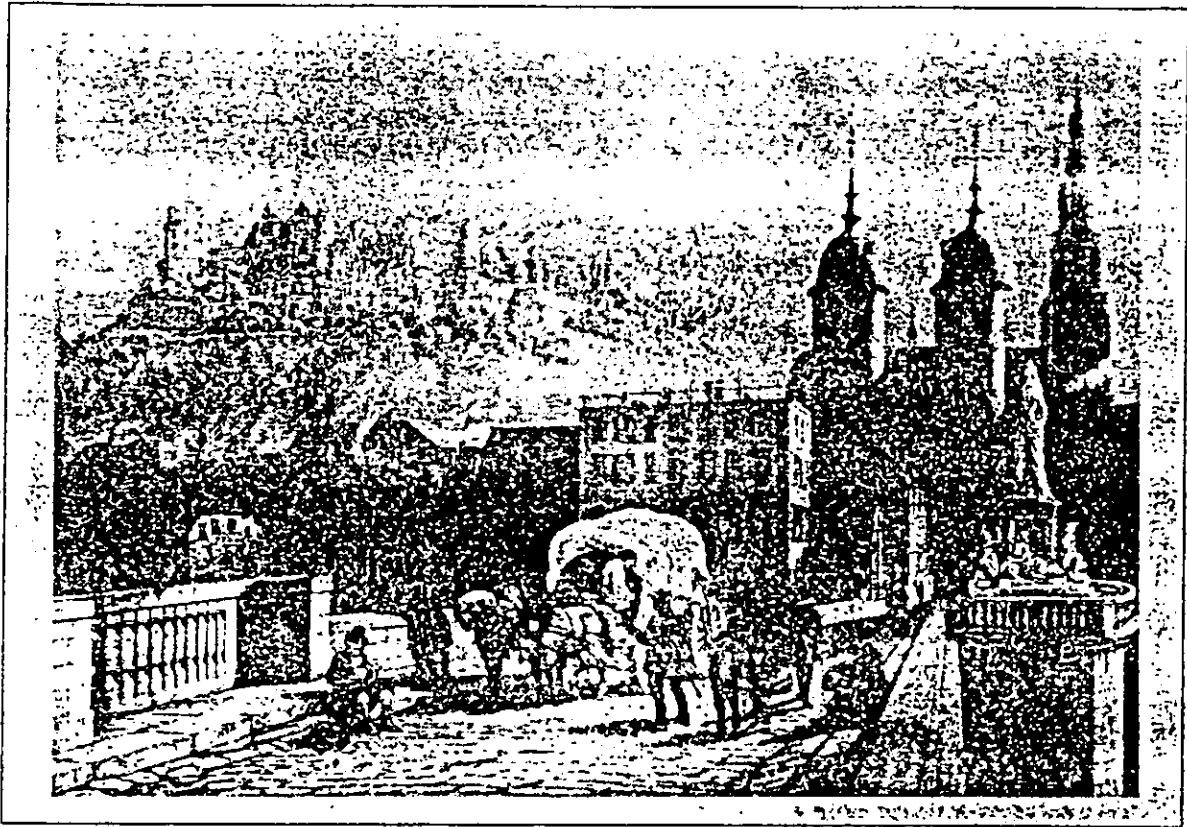
ENERGIA DE LA INTERACCION LECITINA-ACTINA-G EN UN SISTEMA MODELO DE MEMBRANA
E. Herrera y M.E. Cid Departamento de Bioquímica CINVESTAV del IPN México D.F. 07000
La actina globular (G) produce una compresión de la monocapa de dipalmitoil fosfatidilcolina (dC₁₆ lecitina) esparcida en la interfase

Fecha límite de recepción del resumen: 15 de AGOSTO de 1986.

L. 24

Papillomavirus Workshop 1990

May 12 to 17



Heidelberg, Kongreßhaus (Stadthalle)

Program and Abstracts

THE FULL LENGTH BPV-1 E2 GENE PRODUCT REPRESS TRANSCRIPTION FROM
SV40 CHIMERIC PROMOTERS BY INTERFERING WITH FORMATION OF
POLYMERASE II COMMITTED COMPLEXES

Garcia Carranca, A., Guido, M.C., Zamorano, R. and Gariglio, P.,
Departamento de Genetica y Biologia Molecular, CINVESTAV-I.P.N.
Apdo. Postal 14-740, 07000 Mexico, D.F.

During transcription initiation, polymerase II binding to DNA is preceded by the formation of at least two intermediate complexes. Factors TFIID and TFIIA bind sequentially to DNA and form the first and second committed complexes, respectively.

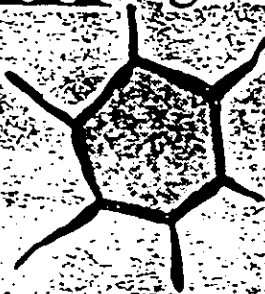
All genital human papillomaviruses possess a conserved double perfect E2 binding site (E2BS) just upstream from the E6 TATA box. The activity of this promoter is highly repressed by the product of the full length BPV-1 E2 gene product. This repression is mediated by the specific binding of E2 to the double E2BS. On the contrary, when an E2BS is located upstream promoter and enhancer elements, transcription activation is observed.

We have analyzed the transcriptional transregulation by BPV-1 E2 gene product of artificial constructs containing one or several E2BS cloned at various 5' positions relative to the heterologous SV40 early promoter, linked to the CAT reporter gene. Three different restriction sites were used to insert and replace SV40 promoter elements by oligos containing E2BS; one located between the TATA box and the 21 bp repeats, another between these repeats and the SV40 enhancer, and one located further upstream from this enhancer.

We found that while this latter construct was activated by E2, constructs containing E2BS near the TATA box were repressed even when the site was located 65 bp. from the transcriptional start site. We propose that in these conditions, repression by full length E2 is mediated by impeding the specific binding of TFIIA and consequently the formation of the second committed complex.

Libro de

III congreso
argentino



14 octubre 17
1990 santa fe

VIROLOGIA

Resúmenes

Sociedad Argentina
de Virología
División de la A.A.M.

CAMBIOS EN LA EXPRESION DE GENES CELULARES
Y TRANSFECTADOS EN CELULAS persistentemente
INFECTADAS CON EL VIRUS DE VACUNA. Pogo,

Beatriz G.-T. Departments of Neoplastic Diseases and
Microbiology, Mount Sinai School of Medicine, New
York U.S.A.

Las infecciones virales persistentes in vitro han
facilitado el estudio de las interacciones entre
virus y células infectadas en ausencia del sistema
inmunitario. En nuestro laboratorio se desarrollaron
varias líneas de células infectadas con el virus de
vacuna con el propósito de estudiar la evolución de
las poblaciones viral y celular. Tres tipos
celulares fueron capaces de mantener infecciones
persistentes: células eritroleucémicas murinas;
células eritroleucémicas humanas (562), y células
derivadas de una leucemia linfática tímica humana
(Jurkat). En los tres tipos celulares profundos
cambios fenotípicos se observaron. Tanto en las
células eritroleucémicas murinas como en las humanas,
un alto % de células se diferenciaron espontáneamente
sintetizando hemoglobina. En las células K562, la
expresión de un gen específico de la familia de las
hemoglobinas, el G γ (fetal), fué estimulada mientras
que en las células Jurkat se observó un aumento en la
expresión del gen de la interleuquina 2.

Para determinar los mecanismos moleculares implicados
en estos cambios fenotípicos, plásmidos que contienen
genes reporteros se transflectaron en las células
controles y persistentemente infectadas. Se observó
un aumento en la transcripción de los genes
transfectados en las células infectadas sugiriendo
la presencia de factores de transducción.

LA PROTEINA E2 REGULA DIFERENCIALMENTE LA EXPRESION TEMPRANA
DE PAPILOMAVIRUS HUMANO QUE INFECTAN LA PIEL Y LAS MU-
COSAS GENITALES. García Carrancá Alejandro, Zamorano Pocio*, Guido Miriam C.,
Gariglio Patricio*. Depto. de Biología Molecular, Inst. Inv. Biomédicas-UNAM.
Apdo. Postal 70-228, 04510 México, D.F. * CIMESTAV-IFM, Apdo. Postal 14-740,
07000 México, D.F.

Los papilomavirus humanos (HPV) inducen tumores benignos (verrugas) y ma-
lignos (carcinomas) en los epitelios que colonizan; piel o mucosas.

Los productos de los oncogenes virales E6 y E7, son responsables de la im-
mortalización de las células que contienen secuencias de HPV. El producto del
gen E2 es un factor de transcripción que modula la expresión de estos oncoge-
nes, al unirse a su secuencia blanco en el DNA; ACG-N₄-CGT.

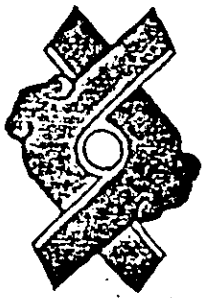
Se ha mostrado que el efecto del producto E2, sobre la transcripción de
E6 y E7, puede ser positivo o negativo, dependiendo de la posición de la se-
cuencia blanco respecto del sitio de inicio de la transcripción (+1).

Para analizar este efecto obtuvimos construcciones quiméricas del promotor
temprano del virus SV40, con secuencias blanco de E2 insertadas en diferen-
tes posiciones. Las construcciones llevan el gen reportero de acetilasa de
clorofenicol (CAT), lo cual nos permitió evaluar la actividad de los promoto-
res quiméricos en ausencia o presencia de E2.

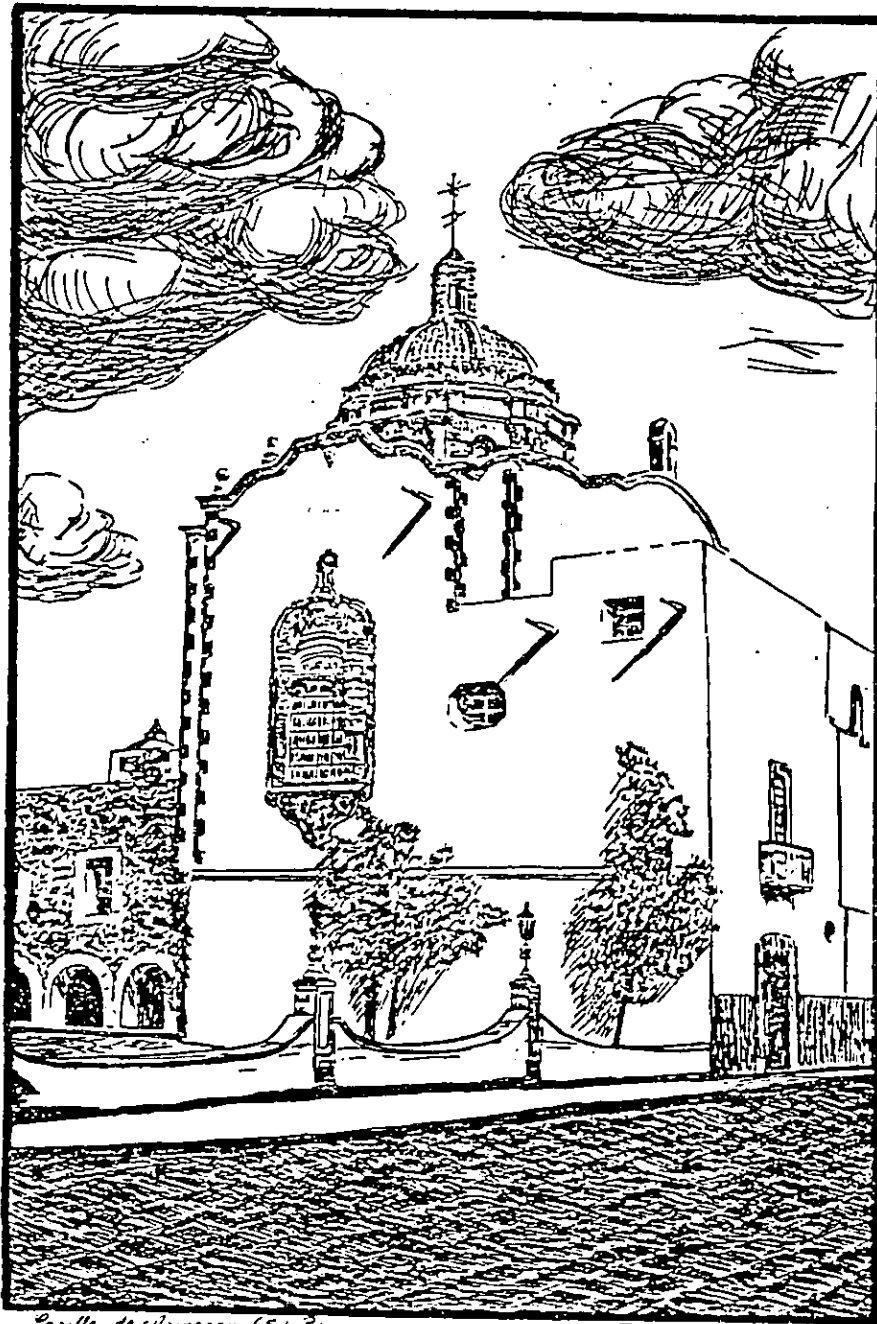
Encontramos que cuando la secuencia blanco está a menos de 100 pares de
bases (pb) del sitio +1, el factor E2 reprime la transcripción. Por el con-
trario, cuando la secuencia blanco está a más de 120 pb, el factor E2 la es-
timula.

Estos datos y el hecho que la posición natural de las secuencias blanco
de E2, en los promotores de E6 y E7, es diferente entre los tipos virales
que colonizan la piel (> 120 pb) y las mucosas genitales (< 70 pb), nos per-
mite sugerir que el factor E2 regula diferencialmente la expresión temprana
en estos tipos virales.

Apoyado parcialmente por el CONACYT (MEXICO).



SOCIEDAD MEXICANA DE
BIOQUIMICA, A. C.



Capilla de Anzures (S.L.P.)

José M. Roguin 1990.

XVIII CONGRESO NACIONAL

11 a 16 de NOVIEMBRE de 1990

SAN LUIS POTOSI, S.L.P.

ANÁLISIS MOLECULAR DE SECUENCIAS DE PAPILOMA VIRUS (PVV) EN CELULAS PROVENIENTES DE BIOPSIAS DE CÁNCER CERVIZO UTERINO.
 B. Velazco Steidinger, P. Chávez Olmos, J. Ordalier Rucos, M. Méndez Hernández, F. Gariglio Vidal, M. de la Cruz, C. Aguilar, Cancer-ENEP-ZARAGOZA, UNAM. Depto. de Genética y Biología Molecular CINVESTAV-IPN. Servicio de Ginecología Oncológica, Hosp. de Oncología GYN., IMSS.
 En un estudio reciente se demostró que existen líneas de Cáncer Cervizal y Uterino (CaCv) y de tejidos normales, frecuentemente se observó la presencia de secuencias de tipo papilomavírica y de tipo celular. A los cultivos de células de tipo celular se les realizaron pruebas para detectar secuencias papilomavíricas. Por otro lado, a los mismos cultivos se les realizaron extracciones de DNA para observar una Southern Blot, con la finalidad de determinar la posible presencia de secuencias de P2 o P1 del Virus Humano (PVV) tipo 18.
 Nuestros resultados muestran que los híbridos obtenidos con el DNA celular de las células de este linaje, al resultar positivos a la prueba de sus proteínas existentes en los detecciones y por otro lado se muestran evidencias de hibridación positiva con sondas de tipo celular y de tipo 18, en algunos cultivos. Pretendemos llevar a cabo el estudio de un mayor número de cultivos celulares provenientes de biopsias de CaCv para establecer un estado que nos permita determinar si líneas celulares de CaCv y también probar diferencias de secuencias del genoma viral. Además, determinaremos el estado filial de los genes celulares y su relación con los alteraciones moleculares al momento de ser detectados frecuentemente nuestro grupo se dedica a la búsqueda de parte al comportamiento biológico y al diagnóstico de esta neoplasia.
 SIV 1984, FOR APOYADO POR F. DARWIN DE CONACYT.

ESTUDIO DE ALGUNOS COMPONENTES DE LA MAQUINARIA REPLICATIVA EN CELULAS EUKARIOTAS
 E. García-Guerrero, C. Vargas Hernández, E. J. Miranda, A. García-Carrancá y F. Gariglio V.
 Dpto. de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN. Apdo. Postal 14-740, México D. F. 07000.
 El virus del sismo 40 (SV40) es un excelente modelo para el estudio de la replicación del DNA celular eucariota, pues utiliza la maquinaria celular y codifica solo una proteína necesaria para la duplicación del DNA viral (antígeno T).
 Hemos logrado desarrollar una metodología para purificar los anticromosomas activos en replicación de SV40, con ayuda de la proteína codificada por el gen 32 del fago T4 (P32), la cual es una específicamente a DNA de cadena sencilla, y anticuerpos dirigidos contra esta. Se encontraron varias diferencias entre el patrón proteico de los anticromosomas maduros y el de los activos en replicación. Entre las principales bandas observadas en los complejos activos en replicación se encuentran: una de 170 Kda, que puede ser una subunidad de DNA polimerasa alfa 6 delta; otra de 80 Kda, cuyo peso es semejante al antígeno T; dos bandas de 70 y 34 Kda parecidas a los péptidos que componen a la proteína de replicación A y una proteína de 37 Kda, que podría ser ciclina.
 Además, mediante inmunodetección pudimos constatar que los anticuerpos anti-P32 reconocen dos proteínas nucleares de Mr 70 y 34 Kda, que podrían corresponder a subunidades de la proteína de replicación A (RP-A).

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN GENE REARREGLADO DE ESTE VIRUS HUMANO PRODUCIDO IN VITRO. S. López, C. Arias y E. Méndez. Dpto. de Biol. Molecular CIIC/UNAM Cuernavaca Morelos 62271.
 El genoma de los rotavirus (RV) consta de 11 segmentos de RNA de doble cadena (dcRNA) de diferentes tamaños (680 a 3300 pb), los cuales producen un patrón electroforético característico. Sin embargo, se han aislado de la naturaleza rotavirus en los que este patrón está alterado, por la sustitución de un segmento de bajo PM por otro segmento equivalente de mayor PM. La caracterización de estos genes atípicos puede ser útil para determinar señales importantes en la replicación y/o encapsidación de RV. En este trabajo, se caracterizó un segmento de dcRNA atípico (7r) generado "in vitro" a partir del gen 7 de la cepa Ma de RV humano.
 Para caracterizar el gen 7r, se aislaron 2 variantes viales de Ma (R5 y R57), una de las cuales contenía el gen atípico. La secuencia nucleotídica de algunas regiones del gen 7r nos permitieron deducir que dicho segmento es una duplicación parcial del silvestre, en el cual se conserva la secuencia de los extremos 5' y 3' en la misma posición que en el silvestre y que éstas no se duplicaron en el interior del gen, sugiriendo que la posición de dichas secuencias es importante. El gen 7r codifica para una proteína similar a la silvestre. La estructura del gen 7r es similar a la de otros genes 7r rearreglados de RV aislados de la naturaleza, previamente estudiados.

EL PRODUCTO DEL GEN E2 DEL PAPILOMAVIRUS BOVINO (PVV-1) REPRIME LA TRANSCRIPCIÓN DE PROMOTORES QUINÉRICOS DE SV40 INTERFERIENDO CON LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS COMPROMETIDOS DE LA RUA POLIMERASA II.
 M. Zamora y A. García-Carrancá; M. Guzmán y F. Gariglio V. Dpto. de Genética y Biol. Mol. CINVESTAV-IPN. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
 Todos los papilomavirus genitales humanos poseen una forma conservada en doble estado de unión al factor E. (SUE2) justo antes de la caja TATA para el oncogen E6. La actividad de este promotor está fuertemente reprimida por el producto génico E2 de papilomavirus. Esta represión está mediada por la unión específica de E2 al doble SUE2. Por el contrario, cuando un SUE2 se localiza antes del promotor y el elemento potenciador, se observa una activación de la transcripción.
 Hemos analizado la transregulación de la transcripción por el producto génico E2 del PVV-1, en construcciones químicas que contienen uno o más SUE2. Se reemplazaron los elementos promotores de SV40 por oligonucleótidos que contenían SUE2; uno localizado entre la caja TATA y los repetidos de 21 pb, otro entre esos repetidos y el potenciador de SV40 y el tercero localizado a 282 pb de la caja TATA. Encontramos que la última construcción fue activada por E2 y las construcciones que contenían SUE2 más cerca de la caja TATA (25 y 37 pb), fueron reprimidas. Proponemos que la represión por E2 se lleva a cabo implicando la asociación específica de TFIIA y consecuentemente, la formación del segundo complejo comprometido.

DETECCIÓN DE PAPILOMAVIRUS HUMANO (PVV) EN CONDILOMA (Co) Y NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC) POR HIBRIDACIÓN IN SITU E INMUNOHISTOQUÍMICA
 P. Chávez Olmos; M. Salcedo; P. Figueroa; F. de la Torre; C. Santibañez; S. Luna; V. Añor; y F. Gariglio V. Dpto. Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, México, D.F. Hospital General "La Perla" Cd. Nezahualcoyotl, Edo. de México. Lab. de Patología, Hospital Adolfo López Mateos. ISSSTE y Hospital, Tehuantepec. 5 IMSS. 6 CISEI Cuernavaca, Morelos, México.
 La detección de antígenos virales y genomas de PVV en tejidos es importante en el diagnóstico de la infección por PVV. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado la presencia de secuencias de PVV-16 en el 31% de las muestras analizadas por la técnica de Southern blot en tumores de CaCv. Se analizaron 20 biopsias diagnosticadas como Co o NIC. Se determinó la presencia de secuencias de DNA viral por hibridación in situ con los genomas de PVV-6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 marcados con biotina. Además se estudió la presencia de proteína tardía (cápsida) mediante inmunohistoquímica. Se obtuvieron 5/20 positivas para DNA, de las cuales 2/5 presentaron (16,18,31,33,35), 1/5 (16,18), 1/5 (31,33,35) y 1/5 (6,11). En cuanto a proteína tardía 4/20 resultaron positivas; sorprendentemente ninguna biopsia fue positiva para ambos, DNA y proteína. Los resultados sugieren que puede haber otro tipo de PVV involucrado en las lesiones cervicales de pacientes mexicanas.

REPLICACION DE RHINOVIRUS HUMANO. TRADUCCION DEL RNA MENSAJERO.
 M. Cajero-Juárez, C. Fernández-Tomás y R.M. Del Angel. Dpto. Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN. Apdo. Postal 14-740, México, D.F. 07000.
 Al igual que los enterovirus, los rinovirus humanos (RVH) pertenecen a la familia Picornaviridae. Ambos géneros presentan la mayor homología en la región no traducida 5' (RNT 5') del RNA mensajero (RMm). Esta región parece regular la traducción del RMm viral mediante la interacción de proteínas del hospedero con regiones específicas de la RNT 5' (ver R.M. del Angel y cols., este Congreso).
 Los RVH presentan tres características que los hace importantes como modelo de estudio: a) son el principal agente etiológico del resfriado común; b) presentan una alta variabilidad con más de 115 serotipos; c) su replicación está fuertemente influida por la regulación a nivel de traducción del RMm. Para estudiar la interacción de proteínas con la RNT 5' del RMm de RVH, mediante la formación "in vitro" de complejos ribonucleoproteicos (cRNP), utilizamos ensayos de retardamiento en gels nativos de poliacrilamida. El sistema consiste en clonar regiones específicas de DNA complementario (DNAC) viral dirigido por el promotor 77, la transcripción "in vitro" por la RNA polimerasa T7 y la incubación de dichos transcritos con lavado ribosomal de células HeLa. Los resultados han mostrado: a) La formación de cRNP con regiones específicas de la RNT 5' y b) que el cRNP más estable, se forma con una región de horquilla que posee una secuencia y estructura homóloga en los Picornaviridae.

III
CONGRESO NACIONAL
DE INVESTIGACION
EN SALUD PUBLICA

LA COMISION ORGANIZADORA

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A

Dra. Rocío Zamorano

CON MOTIVO DE LA PRESENTACION DE SU PONENCIA
"EFECTO INHIBIDOR DE LA PROTEINA E2 EN LA TRANSCRIPCION DE LOS ONCOGENES DE
LOS PAPILOMAVIRUS GENITALES"

Cuernavaca, Mor., 27 - 29 de enero de 1992


Dr. Julio Frenk Mora
PRESIDENTE DE LA COMISION ORGANIZADORA


Dr. Carlos Santos-Burgoa
COORDINADOR DEL COMITE DE PROGRAMA CIENTIFICO

III
CONGRESO NACIONAL
DE INVESTIGACION
EN SALUD PUBLICA

27 - 29 de enero 1992

Cuernavaca, Morelos, México

PRESENTACION EN CARTEL.

NUMERO DE SESION:

TITULO: Efecto Inhibidor de la Proteína E2 en la Transcripción de Promotores Quiméricos de SV40.

AUTORES: R. Zamorano; A. García-Carrancá; M. Guido y P. Gariglio.

OBJETIVO: Todos los papilomavirus genitales humanos poseen en forma conservada un doble sitio de unión al factor E2 (SUE2) justo antes de la caja TATA para el oncogen E6. La actividad de este promotor está fuertemente reprimida por el producto génico E2 de papilomavirus. Esta represión está medida por la unión específica de E2 al doble SUE2. Por el contrario, cuando un SUE2 se localiza antes del promotor y el elemento potenciador, METODOLOGIA: se observa una activación de la transcripción.

RESULTADOS: Hemos analizado la transregulación de la transcripción por el producto génico E2 del papilomavirus bovino tipo 1 (PVB-1), en construcciones quiméricas que contienen uno o más SUE2, Se reemplazaron los elementos promotores de SV40 por oligonucleótidos que contenían SUE2; uno localizado entre la caja TATA y los repetidos de 21 pares de bases, otro entre esos repetidos y el potenciador de SV40 y el tercero localizado a 282 pares de bases, otro entre esos repetidos y el potenciador de SV40 y el tercero localizado a 282 pares de bases de la caja TATA.

Encontramos que la última construcción fue activada por E2 y las construcciones que contenían SUE2 más cerca de la caja TATA (25 y 37 pb), fueron reprimidas.

CONCLUSIONES O PERSPECTIVAS: Proponemos que la represión por E2 se lleva a cabo impidiendo la asociación específica de TFIIA y consecuentemente, la formación del segundo complejo comprometido.

Nombre del autor que presenta el proyecto: ROCIO ZAMORANO

Sección DEPTO. DE GENETICA, CINVESTAV-IPN,
AP. 14-740, MEXICO, 07000, D.F.

Tel 7520677 Fax 5866290
EXT. 5310

X Encuentro de Investigación Biomédica



MEMORIAS

FACULTAD DE MEDICINA
DE LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

19 al 23 de octubre de 1992

del gen. La proteína que se encontró como mayoritaria tuvo un peso de 135.000 D, pero no compitió específicamente en la asociación. Otras proteínas, principalmente una de 38 KD, si compitieron específicamente. Utilizando extractos de hígado de rata, se determinó que el factor mayoritario es una proteína de aproximadamente 60 KD, la cual, tampoco compete específicamente. El factor de 38 KD también se encontró en este extracto y compitió específicamente con la secuencia fría. La proteína mayoritaria de 135 KD presente en células HeLa, no se encontró asociada al fragmento cuando el método de marcaje de "Nick Translation" es sustituido por el de alargamiento de cadena por la enzima "Klenow".

El ácido retinoico, análogo de la vitamina A, parece estar relacionado con la concentración de al menos un factor nuclear que se une específicamente a la región del primer intrón de c-myc que incluye al sitio Mac III del nucleótido 3013 de la secuencia. Esta proteína pudiera ser la responsable del bloqueo en el alargamiento del transcrito, que es evidente cuando las células cancerosas HL60 pierden su fenotipo canceroso y se diferencian.

234. INTEGRACION DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO JUNTO AL ONCOGEN C-MYC EN CANCER GENITAL

M. en C. Mauricio Salcedo Vargas
 Biól. Pedro Chavez Olmos
 Biól. Rocío Zamorano Ulloa
 D. en C. Patricia Gariglio Vidal

Depto. de Genética y Biología Molecular,
 CINVESTAV-IPN, Apdo. Postal 14-740, 07000 México, D.F.

Estudios recientes muestran una asociación de ciertos tipos de virus de papiloma humano (HPV) con el carcinoma cervical (CaCu), en particular los tipos 16 y 18. Secuencia de DNA de tipos específicos de HPV, se han encontrado integradas en el genoma celular en la mayoría e los CaCu. Las consecuencias de la integración de HPV sobre la estructura y expresión del genoma viral ha sido estudiada en forma muy extensa, pero poco es conocido sobre sus efectos en genes celulares involucrados en la proliferación celular. En el presente trabajo fueron estudiados 16 CaCu para detectar la presencia de secuencias de DNA del HPV16 y posibles alteraciones del oncogén c-myc. Los DNAs extraídos de las muestras fueron digeridos con enzimas de restricción, sujetos a electroforesis; posteriormente fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (transferencia tipo Southern) e hibridados contra sondas específicas de c-myc o HPV16. En el 31% de las muestras se detectaron secuencias del HPV16, además una elevada alteración del

oncogén c-myc. Sorpresivamente observamos en tres tumores, señales de hibridación similares para ambas sondas. Estos fragmentos de DNA fueron clonados. Los resultados muestran que secuencias integradas del HPV16 se encuentran junto al oncogén c-myc, el cual está alterado estructuralmente. Estos resultados sugieren que la alteración de oncogenes celulares vía integración viral, pueden jugar un papel importante en la progresión tumoral.

235. DIFERENCIAS EN EL NUMERO DE COPIAS/CELULA Y LA PRESENCIA DE LOS GENES E1/E2 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) ENTRE CANCERES DEL CERVIX POSITIVOS PARA EL VPH16 Y EL VPH18

Mayor M.C. Jaime Berumen Campos
 Subtte. Aux. Biól. Leonora Casas Dávila

Escuela Militar de Graduados de Sanidad y Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y la Fuerza Aérea. Av. Periférico y Batalla de Celaya, Lomas de San Isidro C.P. 11649, México D.F.

Los VPHs 16 y 18 están asociados a la etiología del cáncer cérvico-uterino (CaCu). Estos VPHs contienen los oncogenes E6 y E7, los cuales están reprimidos por la proteína viral E2 cuando el VPH está en forma episomal. La hipótesis del mecanismo de transformación de estos virus, involucra la integración del DNA viral al genoma celular con la ruptura del gen viral E2, permitiendo con ello la expresión de los oncogenes E6 y E7. Sin embargo, a diferencia de los CaCus positivos para el VPH 18, en los positivos para el VPH 16 el DNA viral no se encuentra integrado en todos los CaCus, lo cual pone en duda el rompimiento del gen E2 en los tumores donde el virus no está integrado. Por otra parte, el complejo formado por las proteínas codificadas por los genes E1 y E2 del VPH están relacionadas con la replicación del genoma viral en modelos in vitro. En este trabajo exploramos mediante la técnica de hibridación en punto, el número de copias del DNA viral por célula en 45 CaCus positivos para el HPV 16 y 22 para el HPV 18 y la presencia de los genes E6/E7 y E1/E2 en 25 de las muestras positivas para el HPV 16 y 20 de las positivas para el HPV 18, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de la hibridación tipo "Southern blot". Los CaCus positivos para el VPH 16 tuvieron en promedio un número de copias/célula mucho mayor que los positivos para el VPH 18 (288.6 ± 73.7 vs. 9.6 ± 3.7). Los genes E6/E7 se encontraron presentes en todos los tumores. Los genes E1/E2 se encontraron en el 52% de los CaCus positivos para el



VPH 16 y sólo en el 5% de los positivos para el VPH 18. Entre los tumores positivos para el HPV 16, los positivos para los genes E1/E2 tuvieron un número de copias mucho mayor que los negativos para E1/E2 (575.5 ± 142.2 vs. 43.3 ± 20.2). Estos datos sugieren que en la mitad de los CaCus positivos para el VPH 16, están involucrados otros mecanismos de transformación diferentes a la ruptura del gen E2 y probablemente estén relacionados con la amplificación del genoma viral.

236. EL EFECTO DE LAS SALES BILIARES HUMANAS SOBRE EL CRECIMIENTO, LA ESPORULACION Y LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINA DE *Clostridium perfringens* TIPO A.

M.C. Norma Laura Heredia Rojas
Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla
Ph.D. Ronald Labbé
Dr. José Santos García Alvarado

Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, U.A.N.L., Madero y Eduardo Aguirre Pequeño. - Monterrey, Nuevo León, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Universidad de Massachusetts, Amherst, M.A. - 01003, U.S.A.

Las sales biliares son sustancias que continuamente se están secretando en el intestino delgado, lugar donde *Clostridium perfringens* llega junto con el alimento contaminado e inicia el proceso de esporulación y producción de enterotoxina, pudiendo originar una toxi-infección alimentaria.

En este trabajo fué estudiado el efecto del jugo y las principales sales biliares descargadas en el duodeno humano (colato, taurocolato, quenodesoxicolato y glicoquenodesoxicolato de sodio), sobre el crecimiento, la esporulación y la producción de enterotoxina de *C. perfringens*.

Cada sal biliar fué capaz de inhibir el crecimiento bacteriano a diferente grado. Una mezcla de sales biliares tuvo la capacidad de inhibir completamente el crecimiento de las cepas enterotoxigénicas, pero no de la cepa no enterotoxigénica usada. El jugo biliar humano diluido hasta 1:320 inhibió completamente el crecimiento de todas las cepas.

Se observó un efecto estimulador de las sales biliares sobre la esporulación de todas las cepas. Las sales también fueron capaces de incrementar la producción de enterotoxina en las cepas enterotoxigénicas estudiadas. No se observó ningún efecto estimulador de la producción de enterotoxina cuando se examinó la cepa no enterotoxigénica.

237. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN ALGUNOS EVENTOS METABOLICOS RELACIONADOS CON LA ESPORULACION, LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINA Y LA FORMACION DE UNA INCLUSION INTRACELULAR DE *Clostridium perfringens* TIPO A

JOSE SANTOS GARCIA ALVARADO, DR.
RONALD LABBE, DR.
MANUEL RODRIGUEZ QUINTANILLA, DR.

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, FACULTAD DE MEDICINA, UANL, MONTERREY, N.L., MEXICO Y LABORATORIO DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS, UNIVERSIDAD DE MASSACHUSETTS, E.U.A.

Existen informes en la literatura que indican que la esporulación y la producción de enterotoxina de *C. perfringens* tienen una temperatura óptima de 37°C, y que a la temperatura óptima de crecimiento (TOC) de la bacteria (43-46°C) esos eventos ocurren en baja proporción o no son detectables.

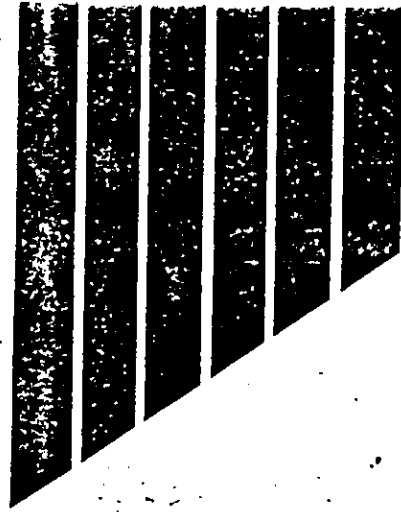
En este trabajo se estudió la esporulación y la producción de enterotoxina de *C. perfringens* a su temperatura óptima de crecimiento en el medio Duncan y Strong (DS) con almidón o rafinosa.

Se demostró que la incapacidad de varias cepas enterotoxigénicas de esporular y producir enterotoxina a 46°C. se debe a la incapacidad de esas cepas de hidrolizar el almidón del medio de cultivo a esa temperatura, lo que origina un crecimiento muy pobre y que muchas células que inician el proceso de esporulación no sean capaces de completarlo. Además se encontró que un grupo de cepas no enterotoxigénicas sí hidrolizaba el almidón a esa temperatura y podían esporular y crecer satisfactoriamente.

En experimentos similares, pero sustituyendo el almidón del medio DS por rafinosa, se demostró que las cepas enterotoxigénicas estudiadas, son capaces de esporular y producir enterotoxina a su TOC en proporciones similares a los reportados a 37°C. Otro dato importante fué que esos procesos se llevaban a cabo más rápidamente a la TOC que a 37°C. No se detectó producción de enterotoxina en las células vegetativas no esporuladas cultivadas a su TOC.

Por otro lado, las esporas producidas a su TOC fueron más resistentes al calor que las obtenidas a 37°C, las que a su vez lo fueron más que las producidas a 32°C.

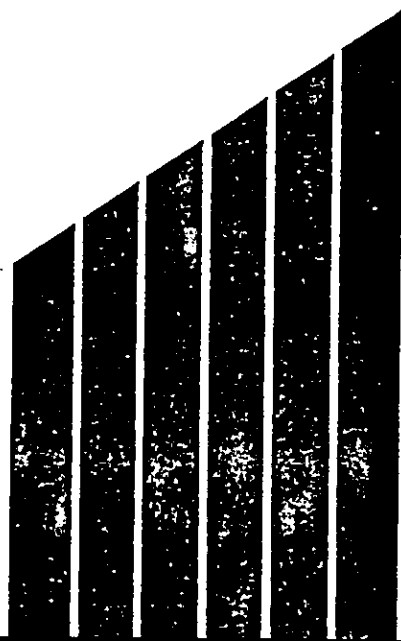
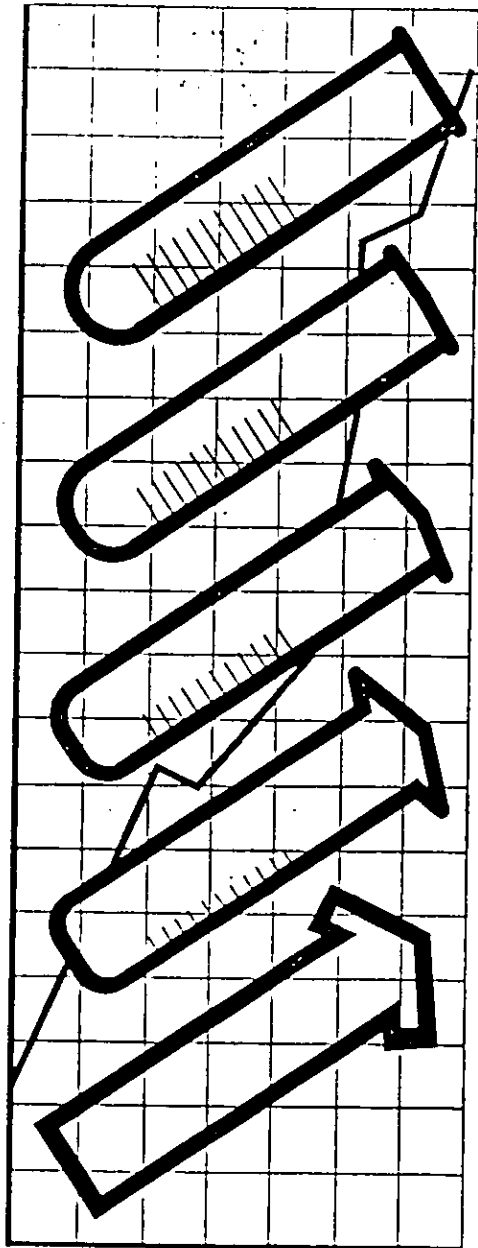
Además, se informa por primera vez, de la presencia de un cuerpo intracelular (CIB) que es



**IV
CONGRESO
NACIONAL
DE
INVESTIGACION
EN
SALUD
PUBLICA**

CUERNAVACA, MORELOS
25 27 ENERO 1993

**CUADERNO DE
TRABAJO**



Caracterización molecular de la resistencia

a cefalosporinas de tercera generación en el aislamiento
clínico de *Klebsiella pneumoniae* R3455

Conde-Bonfil M C, Ovando C, Piza JL, Silva J, González

Castro V, Fuchs Y

Instituto Nacional de Salud Pública

Introducción: las enterobacterias son de los patógenos más comunes en infecciones intrahospitalarias multirresistentes. Las cefalosporinas de tercera generación (CF3a. gen) son antibióticos introducidos en la década pasada y de gran uso en hospitales. Informes recientes indican la aparición de cepas de *Klebsiella* resistentes a estos antibióticos mediada por diferentes variedades de la enzima B-lactamasa. Se ha demostrado que B-lactamasa (que originalmente hidrolizan ampicilina) como las denominadas TEM o SHV, pueden hidrolizar CF 3a. gen por mutaciones puntuales.

Objetivos: estudiar las bases moleculares de la resistencia a CF 3a. gen.

Metodología: por el método de dilución en agar, se encontró en varios aislamientos clínicos de *Klebsiella*, resistencia a CF 3a. gen y a antibióticos no relacionados de B-lactamasa (bla), por el método yodométrico y del disco de cefinasa. Asimismo se demostró que la resistencia a CF 3a. gen es sensible al inhibidor ac clavulánico, lo que prueba que es mediada por una bla. Se ha aislado y analizado, por restricción con endonucleasas, ADN genómico y plasmídico en el que se apreció un barrido y bandas discretas respectivamente. Con base en la homología (en secuencia nucleotídica) entre las bla TEM, SHV, LEN se diseñó un oligonucleótido alrededor de la serina catalítica 70 que reconoce el gen de dichas bla. Este oligo se utilizó como sonda radioactiva en un experimento tipo Southern en el que se puso ADN genómico y plasmídico. En resultados preliminares, se observaron dos bandas de hibridación de alto peso molecular con el ADN de R3455 que indica la presencia del gene de bla. Se aprecia incorporación de marca, tanto en la preparación genómica como en la plasmídica, lo que puede sugerir ambos orígenes. Posteriormente se diseñaron oligos en los extremos de bla para usarlos como iniciadores en la amplificación del gene. Por medio de la reacción de PCR, amplificamos específicamente el gene de la bla tipo TEM en R3455 (739 nt). Por conjugación, se transfirió la resistencia a CF 3a. gen de R3455 a una *E. coli* sensible. Posteriormente el ADN de la trasconjugante se amplificó con PCR, obteniendo el mismo fragmento de 39 nt de bla tipo TEM. lo que sugiere que es esta b-lactamasa plasmídica, la responsable de la resistencia a CF 3a. gen. Por otra parte, se co-transfirió, además, resistencia a cloranfenicol, aminoglucósidos, estreptomycin, tetraciclina y no así a quinolonas.

Conclusiones: los resultados demuestran que la resistencia a CF 3a. gen está mediada por una B-lactamasa tipo TEM (PCR) sensible al ácido clavulánico, localizada en un plásmido auto-transferible y multirresistente.

Integración del virus de papiloma humano junto al oncogén c-MYC en cáncer genital

Chávez-Olmos P, Salcedo-Vargas M, Zamorano-Ulloa R,

Gariglio-Vidal P

CINVESTAV-IPN

Estudios recientes muestran una asociación de ciertos tipos de virus de papiloma humano (HPV) con el carcinoma cervical (CaCu), en particular los tipos 16 y 18. Secuencias de DNA de tipos específicos de HPV, se han encontrado integrados en el genoma celular en la mayoría de los CaCu. Las consecuencias de la integración de HPV sobre la estructura y expresión del genoma viral, han sido estudiadas en forma muy extensa, pero poco se sabe sobre sus efectos en genes celulares involucrados en proliferación. En el presente trabajo se estudiaron 16 CaCu para detectar la presencia de secuencias de DNA del HPV-16 y posibles alteraciones del oncogén c-myc. Los DNAs extraídos de las muestras fueron digeridos con enzimas de restricción, sujetos a electroforesis; posteriormente fueron transferidos a membranas de nitocelulosa (transferencia tipo Southern) e hibridados contra sondas específicas de c-myc o HPV-16. En el 31% de las muestras, se detectaron secuencias del HPV-16, además de una elevada alteración del oncogén c-myc. Sorpresivamente se observaron, en tres tumores, señales de hibridación similares para ambas sondas. Estos fragmentos de DNA fueron clonados. Los resultados muestran que secuencias integradas del HPV-16 se encuentran junto al oncogén c-myc, el cual está alterado estructuralmente y sugieren que la alteración de oncogenes celulares por vía viral puede jugar un papel importante en la progresión.

Pros y contras del tratamiento antiparasitario masivo

Cruz Reyes A

Instituto de Biología, UNAM

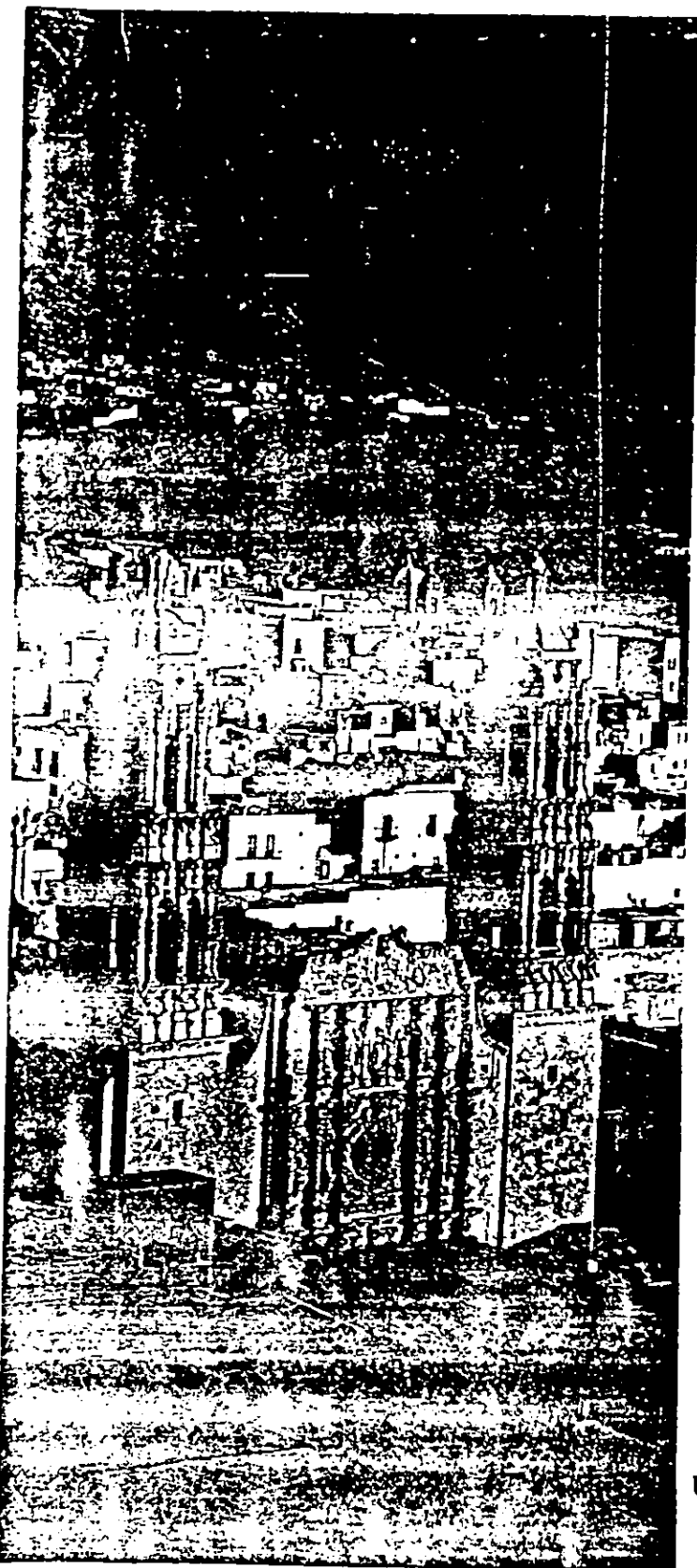
La quimioterapia y la quimioprofilaxis sólo pueden ser utilizadas como una medida apropiada cuando se tratan casos individuales, bajo condiciones controladas después de diagnóstico parasitológico.

Las enfermedades parasitarias, en condiciones de campo, son un problema multifactorial; por lo tanto, los métodos de control deben incluir aspectos epidemiológicos, ecológicos, económicos, socioculturales, además de la consideración del desarrollo de resistencia de los parásitos a los fármacos.

Si bien las medidas de quimioterapia y quimioprofilaxis son importantes, existen otras para las necesidades a gran escala, como una estrategia de control para reducir o eliminar las poblaciones de parásitos de un área determinada.

Al momento de elaborar o de instrumentar programas de quimioterapia masiva, deben considerarse las características del parásito, como son los métodos de transmisión y su patogenicidad, las relaciones del parásito con su huésped y el

SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUIMICA



XX CONGRESO NACIONAL



ZACATECAS, ZAC.
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE ZACATECAS
OCTUBRE 30 - NOVIEMBRE 4
1994

INESTABILIDAD GENÉTICA EN SECUENCIAS SIMPLES REPETIDAS ES UN EVENTO DEL CÁNCER COLORECTAL HEREDITARIO NO POLIPOIDEO (HNPCC).
Angélica Quintana, **Leonor Herrera** ** y **Manuel Rencuche*****. Facultad de Química, UNAM, ** Medical Center of Delaware, Wilmington, DE, ** California Of Biological Research Institute, La Jolla CA.

En previo trabajo Ionov y col (1), describieron evidencia experimental acerca de un nuevo mecanismo de carcinogénesis en colon, el cual acumula mutaciones somáticas ubicuitas (USM) que sobrepasan cientos de miles en secuencias simples repetidas (SMS). Estos autores, reportaron que tumores de pacientes Afro-americanos (Área de Alabama), con estas mutaciones, tienen localización preferencial en el colon proximal, la relativa etapa precoz de la progresión del tumor así como la baja recurrencia sugieren que estos tumores se sobreponen con tumores de cáncer colorectal no polipoideo (HNPCC) (síndrome de Lynch 1). Con el objeto de confirmar los resultados previos, llevamos a cabo un estudio con una población mayor, se colectaron 21 tumores de pacientes afro-americanos (área de Delaware). Se aisló el DNA de los tumores y se amplificó por PCR en diferentes regiones del cromosoma usando primers específicos (D1S158, D4S194, D6S105, D8S199 y K1M, KGR) (4). Estos resultados demostraron diferencias en 4/21 de los tumores estudiados, (4). Aunque los resultados previamente reportados por Ionov y col. (1), fueron estadísticamente significativos en el límite, los resultados descritos aquí sugieren que no hay prevalencia significativa de los tumores con USM en SRS en la muestra de pacientes Afro-americanos (área de Delaware), pero la correlación con la localización preferencial en el colon del lado derecho fué confirmada.

ANÁLISIS DE LOS ELEMENTOS INVOLUCRADOS EN LA EXPRESIÓN DEL GENOMA DEL VIRUS DEL DENGUE. **Zaidy E.M. Remy F.M.** y **Ruz B.H.** Departamento de Biología Molecular Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. México D.F.

El dengue es un problema mundial de salud pública que se presenta tanto en países tropicales como subtropicales. Existen cuatro diferentes serotipos del virus del dengue (Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3 y Dengue 4), los cuales se transmiten al hombre por la picadura del mosquito *Aedes aegypti*. En base al desconocimiento en general para los flavivirus y en particular para el virus del dengue de los elementos involucrados en los pasos iniciales de la traducción, nos hemos propuesto llevar a cabo el análisis estructural y funcional de la región no traducible 5' (5'NTS) del mismo. Actualmente hemos analizado la estructura primaria de la 5'NTS del dengue 2 mexicano, observando que ésta región consta de 100 nucleótidos en los cuales está presente un sitio de unión al ribosoma, una secuencia complementaria al extremo 3' del 16S del RNAr y una estructura homóloga al Cap. Así mismo, se llevó a cabo la identificación de las proteínas celulares y/o virales involucradas en la unión específica de esta región mediante ensayos de retardamiento en gels nativos de poliacrilamida, utilizando extractos citoplasmáticos y lavados ribosomales tanto de células infectadas como en cultivos de células no infectadas. En estos ensayos se empleó una ribonucleasa radiactiva, específica de esta región, la cual se obtuvo mediante transcripción *in vitro*. En los ensayos con extractos citoplasmáticos observamos la presencia de un complejo en las células infectadas. En los análisis de lavados ribosomales observamos la presencia de un complejo tanto en células infectadas como no infectadas, lo cual indica que tanto las proteínas virales como celulares son las que están participando en los complejos (RNA-PROTEINA) de iniciación.

099

100

FENÓ. UNA MUTANTE HALOTOLERANTE DE LEVADURA.

Y. Fardo, A. Covarrubias, S. Hizar y S. Carlota
 Depto. de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología, U.N.A.M. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados IPN México.

En el presente trabajo se reportó una mutante halotolerante de levadura (FMO) afectada en un solo gen que muestra efectos pleiotrópicos (patrón de proteínas 2D, contenido intracelular de Na⁺ y K⁺). La relación intracelular de Na⁺/K⁺ de esta mutante cuando crece en presencia de 1 M NaCl es de alrededor de 0.27 mientras que en la mutante control (calcineurina) esta relación es de aproximadamente 2.5 produciéndose entonces un fenotipo letal (Nakamura, T. et al., 1993).

El fenotipo pleiotrópico de la mutante FMO sugiere una posible alteración en un paso regulador de la ruta de halotolerancia. Esta alteración podría ser a nivel transcripcional y/o en un paso temprano en la vía de transducción de señales. El aislamiento del gen responsable de tal fenotipo pleiotrópico dará información importante sobre el paso de la ruta de halotolerancia afectada.

Mediante la técnica de "differential display" (Liang, P. y A. S. Pardee, 1992) hemos aislado cuatro cDNA's independientes cuyos niveles de mRNA's son más altos en la mutante FMO cuando crece en presencia de 1M NaCl.

REFERENCIAS:

- *Liang, P. and Pardee, A.S. (1992) Science 257:967-971.
- *Nakamura T., Lei Y., Hirata D., Ramba S., Harada S., Hirokawa T. y Miyahara, Y. (1993) EMBO Journal 12 no. 11 pp 4063-4071.

MECANISMO DE REPRESIÓN POR LA PROTEÍNA VIRAL E2 SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL HPV-18: EFECTO DE LA DISTANCIA "CAJA TATA" - SITIO E2.

Carrillo E.R., Carrillo-Guerrero P., Zambrano R. y Cariglio P. Depto. de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN Av. IPN # 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México, D.F. C.P. 07100

Los productos del gen E2 de papilomavirus pertenecen a una familia de moduladores transcripcionales que pueden activar o reprimir la expresión viral. La proteína E2 es un factor que interactúa con el DNA en una secuencia específica (ACCGXNHNCGGT). Los sitios de unión de E2 están conservados en los diferentes papilomavirus. Sin embargo, el número y posición de estos son específicos para cada tipo viral. En la región control (LCR) del HPV-18 hay dos sitios de unión a E2 muy cercanos (a solo tres nucleótidos) de la caja TATA. En esta configuración E2 actúa como un represor. Esta represión puede ser biológicamente relevante para la progresión tumoral, ya que en la mayoría de los tejidos malignos el genoma de HPV está integrado justo al nivel del gen E2. Se ha sugerido que en los promotores P97 y P105 de HPV-16 y HPV-18 la proteína E2 reprime la transcripción por interferencia con la formación del complejo de iniciación. Nuestro trabajo consistió en determinar la distancia necesaria para liberar la represión mediada por E2 en la LCR de HPV-18. Generamos dos construcciones con 9 y 12 nucleótidos de distancia entre el sitio E2 proximal y la caja TATA, usando un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa. La actividad transcripcional de nuestras construcciones fue analizada en ensayos de cotransfección en presencia y ausencia de la proteína E2. Observamos que a 9 nucleótidos de distancia se libera la represión por E2 y a 12 nucleótidos de distancia no solo se libera la represión sino que incluso hay una activación transcripcional.

INER

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

DRA. ROCIO ZAMORANO ULLOA

P r e s e n t e

El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias le agradece su excelente participación con el **Trabajo:**

PRESENCIA Y TIPIFICACION DE HPV EN MUESTRAS DE PAPILOMATOSIS LARINGEA

Durante las **XXVII JORNADAS MEDICO QUIRURGICAS**, que se llevaron a cabo del 4 al 8 de septiembre del año en curso, en el Auditorio "Dr. Miguel Jiménez" de este Instituto.

Es indudable que su presencia contribuyó al éxito de este evento científico.

México, D.F., 8 de septiembre de 1995.

A T E N T A M E N T E

DRA. MARGARITA SALAZAR FLORES

Jefe de la Div. de Educación Médica

Continua, INER

MSF^a ampa.

PAPILOMATOSIS LARINGEA Y VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

^{1,3}Manjarrez ME, ²Zamorano R, ⁴De la Torre C, ¹Villaalba J, ¹Selman M, ^{2,3}Gariglio P.

¹INER, ²CINVESTAV, ³CICATA, ⁴HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO

La papilomatosis laríngea es un tumor benigno de vías respiratorias, que se presenta de manera crónica y recurrente. Si bien es cierto que es más frecuente en niños menores de 7 años, puede persistir en edad adulta e incluso inducir en algunos casos el desarrollo de una neoplasia. Los síntomas pueden ir desde molestias respiratorias leves hasta obstrucción total de vías respiratorias. Por el momento no hay tratamiento efectivo. La etiología se ha relacionado con el virus del papiloma humano (HPV), en particular con los tipos 6 y 11. En algunos tipos de HPV los genes E6 y E7 pueden actuar como oncogenes; por ejemplo en los HPV de alto riesgo para cáncer de cérvix, E6 puede unirse e inactivar a p53 y E7 puede asociarse e inactivar a varias proteínas, incluyendo a pRb, la cual tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular. En HPV de bajo riesgo, E6 no se une a p53, pero E7 si tiene afinidad por pRb aunque menor que la de los de alto riesgo. También se sabe que los HPV de bajo riesgo pueden aumentar la expresión de genes celulares como c-jun, lo cual depende en gran parte del tipo celular infectado. En México no se cuenta con estudios previos de papilomatosis laríngea, de tal manera que se desconoce la etiología y no se sabe si algunos genes celulares participan en dicha enfermedad. Por tal motivo, los objetivos de esta línea de trabajo son: a) detectar la presencia así como el tipo de HPV en muestras de papilomas laríngeos de niños; b) estudiar la expresión de los genes celulares: c-jun, c-myc, bcl-2, Rb y p53; c) estudiar la expresión de genes virales E6 y E7.

Se estudiaron 14 niños a los que se les realizó disección de los papilomas por cirugía. La presencia del HPV se efectuó por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimeras (PCR); la tipificación se realizó por medio de patrones de restricción y la expresión de los oncogenes y antioncogenes celulares se valoró inicialmente por inmunohistoquímica; la expresión de E6 y E7 se mide por RT-PCR. En 10 de las muestras se identificó el ADN viral y en siete de ellas se pudo tipificar el virus, cuatro con HPV6, tres con HPV11. La proteína pRb se expresó en la mayoría de las muestras, pero en algunas de ellas su expresión se encuentra disminuida. Respecto a la expresión de p53 y de genes celulares y virales se presentarán y discutirán resultados recientes

EVENTO CONJUNTO
VI CONGRESO DE LA SOCIEDAD
IBEROAMERICANA
DE BIOLOGIA CELULAR (SIABC)

Y

III REUNION DE LA SOCIEDAD
MEXICANA DE
BIOLOGIA CELULAR, A.C. (SMBC)

OAXTEPEC, MORELOS, MEXICO

2 al 6 de Octubre de 1995

SIABC:

Presidente:

Dr. Horacio Merchant Larios (México)

Secretario:

Dr. Enríque Brandán (Chile)

Directores:

Dr. Wanderley de Sousa (Brasil)

Dr. Cesar Fraga (Argentina)

Dra. Eugenia del Pino (Ecuador)

Dr. Hugo González (Perú)

Dr. Jaime Renau-Piqueras (España)

SMBC:

Presidente:

Dr. Horacio Merchant Larios

Vicepresidenta:

Dra. Isaura Meza G.

Secretario:

Luis Felipe Jiménez García

RESUMEN (Español, Portugués o Inglés)
(Comunicación oral o cartel)

TITULO: Transgenic mice expressing Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes under the control of a keratin promoter

Autor/es: Félix Recillas¹, Diana Escalante¹, Rocio Zamorano², Pedro Chavez², Patricio Gariglio² and Luis Covarrubias¹

Inicié texto:

¹Instituto de Biotecnología, Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca 62271 Morelos, México. ²Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, Apdo. Postal 14-740, México, D.F. 07300.

The human papillomavirus type 16 (HPV-16) plays an important role in the development of epithelial lesions in the uterine cervix region, which often progress to cervical cancer. The HPV gene products, E6 and E7, target relevant molecules controlling the cell cycle progression: p53 and the retinoblastoma gene product RB, respectively. To generate an animal model for studying the human papillomavirus-induced neoplastic progression, we directed the expression, in transgenic mice, of the HPV-16 E6 and E7 oncogenes to epithelial cells using the bovine cytokeratin CIV* (human K6) promoter. We obtained two transgenic lines, one of which presented a clear phenotype in the skin. All transgenic mice of this line showed a generalized reduction in hair density, which was accentuated in females. In agreement with the specificity of the promoter used, high mRNA expression levels of the transgenes were detected in the skin and the tongue. This expression correlated with histopathological features observed in these tissues. The skin presented a thinner dermis layer with abnormal distribution of hair follicles. In the tongue the filiform papillae presented gross distortions and a thinner stratum corneum was observed. No tumors have developed up to date.

This work was supported by CONACyT (1663M9209) and PNUD/MEX/93/019.

COMUNICACION ORAL () CARTEL () 100 x 120 cm.

Area temática: 1ª opción _____; 2ª _____; 3ª _____; Otra _____

(Poner el número de Simposio correspondiente)

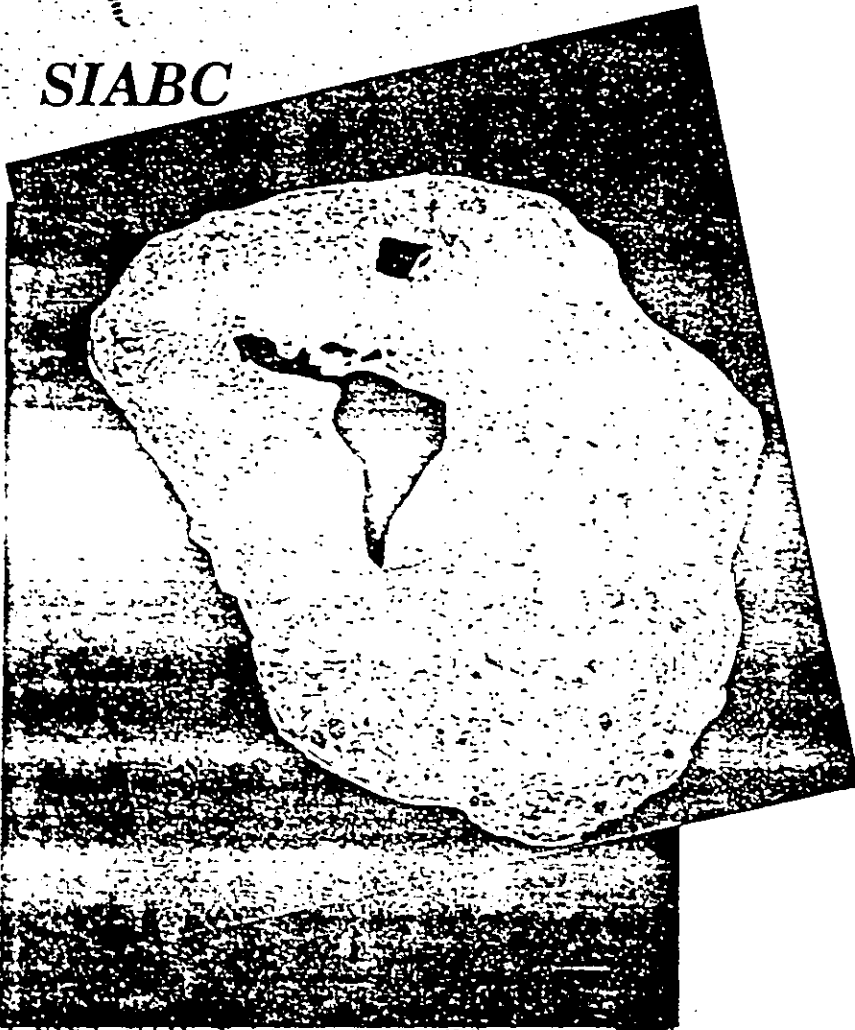
Si solicita beca, anexe también resumen de su C.V. (Una cuartilla)

(La fecha límite de recepción de trabajos es el 31 de Julio de 1995)

VI CONGRESO



SIABC



**SOCIEDAD IBEROAMERICANA
DE BIOLOGIA CELULAR**

Oaxtepec, México
Octubre 2 - 6 de 1995

RESUMEN (Español, Portugués o Inglés)
(Comunicación oral o cartel)

TITULO: Generación de ratones transgénicos expresando los oncogenes virales E6 y E7 de papilomavirus humano tipo 16 bajo el control de un promotor de keratinas

Autor/es:

Institución: Félix Recillas¹, Diana Escalante¹, Rocio Zamorano², Pedro Chavez², Patricio Gariglio² y Luis Covarrubias¹

Inicie texto: ¹Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca 62271 Morelos, México. ²Depto. Genética y Biol. Mol. CINVESTAV-IPN, Apdo. Postal 14-740, México D.F. 07300.

Los papilomavirus humano tipo 16 y 18 (HPV-16 y HPV-18) juegan un papel trascendente en el desarrollo del cáncer cervico uterino. Dentro de estos virus, las oncoproteínas E6 y E7 afectan el control de la proliferación celular por una parte, por la degradación, mediada por la primera, de la molécula p53 y, por otra parte, por la acción de la segunda sobre el producto del gene de retinoblastoma, Rb. Siendo p53 y Rb dos moléculas vitales para el control y progresión del ciclo celular, la acción de los oncogenes virales E6 y E7 sobre estas moléculas pueden ser fundamentales para los desajustes que dan lugar al proceso tumorigénico. Con el objetivo de establecer un modelo animal del cáncer cervico uterino hemos dirigido la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV-16 en células epiteliales usando el promotor de la citokeratina IV bovina (equivalente a la citokeratina 6 humana) en animales transgénicos. De dos líneas de ratones transgénicos obtenidas, una presenta un número mayor de copias del transgen integrado a su genoma y los ratones presentan afecciones en la piel. Análisis histológicos de estos ratones han mostrado modificaciones en la estructura epitelial en lengua y piel. Estas afecciones parecen ser reguladas hormonalmente puesto que se manifiestan notoriamente en la etapa de la pubertad, siendo más agudas en las hembras. Estudios de expresión mediante hibridaciones tipo Northern y de RT-PCR han confirmado que el transgen se expresa en piel, cola y lengua. Con la caracterización de estos ratones transgénicos nos encontramos en la posibilidad de analizar el estado de las moléculas blanco p53 y Rb pero, además esperamos que el potencial de susceptibilidad para la generación de tumores favoreciera el estudio del evento tumorigénico. Estas líneas de animales transgénicos pueden resultar ser un modelo para estudiar los orígenes del cáncer cervico uterino.

Este trabajo fue apoyado por CONACyT (proyecto M92909-1663) y DGAPA-UNAM.

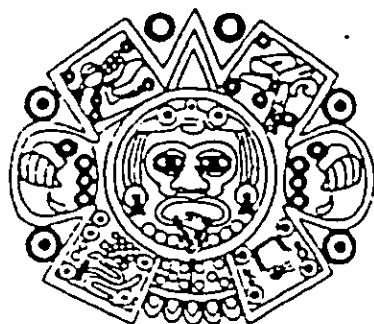
COMUNICACION ORAL () CARTEL (x) 100 x 120 cm.

Area temática: 1ª opción II; 2ª _____; 3ª _____; Otra Oncogenesis

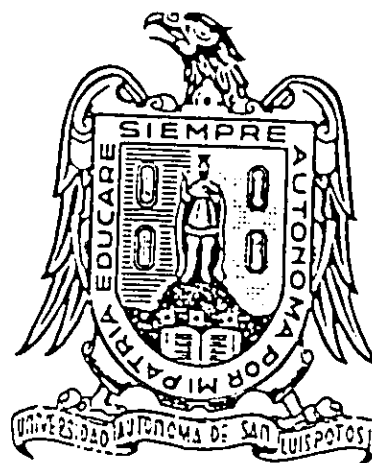
(Poner el número de Simposio correspondiente)

Si solicita beca, anexe también resumen de su C.V. (Una cuartilla)

(La fecha límite de recepción de trabajos es el 31 de Julio de 1995)



**Asociación Mexicana de
Genética Humana**



XX
**CONGRESO NACIONAL
DE GENÉTICA HUMANA**

**San Luis Potosí, SLP
4 - 7 de Octubre 1995**

PAPILOMATOSIS LARINGEA Y PAPILOMAVIRUS HUMANO

Zamorano R*, Manjarrez ME**, Uranga D**, Méndez J**, Seda A**, Cariglio P*.

* Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N.
** Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, S.S.A.

La papilomatosis laríngea es una enfermedad crónica y/o recurrente, que se presenta principalmente en menores de 7 años. En esta enfermedad podría estar involucrado un papilomavirus humano (PVH), que infecta el tracto respiratorio, principalmente la glotis y subglotis y en menor proporción la tráquea y los bronquios. El PVH es un virus de doble cadena circular. Este virus infecta células epiteliales dando lugar a papilomas. Por tecnología de ADN recombinante, se han identificado más de 60 diferentes tipos de PVH.

Los objetivos del trabajo son: detectar la presencia del ADN viral en muestras de papilomas laríngeos de pacientes que acuden al INER, y determinar el tipo viral. Una vez tomadas las muestras, éstas se congelaron en nitrógeno líquido, se les extrajo el ADN usando fenol-cloroformo. En la detección del genoma del PVH se usó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante oligonucleótidos sintéticos de la región tardía del virus (LIC1 y LIC2), con los cuales pueden detectarse 9 tipos diferentes de PVH. La presencia del ADN se confirmó por electroforesis en agarosa y el tipo viral se determinó utilizando las enzimas de restricción: AclI, DdeI, RsaI, PstI y XbaI. En las 7 muestras estudiadas hasta el momento, se pudo detectar la presencia del ADN viral; en 4 muestras se identificó al PVH-6, mientras que en 3 de las muestras se identificó al PVH-11.

Por los resultados obtenidos, podemos concluir, que en todas las muestras analizadas, se encontró una estrecha relación entre las lesiones y la presencia viral.

LA EXPRESION DE LOS ONCOGENES E6/E7 DEL HPV 16 EN CARCINOMAS CERVICALES ES MAYOR CUANDO EL VIRUS ESTA EPISOMAL.

*Ordoñez Razo R.M.; Berumen Campos, J.

Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad, U.D.E.F.A., México D.F.

La expresión de los genes E1/E2 durante la integración del Virus de Papiloma Humano (VPH) y la subsecuente desrepresión de los oncogenes E6/E7 ha sido propuesta como el mecanismo de progresión de lesiones benignas a cáncer cervical. Sin embargo, se ha observado que en el 64% de los casos de cáncer cervical positivos para VPH 16, el virus se encuentra episomal y muy amplificado.

En este trabajo se investigó el nivel de expresión de los genes E6/E7 y E1/E2, su correlación con el nivel de amplificación y status del genoma viral (episomal o integrado) del HPV 16 en 12 carcinomas con el virus episomal y en 7 con el virus integrado.

El análisis de expresión se realizó mediante la técnica de transcriptasa reversa/reacción en cadena de la polimerasa (TR/PCR), el status viral se midió a través de la técnica de "southern blot" y la amplificación mediante la técnica de hibridación en punto.

Los genes E6/E7 se expresaron en el 100% de los carcinomas con el genoma viral episomal y sólo en el 71% de los integrados. Además, el nivel de expresión fue mucho mayor en los episomales y se correlacionó con el nivel de amplificación viral. No se encontraron transcritos de E1/E2, sin embargo, el 75% presentó el transcrito E1/E4.

IDENTIFICACION DE UN NUEVO SUBTIPO DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16 ENCONTRADO EN LA CIUDAD DE MEXICO.

Asas Ayala* y Jaime Berumen Campos*. Area de Biología del Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

El virus del papiloma humano (HPV) es el principal factor en la etiología del cáncer de cuello uterino (CaCu). De los más de 70 tipos que existen, sólo algunos, como el HPV16 y el HPV18, se asocian con lesiones anogenitales invasoras. En este trabajo se realizó la caracterización parcial de un subtipo del HPV16 aislado de pacientes mexicanas con CaCu. Los genes E2, E6, E7 y la región de control de este subtipo, se amplificaron por PCR, se clonaron y se secuenciaron. En una muestra de 123 carcinomas cervicales, se determinó la frecuencia de este subtipo, su nivel de amplificación y la edad de las pacientes que lo presentan. Por otra parte, se utilizó un método para detectar específicamente esta variante del virus, mediante una doble reacción de PCR.

El estudio de las mutaciones (24/51), se encontraron en el gen E2. Las mutaciones causan modificaciones en la estructura primaria de la región E2. Este subtipo se encontró en la cuarta parte de los casos de carcinomas invasores positivos para HPV16 (9% del total), asociado a un nivel de amplificación viral. Las pacientes infectadas con este subtipo, fueron 10 años más jóvenes que las positivas para el HPV16 común (42.6 ± 2.92 y 52.63 ± 2.16, respectivamente; p < 0.01). Se demostró que las mutaciones encontradas coinciden en tres aislados de este subtipo, muestra que se trata de un subtipo del HPV16 y no del HPV16 silvestre con mutaciones adquiridas durante el desarrollo de la enfermedad. La disimilitud del 1.9% en la secuencia del HPV16mx con el HPV16 prototipo, indica que tampoco se trata de un nuevo tipo de virus. Se sugiere llamar a este subtipo, HPV16mx.

Se demostró que el HPV16mx se haya encontrado con alto nivel de amplificación y que la mayoría de las mutaciones se encontraron en el gen E2, podría reflejar una presión de selección positiva en favor de la replicación viral.

EXPRESION DE LOS ONCOGENES E6/E7 DEL HPV 16 EN CARCINOMAS CERVICALES INVASORES.

En C. Jaime*, Unger R. Elizabeth*, Casas A. Leonora* y Berumen Campos J. Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México D.F.

El virus del papiloma humano tipo 16 se ha asociado con el desarrollo de cáncer cervical. La integración del genoma viral en el genoma celular se ha propuesto como un mecanismo de activación de los oncogenes E6/E7. La integración ocurre con interrupción de los genes resultando en la sobreexpresión de los oncogenes virales.

En general, los estudios sobre el papilomavirus humano se han realizado a partir de extractos de DNA de tumores homogéneos y no se sabe si el estado (episomal o integrado) y el nivel de expresión del genoma viral es el mismo en todas las células del tumor.

En el presente trabajo, se exploró la distribución y patrón de expresión de los genes E6/E7 y E1/E2 en tejidos de cáncer cervical. Se realizó hibridación *in situ* con sondas biotiniladas; los datos se correlacionaron con el nivel de amplificación (número de copias por célula) del HPV y con el estado de los genes virales E1/E2. Se analizaron en total 15 carcinomas cervicales positivos para HPV16 y 6 para HPV18. El número de copias virales/célula se midió por la técnica de hibridación en punto y el estado del genoma viral por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para los genes E1/E2. Los tumores se clasificaron de acuerdo con la técnica de hibridación *in situ* en: señal de un punto, varios puntos, y mixta. La distribución de la señal fue homogénea en los tipos de integración de un punto al cual predominó en los tumores positivos para HPV18 (83%) y heterogénea en los tumores con HPV16.



LA ASOCIACION MEXICANA
DE GENETICA HUMANA A.C.

Otorga la presente

CONSTANCIA

a

R. ZAMORANO, M.E. MANJARREZ, D. URANGA,
J. MENDEZ, A. SODA, P. GARIGLIO.

por la presentación del trabajo

**PAPILOMATOSIS LARINGEA Y PAPILOMAVIRUS
HUMANO.**

Durante nuestro

XX CONGRESO ANUAL DE LA A.M.G.H.

celebrado en

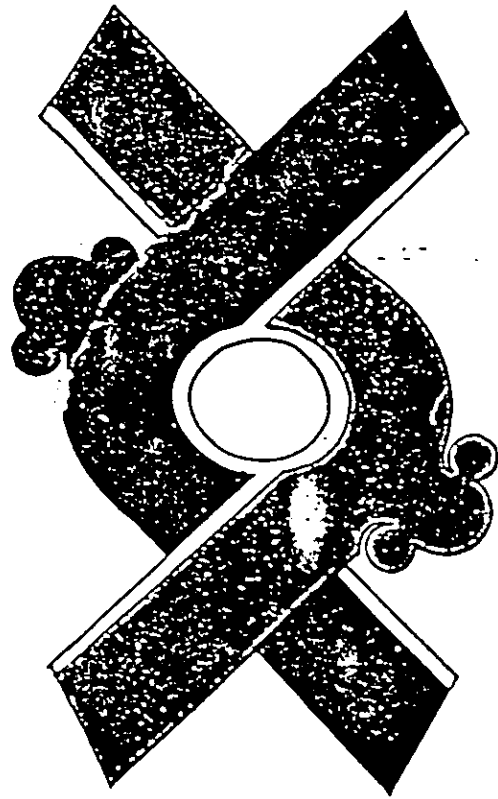
SAN LUIS POTOSI, S.L.P.

del 4 al 7 de Octubre de 1995

Dra. Patricia Ostrosky Wegman
Presidenta A.M.G.H.

Dra. Regina Montero Montoya
Secretaria A.M.G.H.

SMB



XXI CONGRESO NACIONAL
Manzanillo, Colima
3 al 7 de noviembre de 1996



UNIVERSIDAD DE
COLIMA

SOCIEDAD MEXICANA
BIOQUÍMICA, A.C.

DEL ARNm PARA LAS ATPasas DE Ca²⁺
 LA DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA
 terberg, A. y Zhang, J., Dept. de Bioquímica y Biología
 ar, Fac. de Medicina, UNAM, México D.F. 04510 y
 of Cardiovascular Sciences, Univ. of Manitoba, Winnipeg,
 a, R2H 2A6, Canada

El control preciso de la concentración de calcio mioplásmico
 al para el ciclo de relajación y contracción de músculo
 ón. Esta regulación está determinada principalmente por las
 de calcio localizadas en el retículo sarcoplásmico (RS) y en la
 plasmática (MP), respectivamente. El propósito de este
 analizar la expresión de los genes de las ATPasas de Ca²⁺ a
 ARNm durante la diferenciación de las células de músculo
 ón. Se midió la expresión de las ATPasas de Ca²⁺ de RS y
 res líneas celulares de músculo, C2C12, Sol8 y L6 por el
 de PCR. Se observaron cambios en la expresión del ARNm
 diferentes isoformas de las ATPasas de Ca²⁺. La expresión de
 res reguladores de la diferenciación miogénica MyoD y
 precedió a los cambios en la expresión de las bombas de
 ara estudiar en detalle el papel de los factores de
 ón miogénica MyoD y miogemina en la expresión de las
 de calcio, el análogo de timidíla bromodesoxiuridina y el
 azacitidina fueron empleados para suprimir o activar la
 de MyoD y miogemina en las líneas celulares C2C12 y L6.
 mente. También se usó una línea celular de L6 transfectada
 emente con MyoD que sobre expresa ésta proteína. Los
 demuestran que el empalmado alternado del ARNpre-m
 CA1, PMCA4, SERCA1 y SERCA2 son activados en
 squeletico. Se concluyó también que la expresión de MyoD
 es necesaria y suficiente para activar la transcripción
 es de las ATPasas de Ca²⁺ de RS y MP y que participan
 el procesamiento músculo-específico de sus ARNm.

DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA
 CIACION DE CELULAS GRANULARES
 A POR NMDA Y POTASIO. A. Ortega y J. Morán
 erta de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular,
 México, D.F.

Mostrado *in vitro* que cuando las células granulares de
 on tratadas con NMDA o potasio se promueve
 imente la sobrevivencia y se acelera la diferenciación
 uestros hemos demostrado en esta preparación que el
 otasio inducen la expresión de la glutaminasa (GAF) y la
 inotransferasa (AAT), enzimas que participan en la
 ransmisor glutámico. Por otro lado, se ha puesto de
 el papel de la matriz extracelular (MEC) en los procesos
 acción y muerte neuronal. En este trabajo estudiamos el
 MEC en la acción tóxica del NMDA y potasio en células
 e cerebelo. En estudios de incorporación de leucina-³H
 un aumento en la síntesis de la MEC entre los días 2 y 3.
 Por otro lado cuando se resuspenden neuronas sobre MEC
 or células tratadas con NMDA (150 µM) y potasio (40
 rivan somas grandes y oscuros y procesos gruesos y
 mparación con aquellas crecidas en sustrato control,
 on pequeños u vacuolados y sus procesos delgados y
 ro lado, las neuronas crecidas en la MEC producida por
 evenan una distribución atípica consistente en cumulos
 cesos muy largos. En estudios de viabilidad neuronal se
 aumento (60-80%) en la transformación de MTT en
 iones cultivadas sobre MEC de células tratadas con
 (100 µM) y potasio (40 mM) en relación a su control. Se
 aumento (25%) en la viabilidad de neuronas sembradas
 o de astrocitos maduros, pero no de astrocitos jóvenes
 os permite sugerir que el tratamiento con NMDA y
 ótica a la MEC, lo cual afecta de manera diferencial las
 s de las células granulares.

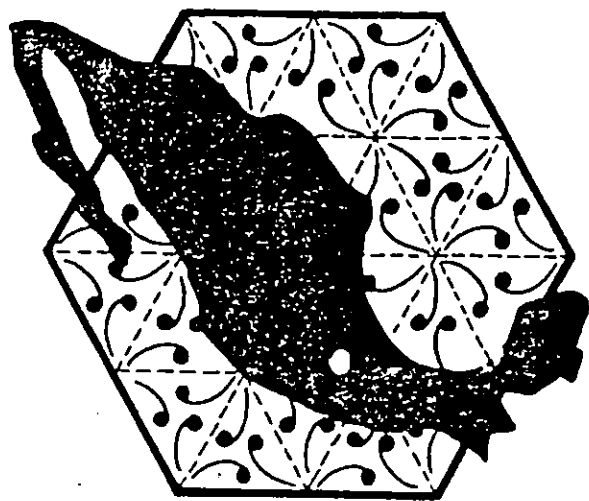
RELACION ENTRE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR
 TNF Y ESTRÉS OXIDATIVO: CAUSA O CONSECUENCIA
 DEL PROGRAMA DE MUERTE. H. Ventura-Gallegos, C.
 Mendoza-Milla, E. Gomez y A. Zamudio. Departamento de Biología
 Celular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México D.F. 04510

El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF) es una citocina secretada
 por macrófagos activados de acción pleiotrópica, entre cuyos efectos
 celulares se encuentra la activación del programa de muerte (Tracey
 K., 1992). *In vitro*, la muerte celular inducida por TNF sólo se
 presenta en células transformadas y en células infectadas con diversos
 virus y se considera que forma parte del sistema inmunológico
 dedicado a eliminar a este tipo de células (Nicol, 1991). En la
 activación del programa de muerte celular por TNF se ha postulado la
 participación de un estrés oxidativo por la generación de radicales
 libres. En particular, nuestro grupo ha reportado la aparición de un
 incremento en la producción de superóxido medida por un aumento
 en la reducción de MTT (bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-
 difenil tetrasolío) en la línea celular L-929 y clones derivadas L929-P6
 y L929-CR1. Este trabajo forma parte de nuestros esfuerzos por
 establecer si existe una correlación causal entre la magnitud de este
 aumento en la reducción de MTT y la muerte celular mediada por
 TNF. El aumento en reducción de MTT en la clona L929-P6 se
 evaluó 26 horas después de la adición de TNF, este aumento fue
 proporcional a la concentración de TNF, el primer cambio
 significativo en la reducción (1 a 2.76 veces) se presentó con 0.07
 ng/ml de TNF. Paralelamente se evaluó la viabilidad celular que
 también muestra una disminución dependiente de la concentración de
 TNF, el primer cambio significativo en muerte (100 a 42%) se
 presentó con 0.07 ng/ml. Una regresión lineal de 0.07 a 2 ng/ml entre
 la reducción de MTT y muerte presenta una *r*² de 0.91. Estos
 resultados sugieren que la muerte celular y el aumento en el estrés
 oxidativo guardan una estrecha relación. Queda por determinar si el
 estrés es causa o consecuencia de la muerte celular.

RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN LOS
 ONCOGENES VIRALES E6 Y E7 DE
 PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16. Edith Pazollini*,
 Diana Escobar*, Pedro Chávez*, Rodolfo Zamudio*, Ramón
 Carrasco*, Francisco Amador* y Luis Cavasini*. Instituto de
 Biociencia, UNAM, Cuernavaca, Mor. *CINVESTAV-IPN,
 México D.F.

El desarrollo de un organismo multicelular requiere de la
 participación de procesos celulares fundamentales: proliferación,
 diferenciación y muerte celular (apoptosis). El cáncer es uno de los
 eventos celulares que nos permite estudiar estos procesos dado que
 sus orígenes vienen del desajuste de estos. El cáncer cérvico uterino
 ha constituido nuestro modelo de estudio. La infección por el virus
 del papiloma humano (VPH) juega un papel fundamental. Con el
 objetivo de establecer un modelo animal del cáncer cérvico uterino
 hemos dirigido la expresión de los oncogenes E6 y E7 del VPH-16
 a células epiteliales mediante el promotor de la citoqueratina IV*
 bovina (o bK6) en animales transgénicos. Hemos generado cinco
 líneas independientes de ratones transgénicos, siendo la línea bK6-
 E6/E7MR, la que se ha analizado en mayor detalle. Esta línea
 presenta a partir de los dos meses de edad, un fenotipo pronunciado
 de alopecia y análisis histológicos han mostrado modificaciones en
 la estructura epitelial de la lengua y la piel. Estudios de expresión
 han mostrado que el transgen se expresa en piel y lengua en altos
 niveles y en bajos niveles en duodeno, estómago, hígado y cervix de
 acuerdo con el patrón de expresión de la citoqueratina bK6. La
 hibridación *in situ* para el RNA de E6 y E7, en piel y lengua,
 detecta la expresión del transgen en los tipos celulares esperados.
 Incisiones en la piel de nuestros ratones transgénicos conduce a un
 aumento de al menos 5 veces en los niveles del RNA mensajero de
 E6 y E7 y a la formación de papilomas en un 40% de los ratones.
 Estudios histológicos han mostrado la presencia de displasia
 moderada en la región del cervix. Nuestras observaciones sugieren
 que estos ratones transgénicos permitirán estudiar los efectos de los
 oncogenes E6 y E7 en los procesos de proliferación, diferenciación
 y muerte celular *in vivo* y que podrán utilizarse como un modelo
 para estudiar los orígenes del cáncer cérvico uterino.
 Proyecto apoyado por CONACYT (1163M9209) y PNUD (9V019)

PRIMERA REUNIÓN de la RAMA de:



**BIOQUÍMICA y
BIOLOGÍA
MOLECULAR
de VIRUS**

Oaxtepec, Morelos
Enero 22-24, 1998

Organizadores:

Carlos F. Arias
Patricio Gariglio
Beatriz Gómez



OLLIN

SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA

PAPILOMATOSIS LARÍNGEA Y VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

^{1,2}Manjarrez ME, ²Zamorano R, ⁴De la Torre C, ¹Viliaiba J, ¹Selman M, ^{2,3}Gariglio P.
¹INER, ²CINVESTAV, ³CICATA, ⁴Hospital Infantil de México.

La papilomatosis laríngea es un tumor benigno de vías respiratorias, que se presenta de manera crónica y recurrente. Si bien es cierto que es más frecuente en niños menores de 7 años, puede persistir en edad adulta e incluso inducir en algunos casos el desarrollo de una neoplasia. Los síntomas pueden ir desde molestias respiratorias leves hasta obstrucción total de vías respiratorias. Por el momento no hay tratamiento efectivo, La etiología se ha relacionado con el virus del papiloma humano (HPV), en particular con los tipos 6 y 11. En algunos tipos de HPV los genes E6 y E7 pueden actuar como oncogenes; por ejemplo en los HPV de alto riesgo para cáncer de cérvix, E6 puede unirse e inactivar a p53 y E7 puede asociarse e inactivar a varias proteínas, incluyendo a pRb, la cual tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular. En HPV de bajo riesgo, E6 no se une a p53, pero E7 si tiene afinidad por pRb aunque menor que la de los de alto riesgo. También se sabe que los HPV de bajo riesgo pueden aumentar la expresión de genes celulares como c-jun, lo cual depende en gran parte del tipo celular infectado. En México no se cuenta con estudios previos de papilomatosis laríngea, de tal manera que se desconoce la etiología y no se sabe si algunos genes celulares participan en dicha enfermedad. Por tal motivo, los objetivos de esta línea de trabajo son: a) detectar la presencia así como el tipo de HPV en muestras de papilomas laríngeos de niños; b) estudiar la expresión de los genes celulares: c-jun, c-myc, bcl-2, Rb y p53; c) estudiar la expresión de genes virales E6 y E7.

Se estudiaron 14 niños a los que se les realizó disección de los papilomas por cirugía. La presencia del HPV se efectuó por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimeras (PCR); la tipificación se realizó por medio de patrones de restricción y la expresión de los oncogenes y antioncogenes celulares se valoró inicialmente por inmunohistoquímica; la expresión de E6 y E7 se mide por RT-PCR. En 10 de las muestras se identificó el ADN viral y en siete de ellas se pudo tipificar el virus, cuatro con HPV6, tres con HPV11. La proteína pRb se expresó en la mayoría de las muestras, pero en algunas de ellas su expresión se encuentra disminuida. Respecto a la expresión de p53 y de genes celulares y virales se presentarán y discutirán resultados recientes.

ANEXO III: ARTICULOS PUBLICADOS

Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product

Miriam C. Guido,¹ Rocio Zamorano,² Efrain Garrido-Guerrero,²† Patricio Gariglio²‡ and Alejandro García-Carrancá¹*

¹Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Apdo. Postal 70-228, 04510 México D.F. and ²Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN Apdo. Postal 14-740, 07000 México D.F., Mexico

The physical state of the human papillomavirus (HPV) genome is usually different in malignant lesions of the skin, in which it is generally found in episomal form, and genital mucosa, in which it is frequently integrated with disruption of the E2 gene. Using chimeric or natural HPV promoters in the presence of the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product, we observed

transcription activation or repression, depending on the distance of E2-binding motifs from the start site. We found a clear difference in the positions of E2-binding motifs in cutaneous and genital HPVs that may partly explain the selective pressure for genome integration of genital HPV types in malignant lesions.

Introduction

Human papillomaviruses (HPVs) are aetiological agents of benign and malignant epithelial lesions (Pfister, 1987; zur Hausen & Schneider, 1987). Sixty different types of HPV have been described and are traditionally grouped into those predominantly found in cutaneous and those in mucosal lesions (de Villiers, 1989).

Some of the HPVs commonly found in lesions of mucosal origin, like HPV-6 and -11, are usually present in benign lesions of the genitals, i.e. condylomas and intraepithelial neoplasias, mainly in an episomal state (Dürst *et al.*, 1985; Pfister, 1987; zur Hausen & Schneider, 1987). By contrast, HPV-16, -18, -31, -33 and -35 are frequently found associated with malignant neoplasias. In a high percentage of cervical carcinomas and cell lines derived from them, HPV-16, -18 and -33 DNA has been found integrated into the cellular genome (Baker *et al.*, 1987; Dürst *et al.*, 1985; Matsukura *et al.*, 1986; Schwarz *et al.*, 1985; Yee *et al.*, 1985). When it has been possible to analyse the integration pattern of the viral DNA, the E1-E2 gene region is usually found to be disrupted (Baker *et al.*, 1987; Matsukura *et al.*, 1986; Schwarz *et al.*, 1985). However, in premalignant dysplas-

tic lesions the same HPV types are usually found in an extrachromosomal state (Crum *et al.*, 1985; Dürst *et al.*, 1985). The majority of HPVs associated with skin neoplasias have been isolated from lesions of patients with epidermodysplasia verruciformis (EV). Some of them, like HPV-5 and -8, have been associated with squamous cell carcinomas, in which viral DNA has been found mainly in an extrachromosomal state (Orth, 1987).

The molecular organization of the genomes of different HPV types is very similar; they have a number of early genes (E1 to E7) and two late genes (L1 and L2). Genes E6 and E7 have been found to be necessary and sufficient for immortalization of primary human keratinocytes (Münger *et al.*, 1989). In addition, the long control region (LCR) harbours the early promoter and the replication origin. This region is the target for the interaction of viral and cellular factors which presumably control most transcriptional events in the HPV genome (Chin *et al.*, 1988; García-Carrancá *et al.*, 1988; Hirochika *et al.*, 1988).

The E2 gene is highly conserved in all sequenced papillomaviruses. The E2 protein is a sequence-specific DNA-binding protein that recognizes and binds to a 12 bp sequence, ACCGN₄CGGT, the E2-binding site (E2BS), which is repeated several times in the LCR of all papillomaviruses (Androphy *et al.*, 1987; Dartman *et al.*, 1986).

The E2 protein is functionally conserved, especially the C-terminal third which is involved in dimerization

† Present address: Laboratorio de Inmunología, UMF, ENEP-Itzacala UNAM, Mexico.

‡ Present address: Departamento de Genética Microbiana, CISEI, INSP, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

Different Arrangement of Human Papillomavirus E2 Binding Sites Distinguishes Cutaneous Types from Those Associated with Mucosal Lesions

EFRAIN GARRIDO-GUERRERO,* ELBA CARRILLO,** MIRIAM GUIDO,***
ROCIO ZAMORANO,** ALEJANDRO GARCIA-CARRANCA,*** and
PATRICIO GARIGLIO****

- * *Laboratorio de Inmunología UMF, ENEP Iztacala, UNAM, Tlalnepantla, Edo. de México (present address: Dept. of Molecular Biology, Howard Hughes Medical Institute, Princeton University, Princeton, NJ, USA)*
- ** *Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, México, D.F.*
- *** *Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F.*
- **** *Programa Multidisciplinario de Biomedicina Molecular IPN, México, D.F.*

Received for publication November 30, 1995; accepted April 26, 1996 (95/145 MB).

Abstract

High-risk-type human papillomavirus DNA sequences are found in a high percentage of carcinomas from the uterine-cervix, with the viral E1-E2 gene region usually disrupted and the E6 and E7 oncoproteins consistently expressed. The E2 protein is known to repress early transcription from genital HPV promoters having a proximal E2 binding site (E2BS) close to the TATA box. On the contrary, the E2 protein activates cutaneous early promoters having a longer distance between these sites. Using

an *in vivo* approach we analyzed the regulation, by the BPV-1 E2 protein, of a natural HPV-18 promoter where proximal E2BS were placed at variable positions relative to the TATA box, and of heterologous promoters where E2BS was placed upstream of any other known DNA-binding elements. Our results confirm that the E2 protein represses or activates HPV early gene transcription depending on the distance between the TATA box and the proximal E2BS. (*Arch Med Res* 1996; 27:389)

KEY WORDS: HPV; Cervical cancer; Gene regulation; E2 protein; E2 binding sites.

Introduction

Alteration of both proto-oncogenes and tumor suppressor genes plays an important role in the

development of all types of human cancers (1,2). However, in the early stages of genital carcinoma evolution, human papillomavirus (HPV) infection is greatly involved (reviewed in References 3 and 4). High-risk HPV types (such as HPV-16, or HPV-18) are frequently found associated with malignant uterine-cervix neoplasia. It has been described that the molecular organization of the different HPV genomes is very similar, with several early genes (E1 to E7), two late genes (L1 and L2) and a long control region (LCR) containing an origin of replication, the early promoter, and enhancer elements (3-5). In a high percentage of cervical carcinomas and cell lines derived from them, high-risk viral DNA has been found integrated into the

Correspondence to:

Dr. Patricio Gariglio, Depto. de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, P.O. Box 14-740, 07000 Mexico, D.F. Tel. and FAX (525) 747-7000 or (525) 747-7001, ext. 5313.

P. Gariglio is recipient of a CONACYT grant (4859N), a PNUD grant, a UNIDO grant and a Lic. Aaron Saenz fellowship. E. Garrido-Guerrero and E. Carrillo were supported by CONACYT fellowships. A. García-Carranca is recipient of a CONACYT grant (1705-M9209), and a PAPIIT grant (IN211394).

ANEXO IV: CURSOS DE ESPECIALIZACIÓN



CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.

APARTADO POSTAL 14-740

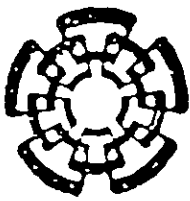
MEXICO 07000, D.F.

Enero, 8, 1984.

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente, se hace constar que la P. de BIOL. MA. DEL ROCIO ZAMORANO ULLOA asistió al CURSO TEORICO-PRACTICO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE MACROMOLECULAS, que se llevó a cabo en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I. P. N. del 28 de noviembre al 2 de diciembre de 1983, impartido por el Dr. Charles Dauguet del Depto. de Virología, Instituto Pasteus, Paris, Francia; y del 12 al 16 de diciembre de 1983, impartido por el Dr. Charles Braker de la Universidad de Purdue, Indiana, E. U. A. La duración total del curso fué de 80 horas.

Dr. Patricio Gariglio V.
Coordinador del curso.



CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.

APARTADO POSTAL 14-740

MEXICO 07000, D.F.

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente, se hace constar que el (la)

C. ROCIO ZAMORANO ULLOA

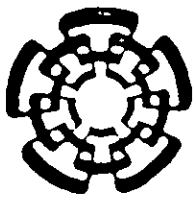
Asistió al Curso Básico de Seguridad Radiológica, que se llevó a cabo en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. del 23 al 25 de noviembre de 1988, con duración de 9 horas, impartido por el Dr. Guillermo Sánchez Camargo.

Dicho curso se verificó bajo el patrocinio de Amersham International PLC.

México, D. F., Noviembre de 1988.

DR. ALBERTO HAMADATA NISHIMUTA
Coordinador del Comité de
Protección Radiológica del
CINVESTAV

c.c.p. Fis. J. Javier Farra Moreno. - Secretario Técnico..



CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.
Ave. Instituto Politécnico Nacional 2508 Col. San Pedro Zacatenco
México, D.F. C.P. 07300

El Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias otorga
la presente:

CONSTANCIA

a *Rocio Zamorano* por su asistencia al curso teórico:

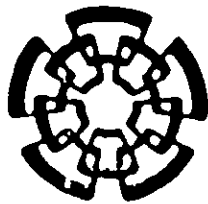
"SIGNAL TRANSDUCTION-SECOND MESSENGERS"

Impartido por el:

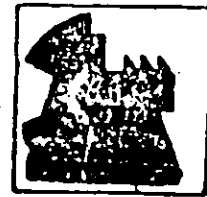
Dr. Jean Zwiller
Unidad 338 del INSERM:
Biologie Communication Cellulaire

Dicho curso se llevó a cabo del 12 al 25 de agosto de 1992.

Lorenza González Mariscal
Dra. Lorenza González Mariscal
Coordinadora Académica



CENTRO DE INVESTIGACION Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.



CONTROL DE RADIACIONES
INGENIERIA, S.A. DE C.V.

Otorgan la presente
Constancia a:

Rocío Zamorano Ulloa

Por haber asistido y aprobado el Curso de Seguridad Radiológica en Investigación, para Personal Ocupacionalmente Expuesto con Autorización No. A00.212/1855/93 de la Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardia, que se impartió del 25 al 29 de Octubre de 1993 en las Instalaciones del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Cd. de México.

OCTUBRE 1993

M. en C. Gerardo Rodríguez Aranda

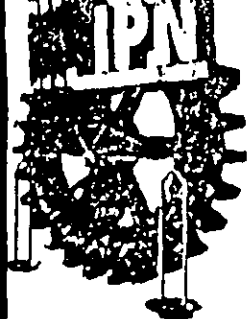
Director General de Control de
Radiaciones e Ingeniería, S.A. de C.V.

Dr. Alberto Hamabata Nishimuta

Coordinador del Comité de Protección Radiológica

Lic. Raúl H. Toscano Cortés

Secretario de Recursos Humanos y Materiales



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
 ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
 CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y
 TECNOLOGÍA AVANZADA**



OTORGAN EN EL PRESENTE

CONSTANCIA

Rocío Zamorano Olloa



CICATA

Por su asistencia al
III CURSO INTERNACIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR
 Que se llevó a cabo del 22 al 24 de octubre de 1997



México D.F. octubre de 1997

[Signature]

Dr. Venancio Hernández Cota
 Director de la
 Escuela Superior de Medicina

[Signature]

Mg. Dióforo Guzmán Quiroz
 Director General del Instituto Politécnico Nacional

[Signature]

Dr. Feliciano Sánchez Sinencio
 Director del
 Centro de Investigación en Ciencia
 Aplicada y Tecnología Avanzada

Certificate of Accomplishment

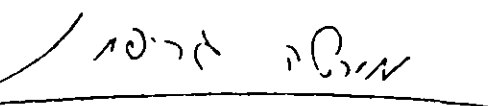


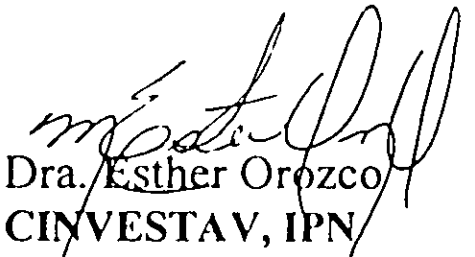
This is to certify that

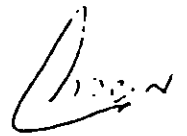
Rocio Zamorano Ulloa

has attended the course on :
Detection of genes and proteins by non-radioactive methods

22-26 September 1997


Dr Mirta Grifman
Institute of Biological Sciences
Hebrew University
Jerusalem, Israel.


Dra. Esther Orozco
CINVESTAV, IPN/
CICATA, IPN


Michael Shapira.
Institute of Biological Sciences
Hebrew University
Jerusalem, Israel.

**INSTITUTO
POLITECNICO
NACIONAL**



BECKMAN®

**BECKMAN
INSTRUMENTS
DE MEXICO S.A. DE C.V.**

otorgan el presente

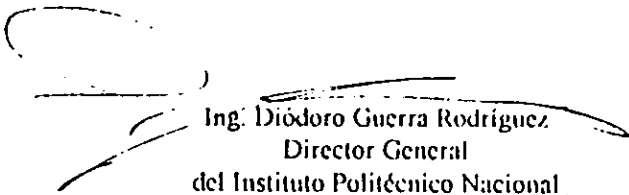
DIPLOMA

a la:

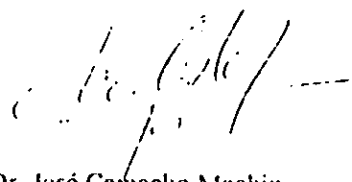
DRA. MARIA DEL ROCIO ZAMORANO ULLOA

Por haber asistido al
"2do. Curso Internacional de Biomedicina Molecular"
Del 15 al 17 de Octubre de 1996

México, D.F., octubre de 1996



Ing. Diódoro Guerra Rodríguez
Director General
del Instituto Politécnico Nacional.



Dr. José Camacho Machin
Gerente Comercial
de Beckman

ANEXO V: REPORTE TÉCNICO

..

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL COMPUESTO PROQUI D-0234

Biol. Enrique García Villa
Biol. Rocio Zamorano Ulloa
Dr. Patricio Gariglio Vidal

Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y estudios
Avanzados del IPN.

INTRODUCCION

Este trabajo representa un estudio del efecto del compuesto químico PROQUI D-0234 sobre la expresión del oncogén celular c-myc y del antioncogén p53 además se estudió la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 del papilomavirus humano tipo 18 (HPV18).

MATERIALES Y METODOS

Lineas celulares.- Se utilizaron las líneas celulares HeLa, derivada de cáncer cérvico-uterino (CaCu), que tiene integrado el genoma de HPV 18 (adaptadas a 2% de suero); como control negativo se utilizó la línea celular C33 derivada de CaCu pero que no tiene integrado HPV.

Tratamiento.- El compuesto PROQUI D-0234 (Heparina sódica; 160 mg/ml) se aplicó a una concentración final de 2mg/ml y 4mg/ml, dejando este tratamiento por 5 días.

RT-PCR.- Utilizada para observar la expresión de los genes E6 y E7 de HPV18. De forma breve, se utiliza el RNA purificado, el cual es transformado en DNA complementario (cDNA) por la enzima reverso transcriptasa; esta molécula es a su vez amplificada en forma específica utilizando los oligos para los oncogenes E6 y E7 de HPV y los oligos específicos para el gen β 2-microglobulina como control interno. Los productos son observados a través de un gel de agarosa.

WESTERN BLOT.- Con esta técnica observamos la expresión de un gen a nivel de proteína. Consiste en la obtención de los extractos totales de proteína de las células. Estos extractos se corren en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes; las proteínas son transferidas a un filtro de nitrocelulosa en el cual se lleva a cabo la inmunodetección con los anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína deseada. La reacción se observa utilizando un Kit de quimioluminiscencia y exponiendo el filtro a una placa de autoradiografía. El mismo papel puede ser lavado y confrontado con otro anticuerpo obteniendo dos resultados con un mismo papel.

RESULTADOS

EFFECTO DEL COMPUESTO PROQUI D-0234 SOBRE LA EXRESION DE E6/E7 DE HPV18.

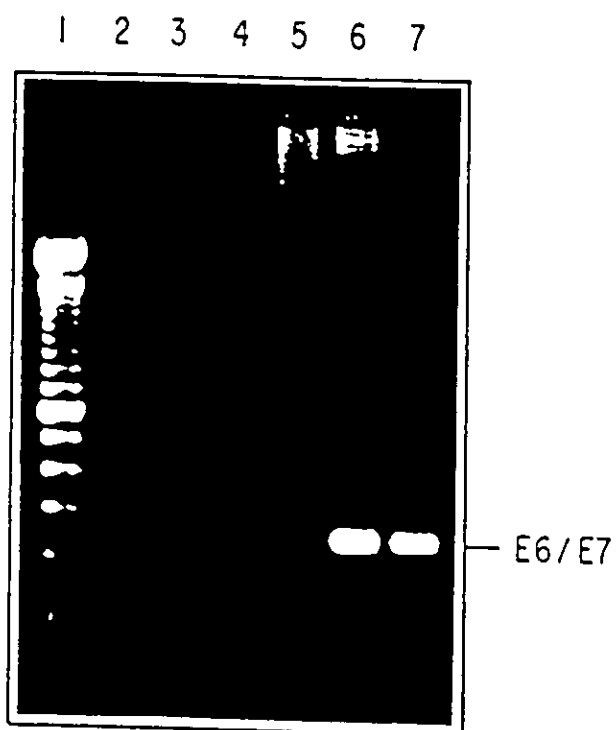


FIG 1 - RT-PCR de los transcritos E6, E7 de HPV18
Carril 1) marcador de peso molecular. 2) Transcritos E6, E7 en HeLa. 3) HeLa + PROQUI D-0234 2mg/ml.
4) HeLa + PROQUI D-0234 4mg/ml. 5) C33. 6) Producto de PCR del plasmido HPV16. 7) Producto de
PCR de DNA genómico CasKi

EFFECTO DEL COMPUESTO PROQUI D-0234 SOBRE LA EXRESION DEL GEN
 β 2-MICROGLOBULINA

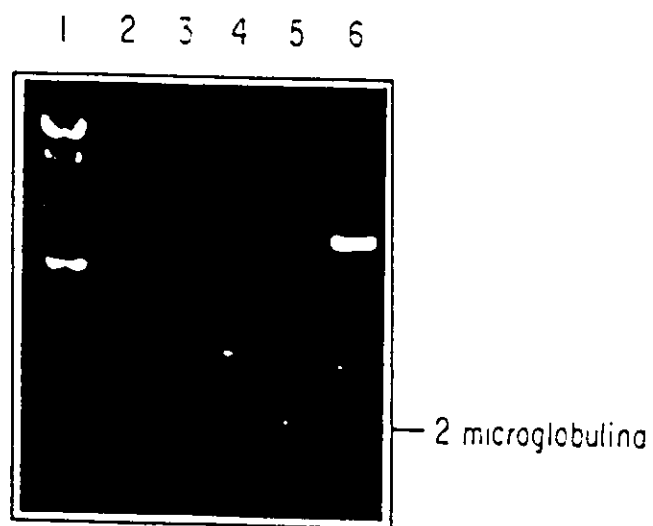


FIG. 2 - RT-PCR del transcrito para β 2-microglobulina
Carril 1) marcador de peso molecular. 2) Transcritos E6 E7 en HeLa. 3) HeLa + PROQUI D-0234 2mg/ml
4. HeLa + PROQUI D-0234 4mg/ml. 5) C33. 6) Producto de PCR de DNA genómico CasKi

EFFECTO DEL COMPUESTO PROQUI D-0234 SOBRE LA EXRESION DEL PRODUCTO DEL ONCOGEN C-MYC.

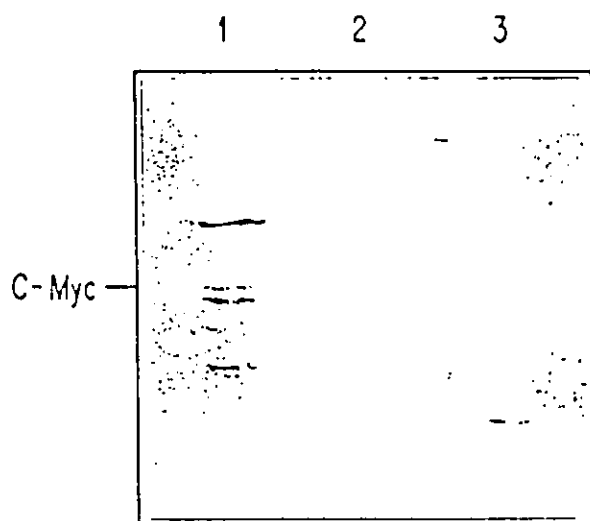


FIG. 3. Inmunodetección con Ab anti-Myc (Qua. (v. Biotecn) dirigido contra aa 43-55. Carril: 1. HeLa. 2) HeLa + PROQUI D-0234 2mg/ml. 3. HeLa + PROQUI D-0234 4mg/ml.

EFFECTO DEL COMPUESTO PROQUI D-0234 SOBRE LA EXRESION DEL PRODUCTO DEL GEN α -TUBULINA.

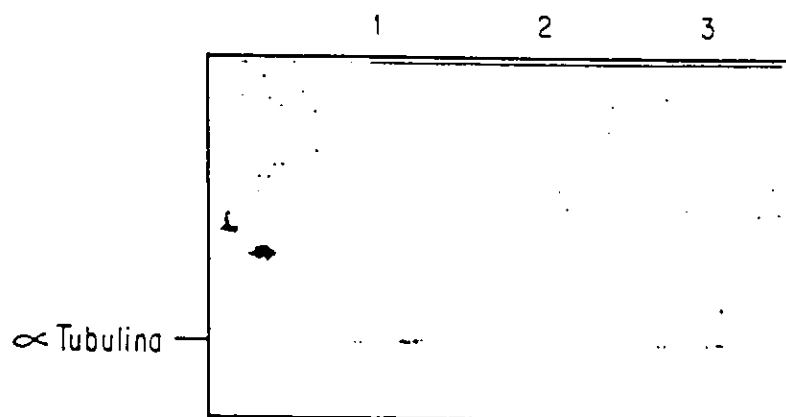


FIG 4 -Inmunodeteccion con Ab anti- α -Tubulina (Oncogene)
Carni 1) HeLa. 2) HeLa + PROQUI D-0234 2mg/ml. 3) HeLa + PROQUI D-0234 4mg/ml
Se uso el mismo papel de la figura 3 despues de lavarlo

EFFECTO DEL COMPUESTO PROQUI D-0234 SOBRE LA EXRESION DEL
PRODUCTO DEL ANTIONCOGEN p53

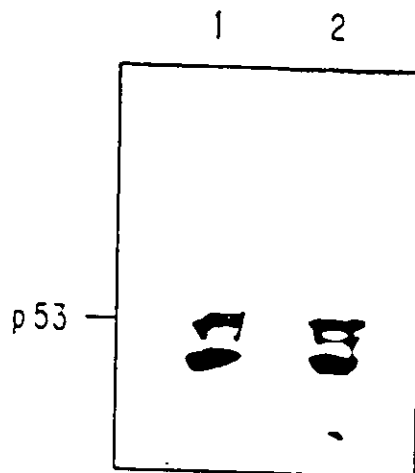


FIG. 5 - Inmuno-detección con Ab anti-p53 Pac 1521* (Santa Cruz)
Carril 1) HeLa 2) HeLa + PROQUI D-0234 2mg/ml

EFFECTO DEL COMPLEJO PROQUID-0284 SOBRE LA VELOCIDAD DE
CRECIMIENTO EN CELULAS HeLa

A



B

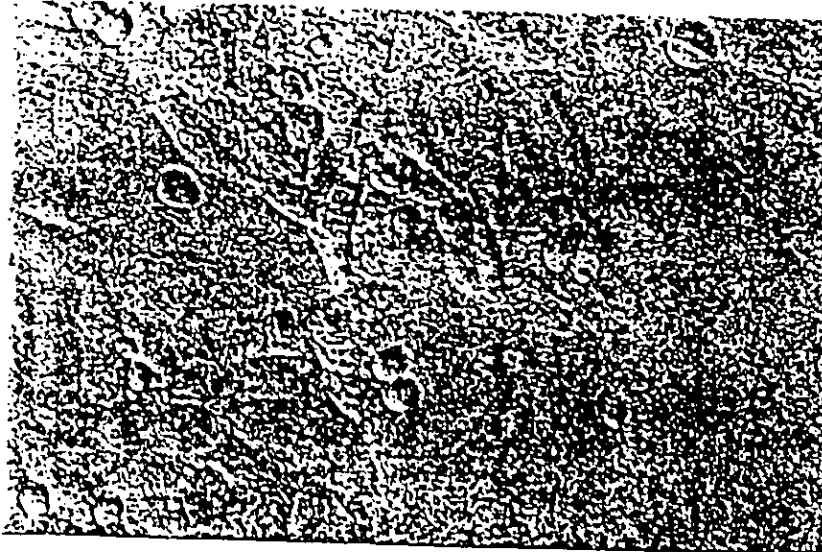
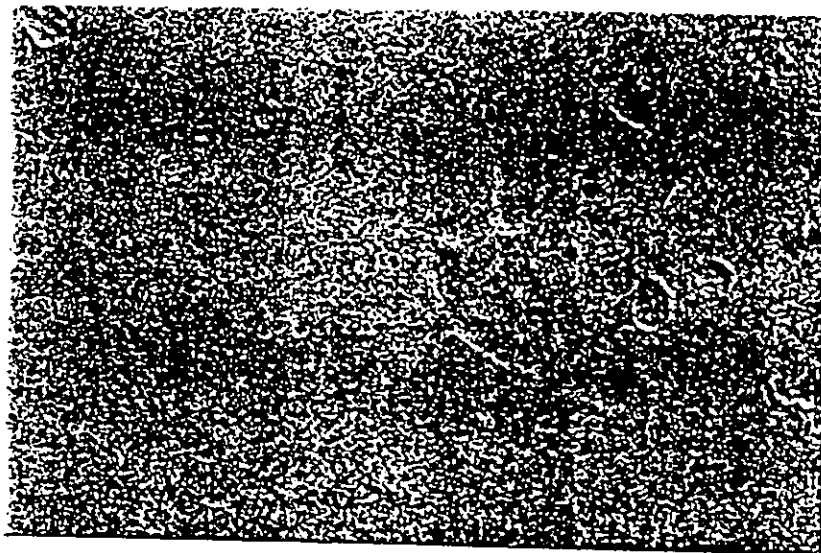


Fig. 1. Efecto del complejo Proquid-0284 sobre la velocidad de crecimiento en células HeLa.
A: Células HeLa en crecimiento en presencia de Proquid-0284. B: Células HeLa en crecimiento en ausencia de Proquid-0284.

EFFECTO DEL COMPUESTO PROQUI D-0264 SOBRE LA VELOCIDAD DE
CRECIMIENTO EN CELULAS HeLa

A



B

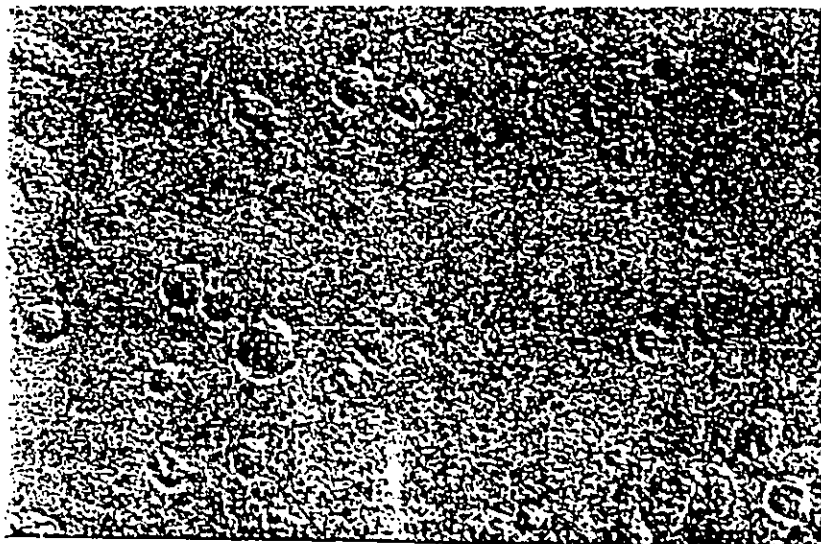
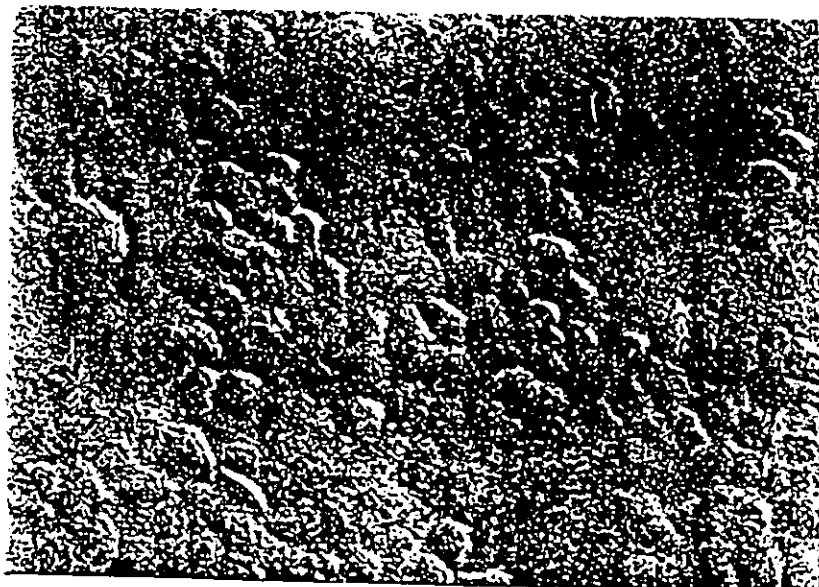


Fig. 1. Efecto del compuesto PROQUI D-0264 sobre la velocidad de crecimiento en células HeLa.
A: Células HeLa en tratamiento B: Células HeLa en control (sin tratamiento).

EFFECTO DEL COMPUESTO PRO 1211 D-0284 SOBRE LA VELOCIDAD DE
CRECIMIENTO EN CELULAS HeLa

A



B

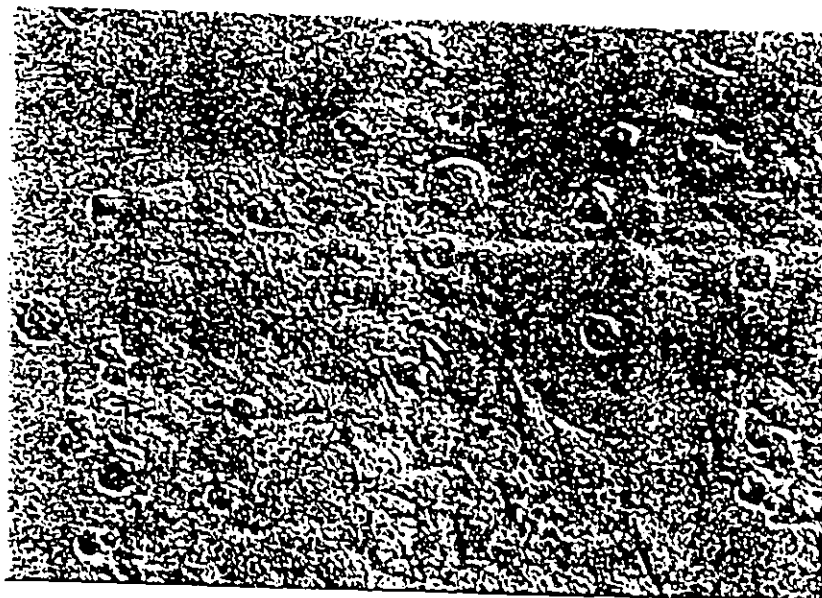


Fig. 1. Fotografías de células HeLa a: 100 x; b: 100 x.
- Células HeLa sin tratamiento; B: Células HeLa con 200 µg/ml de este compuesto.

Como se aprecia en la figura 1, se observa la desaparición de la señal en el carril 4 correspondiente a la utilización de 4mg/ml del compuesto sobre las células HeLa, mientras que con 2mg/ml no hay cambio. Tanto nuestro control negativo (carril 5), como los controles positivos salieron de acuerdo a lo esperado. En la figura 2 vemos como nuestro control interno (el producto del gen β 2-microglobulina que se expresa constitutivamente) no se ve afectado por el compuesto químico, observándose expresión en todos los carriles; esto sugiere que el efecto visto en la figura 1 es real y específico. En la figura 3 observamos en el carril 1 un doblete de 67 y 64kDs correspondiente a c-MYC, mientras que en los carriles 2 y 3 desaparece la señal del producto del oncogén c-Myc, tanto si se utiliza el compuesto químico a una concentración de 2 como de 4mg/ml.

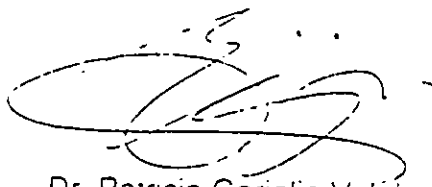
En la figura 4 se presenta el mismo papel de la figura 3 lavado y confrontado con anticuerpo anti α -tubulina. Se observó una señal pareja alrededor de los 55kDs, que corresponde al peso de esta proteína. La figura 5 nos muestra otro experimento en el cual no se observa ningún efecto en la expresión de la proteína p53 observándose una señal muy clara de esta, tanto en células tratadas con el compuesto químico como en las células sin tratamiento. En las figuras 6 a 8 se observa disminución en el crecimiento de las células HeLa durante 5 días de tratamiento con respecto a células HeLa sin tratamiento, las cuales al quinto día cubren completamente la caja de cultivo mientras las células tratadas están a un 80% de confluencia; al no detectar muerte celular, esto sugiere que hay un efecto inhibitorio del compuesto PROQUI-D-0234 sobre el crecimiento celular.

CONCLUSIONES

Con base en estos resultados podemos decir que el compuesto PROQUI D-0234 tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 de HPV18 utilizado a una concentración de 4mg/ml en células cancerosas en cultivo; el efecto inhibitorio de la expresión de la proteína c-Myc se da incluso desde los 2mg/ml de concentración del compuesto. La falta de efecto del compuesto químico sobre la expresión de otros 3 genes diferentes β 2-microglobulina, α -Tubulina y p53 nos indica especificidad en la acción del producto. En nuestra opinión el compuesto químico PROQUI D-0234 ha mostrado que su capacidad para inhibir en forma específica

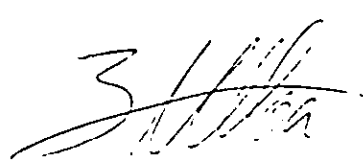
expresión de los oncogenes virales E6/E7 y del oncogén celular c-myc. Sin embargo, creemos necesario observar el efecto del producto PROQUI-D-0234 en cultivos de células normales, así como su efecto in vivo, ya que el efecto del compuesto químico en estas condiciones podría ser diferente a su efecto in vitro sobre células transformadas.

Vo. Bo.



Dr. Patricio Gariglio Vidál
Profesor Titular
Depto. Genética y BM

Atentamente



Biol. Rocio Zamorano Ulloa
Biol. Enrique García Villa

ANEXO VI: PREMIO "ISMAEL COSÍO VILLEGAS"

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

OTORGA EL PRESENTE


DIPLOMA

A LA: DRA ROCIO ZAMORANO ULLOA

POR HABER OBTENIDO EL PREMIO "DR. ISMAEL COSIO VILLEGAS"
AL MEJOR TRABAJO EN INVESTIGACION CLINICA, TITULADO:
*"PRESENCIA Y TIPOLOGIA DE HPV EN MUESTRAS
DE PAPILOMATOSIS LARINGEA"*
DURANTE LAS "XXVII JORNADAS MEDICO- QUIRURGICAS"

SEPTIEMBRE, 1995

ATENTAMENTE


DR. JAIME VILBALBA CALOCA
DIRECTOR GENERAL

PARTE II: PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) Y CANCER

A. INTRODUCCIÓN

1. Biología Molecular del Cáncer

La búsqueda de los orígenes genéticos del cáncer ha conducido a la hipótesis de que esta enfermedad es el resultado de dos eventos celulares fundamentales: la inmortalización y la transformación. Los oncogenes, genes de origen viral o celular se han podido clasificar en general en aquellos que promueven la proliferación sin producir grandes cambios fenotípicos (inmortalización) y los que inducen cambios fenotípicos importantes (transformación). La carcinogénesis al parecer requiere de estos dos eventos ya que, en sistemas experimentales, ésta no ocurre a menos que ambos tipos de genes se encuentren activos [66, 58]. Los proto-oncogenes (versiones normales de los oncogenes) desempeñan funciones de gran importancia para el crecimiento y la diferenciación celular; pueden actuar como factores de crecimiento, receptores a dichos factores, transductores intracelulares a distintos niveles, proteínas activadoras de la replicación y de la transcripción de genes implicados en crecimiento celular [8]. Actualmente, al esquema anterior es necesario añadirle los llamados antioncogenes o genes supresores de tumores, los cuales, al inactivarse participan en la aparición de tumores [25, 27]. Si bien no podemos aún clasificarlos claramente dentro de un proceso biológico, es interesante destacar que, los mejor caracterizados parecen participar en eventos relacionados al control de la proliferación y/o se expresan durante el desarrollo. Así entonces, el cáncer se desarrolla en múltiples etapas donde distintos genes participan en cada una de ellas [17].

2. Aspectos generales del cáncer cérvico-uterino.

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) es la enfermedad neoplásica más frecuente en la población femenina de los países subdesarrollados [44]. A nivel mundial el CaCU ocupa el segundo lugar como causa de muerte por neoplasias. Según la Organización Mundial para la Salud, cada año se registran al menos 450,000 casos, de los cuales cerca del 45% fallece.

La aplicación de campañas masivas de detección temprana del CaCU, junto con los avances terapéuticos, han permitido en las últimas dos décadas una disminución notable en la incidencia y mortalidad de este padecimiento en los países desarrollados [26, 42]. Actualmente, en estos países, se ha incrementado la frecuencia de la neoplasia intraepitelial cervical (CIN) que se considera la lesión precursora del CaCU [42, 51].

Al parecer, las lesiones preinvasoras e invasoras del cuello uterino son parte del mismo padecimiento. Estas se presentan como una serie de cambios que generalmente empiezan con una lesión bien definida (CIN-I o displasia leve), pasan por una fase menos diferenciada (CIN-II o displasia moderada); luego una lesión intraepitelial indiferenciada (CIN-III, la clásica displasia severa, también llamada carcinoma *in situ*), y finalmente terminan en carcinoma invasor (en diversos estadios) cuando las células neoplásicas del epitelio cervical han

atravesado la membrana basal e invadido el tejido subyacente [42]. La invasión puede ocurrir en cualquier fase del CIN, pero es más probable que ocurra en el CIN-III.

Algunas lesiones preinvasoras revierten o permanecen inalterables durante toda la vida, y sólo un porcentaje pequeño progresa hacia CaCU: 7.5% de CIN-I, 15% de CIN-II y 25% de CIN-III [52]. En otras palabras, la evolución a estadios invasores no es inevitable y depende del individuo. El tiempo en el que las lesiones progresan de CIN-I a CIN-III, y de éste a carcinoma invasor, es muy variable, generalmente de 10 a 20 años, siendo la edad promedio de las mujeres que presentan CIN-I y carcinoma invasor, de 25 a 50 años, respectivamente [26, 72].

Numerosas observaciones clínicas, así como estudios epidemiológicos sugieren que un factor viral (transmitido sexualmente) está involucrado en el desarrollo del CaCU; principalmente el virus del herpes simple tipo II y más recientemente los papilomavirus humanos (HPV). Sin embargo, desde hace algún tiempo han surgido evidencias experimentales que indican que el virus del herpes no es el principal candidato etiológico del CaCU [40, 50, 71].

Un gran avance respecto a la asociación entre HPV y CaCU se realizó con el aislamiento del DNA de HPV tipo 6 a partir de una lesión llamada condiloma acuminado [22]. La aplicación posterior de metodologías de Ingeniería Genética y de Biología Molecular, tales como la clonación génica y la hibridación del DNA, permitieron aislar e identificar, a partir de neoplasias genitales, muchos otros tipos de papilomavirus. A la fecha se han encontrado 70 diferentes tipos de HPVs y más de 100 sub-tipos los cuales históricamente se han agrupado en dos categorías de acuerdo a la localización de la lesión de donde estos han sido aislados: "cutáneos" y "genitales".

3. Biología Molecular de los papilomavirus humanos (HPV)

3.1. Composición de los viriones y organización general del genoma

Las partículas virales de HPV contienen sólo DNA y proteínas. El DNA es de doble cadena, circular y contiene 8,000 pares de bases (pb) aproximadamente. El genoma se encuentra compactado con proteínas de origen celular llamadas histonas formando nucleosomas, y encapsidado en viriones icosaédricos de 72 capsómeros. Desde hace tiempo se sabe que los viriones de diversos tipos de HPV presentan, en geles de poliacrilamida-SDS, una proteína mayoritaria de la cápside de 57,000 daltones (dal) y dos minoritarias de 53,000 y 43,000 dal [45, 73].

Los genomas de HPV secuenciados hasta ahora presentan una estructura básica muy similar. La homología en secuencia entre ellos que va de moderada (45%) a alta (85%) [6, 22, 46]. Se han identificado marcos de lectura abierta (ORFs) organizados en regiones de expresión temprana (E) y tardía (L) (Figura 1). Los primeros codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1), con la transcripción (E2), y con transformación celular (E6 y E7); los segundos codifican para proteínas de la cápside (L1 y L2).

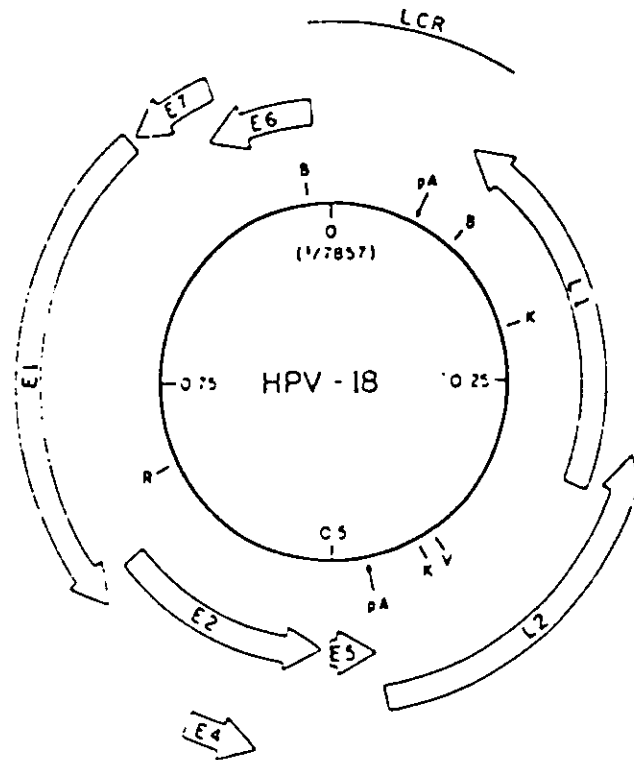


Figura 1. Mapa genético del papilomavirus humano tipo 18 (HPV 18). El genoma circular de DNA doble cadena contiene 7,857 pb. La localización de los marcos abiertos de lectura se obtuvo de la secuencia completa del genoma [9]. LCR, región larga de control, pA, señal de poliadenilación. Se ilustran algunos sitios de restricción relevantes: B, *Bam*HI; R, *Ecc*RI; K, *Kpn*I; V, *Eco*RV.

El genoma contiene una región grande de control (LCR) de 1,000 pb (1Kpb) aproximadamente, sin ningún ORF importante; en la que se han encontrado secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción viral, así como el origen de replicación. Como se puede observar en la figura 1, la información codificada se encuentra localizada en una sola de las cadenas de DNA y los ORFs tienen la misma orientación transcripcional, con sobreposición de algunos de ellos.

3.2. Región grande de control (LCR) y regulación de la transcripción temprana

La transcripción de los oncogenes virales E6 y E7 parece jugar un papel muy importante en el mantenimiento del estado transformado de las células. Los elementos regulatorios de la expresión de estos genes se encuentran localizados en el LCR (ver figura 1).

En la figura 2 se muestra un esquema de la organización general de esta región en el genoma de algunos papilomavirus humanos. Se observa que existe un segmento con abundancia de guaninas (G) y timinas (T), en la porción distal de esta región.

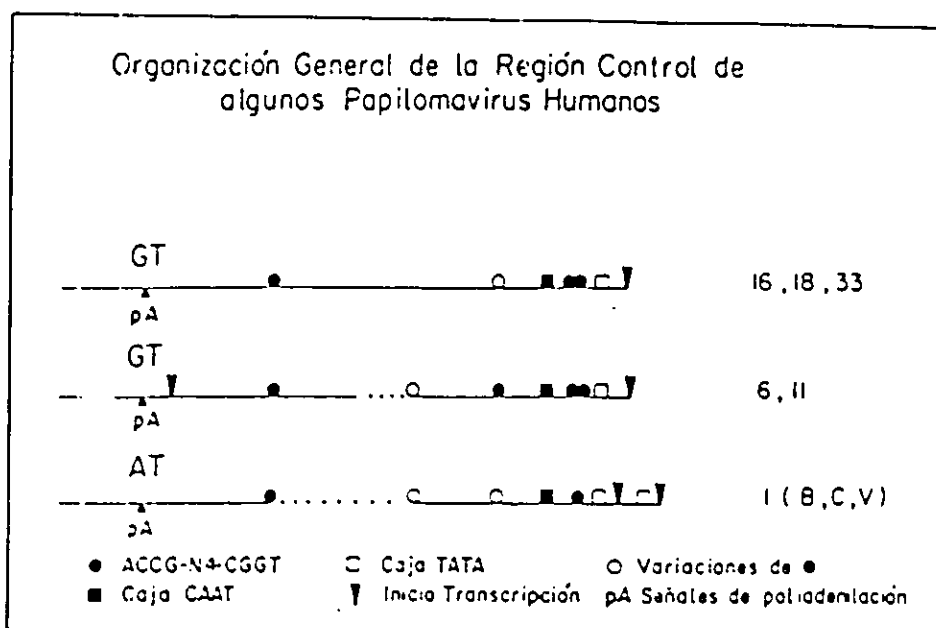


Figura 2. Organización general de la región control de algunos papilomavirus. □, variaciones del sitio perfecto para E2 (ACCGNNNCGGT) B, Papilomavirus bovino; V, papilomavirus de venado; C, papilomavirus del conejo de cola de algodón.

La figura 2 muestra además los sitios de unión de la proteína E2 al LCRs de distintos tipos de papilomavirus. Estos sitios de unión se encuentran localizados de una manera particular en los LCRs de los papilomavirus que infectan epitelios húmedos (como en los genitales femeninos) y que tienen una alta probabilidad de producir carcinomas. Estos LCRs presentan un doble sitio perfecto de unión justo arriba de la caja TATA. La región central del LCR es más variable y existe un fragmento que está presente sólo en los tipos de papilomavirus que infectan genitales [9].

Se han caracterizado varias secuencias en el LCR de algunos HPV genitales. Estas secuencias características son el blanco de interacción de factores proteicos virales y celulares [12, 20, 24]. Recientemente se ha identificado un secuencia específica (5'-TGACTAA-3'), que es blanco de interacción de un miembro de la familia de factores de transcripción AP-1; dicha secuencia se encuentra presente dos veces en el LCR del HPV 18 [20]; (ver esquema en la figura 3).

Esta secuencia reconocida por AP-1, constituye un elemento de respuesta a ésteres de forbol [1, 37]. Los factores de la familia AP-1 son los transductores de una serie de eventos que se inician en la membrana plasmática y que involucran señales de diversa índole: física química y biológica [11]. Estas señales pueden influenciar la unión de la RNA polimerasa II al DNA [18], es decir, el encendido o el apagado de los oncogenes virales.

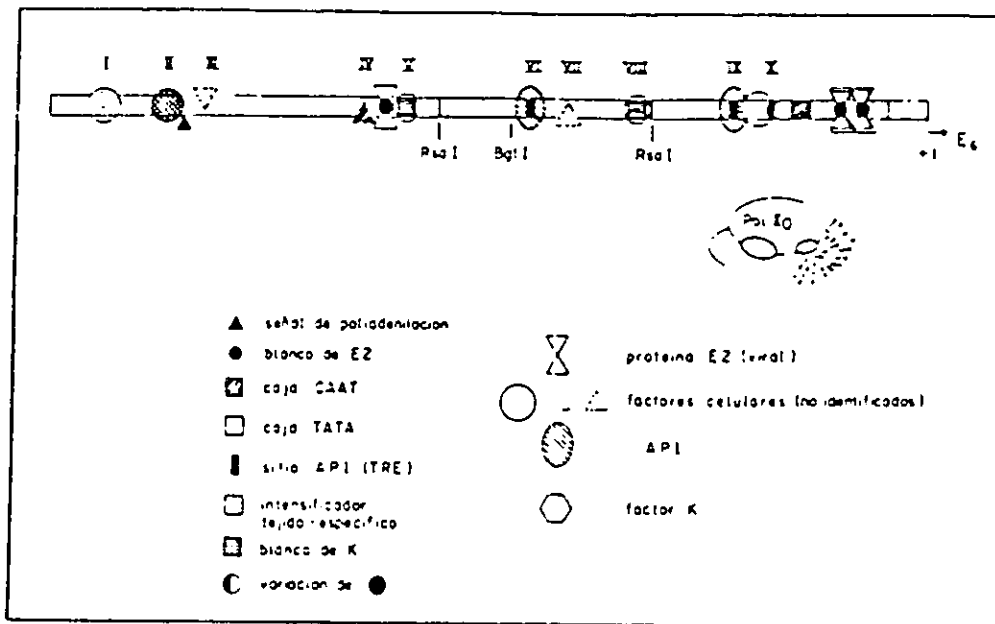


Figura 3. Esquema de la región larga de control del papilomavirus humano tipo 18 (LCR del HPV 18). Se ilustran algunos elementos del DNA que son blanco de interacción de factores celulares o virales [20]. Estos factores modulan la actividad de la RNA polimerasa II [19], encargada de la transcripción de genes celulares y virales. En la polimerasa se ilustran algunos sitios de fosforilación.

3.3. La proteína E2 de HPV

El producto del gen E2, la proteína E2 es un transregulador de la transcripción (transactivador) temprana. Su blanco es una secuencia en el promotor de los genes E6 y E7. Reconoce específicamente la secuencia palindrómica: 5'-ACC-CNNNNN-GGT-3', que se conoce como el blanco de E2. La proteína E2 se une a su secuencia blanco en forma de dímero, como se ilustra en la figura 4 [13, 39].

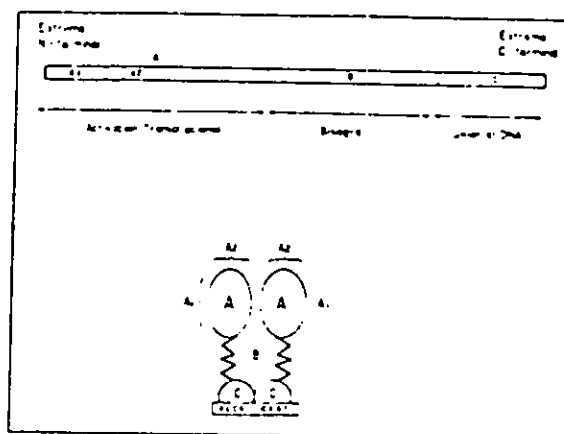


Figura 4. La proteína E2 está compuesta de tres dominios. El análisis de mutantes de la proteína E2 ha definido tres dominios funcionales (regiones A, B y C). En la parte inferior se ilustra un modelo de la estructura de E2, deducido a partir de estudios estructurales y funcionales. Los dominios A y C son probablemente globulares y están separados por una bisagra flexible (dominio B). El dominio A contiene dos hélices alfa (A1 y A2). El dominio C está involucrado tanto en la unión al DNA, como en el proceso de dimerización de la proteína.

Varios trabajos han demostrado que esta proteína activa fuertemente la transcripción de los LCR de diversos HPVs [31, 47, 60] y en menor grado la de algunos promotores que no contienen su secuencia blanco [29]. Al contrastar estas observaciones se encontró que el promotor genuino de E6 en el HPV18 es fuertemente reprimido por la proteína E2 en la células SW13 [64,67] y en queratinocitos humanos [4].

El gen E2 se encuentra altamente conservado en todos los papilomavirus secuenciados hasta la fecha, así como su funcionalidad como trans-activador de la transcripción.

Se ha observado que las células transformadas por el papilomavirus bovino tipo 1 (BPV1) expresan además de la proteína E2 completa, dos proteínas E2 incompletas [32]. Estos tres polipéptidos se producen a partir de tres especies diferentes de RNA mensajero (mRNA); todas comparten el mismo dominio carboxilo terminal (C-terminal) y tienen funciones biológicas diferentes; uno de estos productos está truncado en el lado amino terminal (N-terminal) y se genera por la traducción a partir de un codón ATG interno; otro producto es un péptido híbrido E8/E2 generado por traducción de una especie de mRNA que contiene estas secuencias [35]. Es importante señalar que el extremo C-terminal de estas tres proteínas es el que se asocia con el DNA. Las proteínas truncadas en el extremo N-terminal pueden actuar como represores de la transcripción, ya sea por inhibición competitiva del efecto transactivador de la proteína E2 completa, o por formación de heterodímeros no funcionales [39].

En cuanto a la localización exacta de los sitios de unión de E2 a lo largo del LCR, es interesante hacer notar que existen diferencia entre los grupos virales. En el caso de los HPV que colonizan los genitales [16, 22, 49, 50, 73] estos sitios de unión se ubican de una forma particular, ya que existen dos sitios justo arriba de la caja TATA en la región proximal del gen E6 [20]. Por el contrario, en otros tipos de papilomavirus de humanos (HPV) y de animales (BPV1, CRPV y DPV), el sitio más cercano al promotor E6 proximal está a 140 pb de la caja TATA (ver figuras 2 y 3).

En experimentos de "huella sobre el DNA" (fingerprint), usando DNasa I, se demostró que los dos sitios de unión de E2 en el promotor del gen E6 del HPV18 están protegidos en forma específica por la proteína E2 del BPV1 [20]. Se podría imaginar que la unión de varias moléculas de E2 sobre estos sitios cercanos a la caja TATA (ver figura 3) llevaría a una interferencia espacial que impidiera la formación de un complejo de transcripción activo sobre el mencionado promotor.

No hay duda de que la proteína E2 juega un papel muy importante en el ciclo viral de los papilomavirus ya que los niveles de mRNA de estos virus son bastante bajos en ausencia de E2. Además, dos copias de la secuencia blanco de E2 son suficientes para generar un intensificador de la transcripción muy eficiente, capaz de activar la transcripción de promotores heterólogos en diferentes tipos de células de mamífero [23, 28, 30] o en levaduras [36]. Así, la proteína E2 posee la capacidad de reprimir o activar promotores virales o celulares, al unirse a la misma secuencia de DNA. Evidentemente la proteína E2 constituye un modelo para estudiar el mecanismo por el cual los factores que se unen al DNA modulan la transcripción de células eucarióticas.

3.4. Proteínas E6 y E7 de HPV

Estos productos han sido implicados en la inducción y mantenimiento del estado transformado de células que contienen secuencias de HPV. Contrario a lo que sucede con los genes E1 y E2, los genes E6 y E7 no se seccionan durante la integración de DNA viral al genoma celular; éstos últimos genes se expresan selectivamente en tumores genitales y en líneas celulares derivadas de tumores humanos [57, 2]. El producto del gen E7 del HPV tipo 16 [33, 68] y 18 [3] induce, *in vitro*, independencia de anclaje en fibroblastos de ratón. Además, los genes E6 y E7 parecen ser necesarios para la inmortalización de queratinocitos humanos por los HPV tipo 16 y 18 [53].

La proteína E6 se ha encontrado tanto en núcleo como en membrana plasmática y tiene gran afinidad por el DNA [38]. La proteína E7 es una fosfoproteína que se ha encontrado en el citoplasma pero aún se desconoce su función [59]. Sin embargo, se han identificado dos regiones de amino ácidos en la proteína E7 que parecen corresponder con aquellas presentes en la proteína E1a de adenovirus, las cuales están involucradas en los procesos de transformación [48]. Se encontró además que existe gran homología de una región de E7, con la región E1a involucrada en la interacción con el producto del gen de retinoblastoma (Rb). El producto del gen Rb es un antioncogén, que interactúa con el producto de algunos oncogenes, como E1a [69] y posiblemente E7.

3.5. Especificidad tisular de los papilomavirus

Los HPV infectan solamente células de epitelio que pueden dividirse (células basales). En éstas, el virus no se replica y permanece en estado latente. A medida que las células epiteliales se diferencian, el DNA viral se replica, se transcribe y se forman viriones completos, esto sugiere que algunos factores celulares participan en la regulación del ciclo viral, durante los diferentes estadios de la diferenciación de los epitelios.

A medida que la diferenciación progresa, las células se vuelven más y más permisivas para la replicación viral. Esta puede observarse en las capas celulares suprabasales, mientras que las proteínas estructurales y las partículas virales aparecen sólo en las capas superiores.

Al infectar las mucosas genitales, los HPV inducen frecuentemente "koilocitosis", caracterizada por una gran zona clara perinuclear y a menudo binucleación. En algunos koilocitos aparecen antígenos vitrales de la cápside, pero otros son negativos [41].

La especificidad absoluta de los HPV puede estar determinada, en parte por elementos del LCR ya que se han caracterizado fragmentos cortos de DNA en esta región, capaces de conferir especificidad tisular sobre genes heterólogos. En particular, se han mostrado para los HPV tipo 6, 11, y 18 la presencia de una región con estas propiedades [4, 10, 23, 62, 64, 70].

Mediante experimentos de huella sobre el DNA, se ha mostrado que existe una región conteniendo la secuencia 5'-AAGCCAAA-3', que es protegida por un factor presente en extractos de células de origen epitelial [19]; es decir existe al

menos una proteína que se asocia específicamente con la secuencia mencionada (ver figura 3).

3.6. Posibles mecanismos de transformación por HPV

No se sabe cómo, ni en qué momento el virus transforma a la célula [6, 34]. Se sabe que los HPV 6, 11, 16 y 18 se encuentran en estado episomal (no integrado al genoma celular) y en forma productiva en las lesiones benignas y precancerosas; los HPV 16 y 18 se encuentran en forma no productiva e integrados al genoma celular en las células cancerosas y generalmente están amplificadas en unas 50 a 200 copias por célula [6, 14, 15]. Esto parece indicar que la integración de los tipo 16 y 18 esta relacionada con el proceso de malignización de las células normales o de la progresión tumoral. El DNA viral generalmente se abre en una región que abarca los ORF de E1 y E2 durante la inserción al DNA celular [54]. Los sitios de inserción en el DNA celular al parecer son muy variados y no hay un patrón característico. En algunas líneas celulares, derivadas de carcinomas genitales, el DNA de HPV se ha encontrado insertado cerca de oncogenes celulares, como *c-myc*, *c-raf* y *c-src* [16].

Gariglio y colaboradores han obtenido evidencia experimental que indica que en algunos tumores de CaCU, las secuencias de HPV16 se encuentran muy cerca, o dentro, del oncogén *c-myc* [21]; en estos tumores, el oncogén *c-myc* está molecularmente alterado y presenta tanto arreglos anormales en sus patrones de corte con endonucleasas de restricción, como amplificación del número de copias [43]. Es posible que la inserción de secuencias virales cerca de algún proto-oncogén celular pueda activar a estos últimos en *cis* [7, 16].

Por otro lado, la activación de secuencias celulares en *cis* no parece ser el único mecanismo de transformación. En la mayoría de los carcinomas invasores y líneas celulares derivadas de CaCU que contienen el HPV 16 o 18, se encuentran transcritos de la región E6, E6* (generado por el procesamiento alterno de E6) y E7. Esto sugiere que dichas regiones forman parte de un mecanismo de transformación en *trans* y son importantes para la permanencia del fenotipo maligno [56, 55, 63]. El transcrito E6* parece ser muy importante ya que éste no lo producen los tipos virales asociados a lesiones benignas (HPV 6 y 11).

Por otra parte se ha observado que cuando se fusionan células HeLa (líneas celulares derivadas de un CaCU que contienen el HPV 18 insertado) con fibroblastos normales, las células híbridas resultantes continúan presentando el fenotipo maligno y expresando los oncogenes E6 y E7 cuando se cultivan en medio de cultivo. Sin embargo, dejan de crecer y de expresar E6 y E7 cuando son inoculadas en un ratón atímico [61]. Estos datos sugieren la existencia, en las células normales, de un mecanismo de control negativo para los genes tempranos del HPV, probablemente regulado por un factor humoral [74]. Estos datos apoyan el concepto en el cual el desarrollo del cáncer humano se da por lesiones génicas sucesivas [5].

Si el cáncer genital resulta de la falla de los mecanismos celulares que controlan la expresión de los genes virales persistentes, aparte de una infección por HPV se requiere de otros agentes que lesionen al DNA celular. Esto pudiera explicar la asociación de otros factores co-carcinogénicos (virus del herpes,

metabolitos mutagenicos del cigarro e inflamaciones crónicas de los genitales) encontrados en estudios epidemiológicos; además permitiría explicar los grandes periodos de latencia entre la infección primaria por el HPV y el desarrollo del tumor y el por qué del CaCu se desarrolla sólo en un porcentaje pequeño de los individuos infectados [74].

Como ya se mencionó, la proteína E2 puede ser utilizada como un modelo para estudiar el mecanismo de transcripción en células eucarióticas.

En el presente trabajo se analizó el efecto transregulador de la transcripción de la proteína E2 de papilomavirus bovino tipo 1 (BPV-1) sobre la transcripción de un promotor quimérico que contiene sitios de unión a la proteína E2 ubicados a diferentes distancias del sitio de inicio de la transcripción. Se utilizó como reportero al gen CAT, que codifica para la enzima coranfenicol acetil transferasa. También se comparó la transregulación de los promotores cutáneos y genitales por la proteína E2 de BPV-1.

B. METODOLOGÍA Y RESULTADOS

...

Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product

Miriam C. Guido,¹ Rocio Zamorano,² Efrain Garrido-Guerrero,²† Patricio Gariglio²‡ and Alejandro García-Carrancá¹*

¹Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Apdo. Postal 70-228, 04510 México D.F. and ²Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN Apdo. Postal 14-740, 07000 México D.F., Mexico

The physical state of the human papillomavirus (HPV) genome is usually different in malignant lesions of the skin, in which it is generally found in episomal form, and genital mucosa, in which it is frequently integrated with disruption of the E2 gene. Using chimeric or natural HPV promoters in the presence of the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product, we observed

transcription activation or repression, depending on the distance of E2-binding motifs from the start site. We found a clear difference in the positions of E2-binding motifs in cutaneous and genital HPVs that may partly explain the selective pressure for genome integration of genital HPV types in malignant lesions.

Introduction

Human papillomaviruses (HPVs) are aetiological agents of benign and malignant epithelial lesions (Pfister, 1987; zur Hausen & Schneider, 1987). Sixty different types of HPV have been described and are traditionally grouped into those predominantly found in cutaneous and those in mucosal lesions (de Villiers, 1989).

Some of the HPVs commonly found in lesions of mucosal origin, like HPV-6 and -11, are usually present in benign lesions of the genitals, i.e. condylomas and intraepithelial neoplasias, mainly in an episomal state (Dürst *et al.*, 1985; Pfister, 1987; zur Hausen & Schneider, 1987). By contrast, HPV-16, -18, -31, -33 and -35 are frequently found associated with malignant neoplasias. In a high percentage of cervical carcinomas and cell lines derived from them, HPV-16, -18 and -33 DNA has been found integrated into the cellular genome (Baker *et al.*, 1987; Dürst *et al.*, 1985; Matsukura *et al.*, 1986; Schwarz *et al.*, 1985; Yee *et al.*, 1985). When it has been possible to analyse the integration pattern of the viral DNA, the E1-E2 gene region is usually found to be disrupted (Baker *et al.*, 1987; Matsukura *et al.*, 1986; Schwarz *et al.*, 1985). However, in premalignant dysplas-

tic lesions the same HPV types are usually found in an extrachromosomal state (Crum *et al.*, 1985; Dürst *et al.*, 1985). The majority of HPVs associated with skin neoplasias have been isolated from lesions of patients with epidermodysplasia verruciformis (EV). Some of them, like HPV-5 and -8, have been associated with squamous cell carcinomas, in which viral DNA has been found mainly in an extrachromosomal state (Orth, 1987).

The molecular organization of the genomes of different HPV types is very similar; they have a number of early genes (E1 to E7) and two late genes (L1 and L2). Genes E6 and E7 have been found to be necessary and sufficient for immortalization of primary human keratinocytes (Münger *et al.*, 1989). In addition, the long control region (LCR) harbours the early promoter and the replication origin. This region is the target for the interaction of viral and cellular factors which presumably control most transcriptional events in the HPV genome (Chin *et al.*, 1988; García-Carrancá *et al.*, 1988; Hirochika *et al.*, 1988).

The E2 gene is highly conserved in all sequenced papillomaviruses. The E2 protein is a sequence-specific DNA-binding protein that recognizes and binds to a 12 bp sequence, ACCGN₄CGGT, the E2-binding site (E2BS), which is repeated several times in the LCR of all papillomaviruses (Androphy *et al.*, 1987; Dartman *et al.*, 1986).

The E2 protein is functionally conserved, especially the C-terminal third which is involved in dimerization

† Present address: Laboratorio de Inmunología, UMF, ENEP-Iztacala UNAM, Mexico.

‡ Present address: Departamento de Genética Microbiana, CISEI, INSP, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

and DNA binding (Dostatni *et al.*, 1988; McBride *et al.*, 1989). The N-terminal third, harbouring two acidic amphipathic α -helices, which seem to be necessary for transcriptional activation (McBride *et al.*, 1989), and the internal hinge domain, are much less conserved in sequence and in length.

Originally described as a very potent trans-activator (Spalholz *et al.*, 1985), full-length E2 protein from bovine papillomavirus type 1 (BPV-1) was later shown to repress the genuine HPV-18 early promoter (Thierry *et al.*, 1987; Thierry & Yaniv, 1987). The BPV-1 E2 protein has also been found to repress the HPV-11 and -16 early promoters (Chin *et al.*, 1988; Romanczuck *et al.*, 1990), and the full-length E2 proteins from HPV-16 and -18 act similarly (Bernard *et al.*, 1989; Romanczuck *et al.*, 1990; Thierry & Howley, 1991). However, there is published experimental evidence suggesting that repression/trans-activation by the full-length E2 protein may be a rather complex phenomenon. For instance, an increase in HPV-16 P97 transcription has been found in the presence of the BPV-1 E2 protein (Cripe *et al.*, 1987; Gloss & Bernard, 1990). Whereas the HPV-11 E2 protein has been found to stimulate the HPV-11 enhancer-E6 promoter, repression of the same construct by the BPV-1 E2 protein has been observed (Chin *et al.*, 1988).

In the case of HPV-18, it has been shown that full-length BPV-1 E2 protein binds to a perfect double palindrome that is located just upstream from the E6/E7 TATA box (García-Carrancá *et al.*, 1988). This palindrome is perfectly conserved in all the genital HPVs sequenced (García-Carrancá *et al.*, 1988). In contrast, cutaneous HPVs contain an E2BS further upstream from the TATA box (Ensser & Pfister, 1990).

In this study we analysed the effect of the full-length BPV-1 E2 trans-regulator protein on the transcription of chimeric promoter elements containing E2BS at different positions relative to the start site. In addition, we compared cutaneous and genital promoter trans-regulation by the BPV-1 E2 protein.

Methods

DNA constructs. The basic construct used in this study (pGC₀) contains a modified simian virus 40 (SV40) early promoter linked to the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene. This modified promoter contains five base changes that create two new restriction sites: a *Bam*HI site between the 72 bp repeats and the 21 bp repeats, and a *Sal*I site between these repeats and the TATA box (Takahashi *et al.*, 1986). The fragment containing this SV40 early promoter was obtained from plasmid pS0 (Takahashi *et al.*, 1986) (kindly provided by Dr H. Barrera-Saldaña) by *Eco*RI restriction, the ends were filled using the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I, and the promoter was isolated by *Hind*III restriction and electrophoresis on an agarose gel. This promoter fragment was ligated to a CAT construct without a promoter (pS2), a derivative of pSBI (Herbomel *et al.*, 1984)

(kindly provided by Dr M. Yaniv), from which we removed a unique *Bam*HI site by cutting with the enzyme and filling using the Klenow fragment. pS2 was digested with *Sal*I and the ends were filled using the Klenow fragment, after which it was *Hind*III-digested and ligated to the SV40 promoter fragment.

To introduce E2BS in a position distal to the SV40 early promoter, we cloned an oligonucleotide containing a single E2BS by digesting pGC₀ with *Kpn*I, treating with T4 DNA polymerase and ligating it to the blunt-ended double-stranded oligonucleotide 5' GATCGTACCG-AAAACGGTCTCGA 3' producing pE2 Kpn (Fig. 1*b*). To generate chimeric constructs containing E2BS located proximal to the start site, we substituted the 21 bp motifs from the SV40 promoter with different numbers of oligonucleotides containing the E2BS. pGC₀ was digested with *Sal*I and *Bam*HI, and ligated to small DNA fragments from a group of pGEM-4Z recombinant plasmids containing E2BS flanked by *Sal*I and *Bam*HI sites. Two different double-stranded oligonucleotides were used: 5' CTAGTGCAACCGATTTCGGTTCGCTTTGGCTT-ATGT 3' and 5' CTAGTGACCGAAAACGGTTCGGCGCTGACT-CAGATT 3'. Positive clones were selected and partially sequenced by chemical modification of the DNA (Maxam & Gilbert, 1980) to confirm the orientation and number of oligonucleotides inserted. Thus, plasmids pSEK143, pSEK254 and pSEK453, containing one, two and four copies of the first oligonucleotide, and pSEA21, containing two copies of the second, were obtained (Fig. 1*b*, Table 1).

Cell lines and DNA transfection. HeLa and SW13 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) supplemented with 10% foetal bovine serum in a 5% CO₂ atmosphere. For calcium phosphate-mediated DNA transfection experiments, SW13 cells were grown in 60 mm tissue culture dishes to a density of 1×10^6 cells/dish. Each transfection was performed at least twice with a total of 10 μ g of DNA per dish. Usually, in cotransfection experiments 2.5 μ g of CAT reporter construct was mixed with 2.5 μ g of a Rous sarcoma virus- β -galactosidase plasmid (kindly provided by Dr F. Thierry) and, when indicated, 2.5 μ g of a full-length BPV-1 E2 protein-expressing vector (pC59; kindly provided by Dr P. M. Howley) in the presence of carrier DNA (pBR322 or pGEM-4Z). Cells were incubated with the precipitate for 18 h, washed and refed with fresh medium for another 22 h. Electroporation was performed using 12×10^6 HeLa cells grown under the conditions described. After mixing the DNA in HeBs (137 mM-NaCl, 5 mM-KCl, 0.7 mM-Na₂HPO₄, 6 mM-dextrose, 20 mM-HEPES), it was incubated for 10 min on ice with cells and then subjected to a pulse of 260 V and 960 μ F using a Bio-Rad apparatus. After another 10 min incubation on ice, cells were placed in a dish containing medium and incubated for 16 h before changing of the medium.

CAT and β -galactosidase assays. Extracts were prepared and assayed for CAT and β -galactosidase activity essentially as described previously (Herbomel *et al.*, 1984; Thierry *et al.*, 1987).

Results and Discussion

Fig. 1 shows a representative CAT assay with different constructs tested in the absence or presence of the full-length E2 gene product from BPV-1. As can be seen, in some instances E2 protein reduces (panels ii and iii), whereas in others it enhances (panel i) the expression of the CAT gene (see also Table 1). Control experiments with the natural HPV-18 enhancer/promoter driving the CAT gene (p18/42) or the HPV-16 enhancer/promoter fused upstream to the SV40 early promoter (p863.1) gave

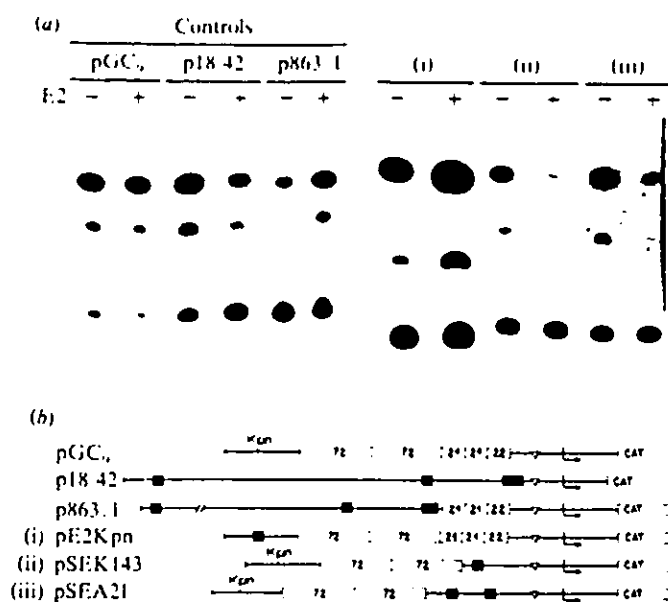


Fig. 1. Expression of chimeric constructs in the absence or presence of the E2 gene product. (a) Representative CAT assays. Plasmids were cotransfected with a vector expressing full-length BPV-1 E2 protein (pC59). SW13 cells were transfected and assayed for CAT activity as described in Methods. Panels (i) to (iii) show pE2Kpn, pSEK143 and pSEA21. Controls (pGC., p18/42 and p863.1) are indicated. (b) Schematic representation of the constructs. Arrow, transcription start site; solid box, E2BS; triangle, TATA box.

Table 1. Effect of the E2 gene product on the expression of different promoters containing E2BS at variable distances from the start site

Plasmid	Distance of proximal E2BS to start site (bp)	Number of E2BSs*	Activation†	Repression†
pE2Kpn	312	1	333, 206	
p863.1	155	3-5	313	
pSEK143	68	1		27, 36, 11
pSEA21	57	2		18, 26, 29
pSEK254	57	2		17, 21
pSEK453	57	4		5, 49
p18/42	31	4		23, 16

* Perfect and related E2BS palindromes are included.

† Values are expressed as a percentage relative to the control activity in the absence of E2 protein. Values from several experiments with each plasmid are shown.

the expected results; the HPV-18 construct was repressed, whereas the HPV-16 construct (having 21 bp boxes separating E2BS and the start site by 155 bp) was activated, as reported previously (Thierry *et al.*, 1987; Thierry & Yaniv, 1987; Phelps & Howley, 1987).

We compared the positions of the E2BS relative to the start site in these and other constructs (Table 1) and found that constructs in which the E2BS is proximal to

the start site were repressed, whereas those with a more distant E2BS were activated. In agreement with published data, the number of E2BSs was not found to be important for repression by the BPV-1 E2 protein; a single E2BS was sufficient for repression, as described recently for the repression of the HPV-18 P₁₀₅ promoter by the BPV-1 E2 protein (Thierry & Howley, 1991). In all the constructs tested that were repressed, the distance between the most proximal E2BS and the cap site was less than 70 bp. In contrast, there were more than 150 bp between the cap site and the most proximal E2BS in the two constructs that were stimulated.

To explore the idea that the distinct response to the E2 trans-regulator protein (depending on whether the binding sites are close to or distant from start sites) could have a biological significance for the life cycle of HPV, we analysed the natural position of E2BS in HPVs from cutaneous and mucosal lesions (Fig. 2). We found that the positions differ between these two groups; HPVs usually found in lesions of the genital mucosa have two E2BSs very close to the E6/E7 start site (Fig. 2b), whereas those usually found in lesions of the skin either have their most proximal E2BS more than 100 bp from the E6/E7 start site or possess an incomplete single E2BS palindrome near the E6/E7 TATA box, as observed in HPV-9 and HPV-17 (see Fig. 2a). To confirm that genital and cutaneous HPV early promoters are differentially regulated by the E2 protein, we cotransfected cells with a construct containing the HPV-20 LCR (kindly provided by Dr P. Fuchs) linked to the CAT gene and pC59 or carrier DNA. Fig. 3 shows that, as expected, the cutaneous HPV-20 construct is activated whereas the HPV-18 construct is repressed.

It is well established that HPV DNA present in malignant lesions from the genitals or in cell lines derived from them is often integrated into the cellular genome (Dürst *et al.*, 1985; Schwarz *et al.*, 1985; Pfister, 1987; zur Hausen & Schneider, 1987). In all cases in which virus integration has been studied, viral molecules are interrupted in the E1 or E2 open reading frames (Baker *et al.*, 1987; Lehn *et al.*, 1985; Matsukura *et al.*, 1986; Schneider-Maunoury *et al.*, 1987; Schwarz *et al.*, 1985). In contrast, in malignant lesions from the skin (like those found in patients with EV) viral DNA is found in an episomal state (Orth, 1987). These facts and the finding that in all sequenced genital papillomaviruses there are two proximal E2BSs located just upstream from the E6/E7 TATA box could mean that in genital carcinomas continuous expression of the E6 and E7 genes is incompatible with the presence of E2 protein; in cutaneous lesions, continuous expression of the E6 and E7 genes seems to be compatible with the presence of the E2 protein. This fact will impose great selection pressure for genital mucosa cells in which viral DNA integration

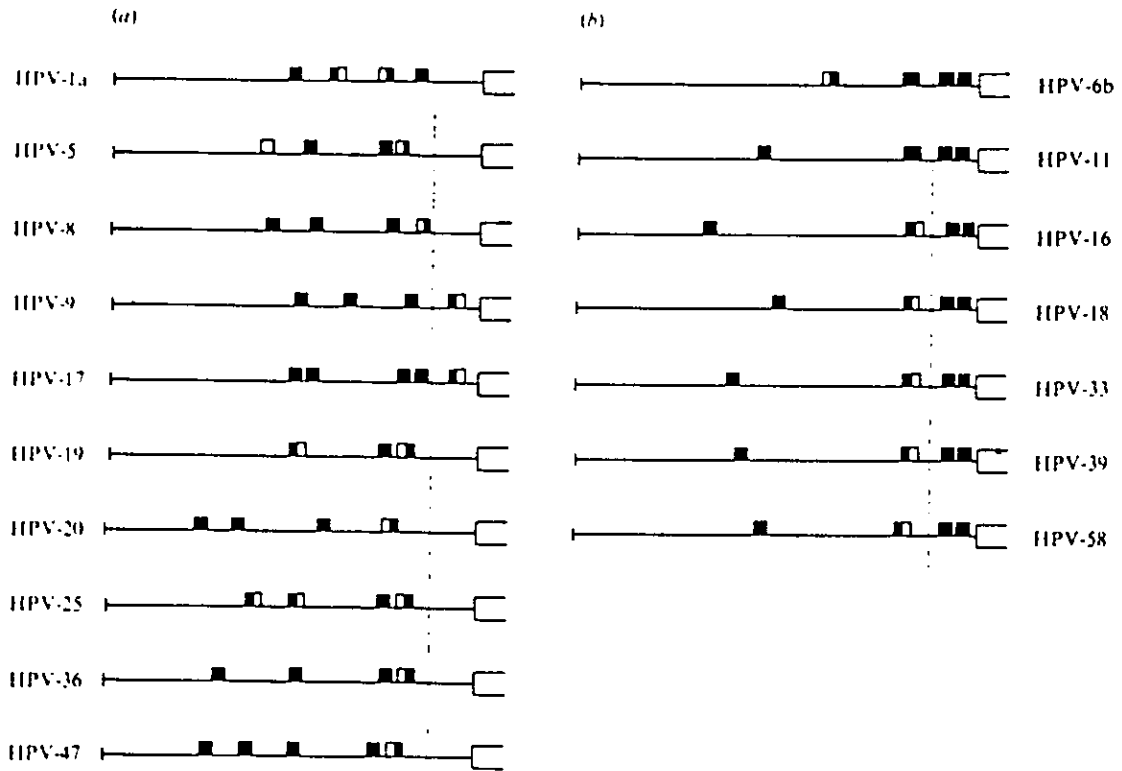
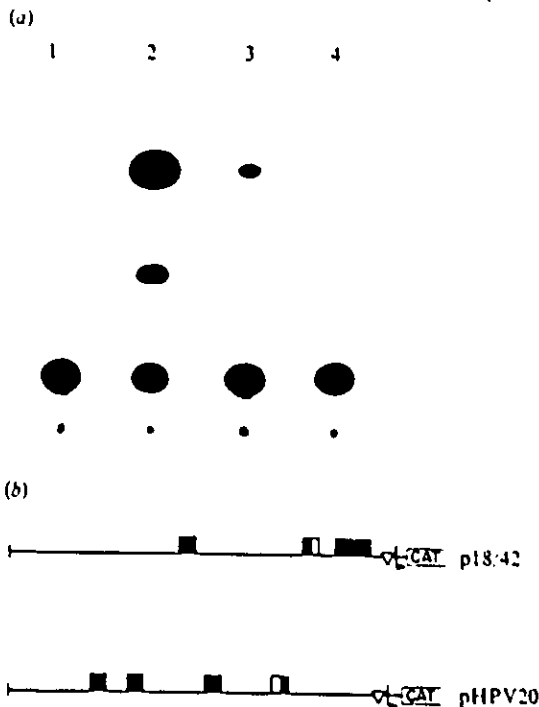


Fig. 2. Localization of E2BS in the control region of HPVs. DNA sequences upstream from the E6 start site were used to localize perfect E2BS (ACCGN₂CGGT; ■), or related (E or J) palindromes containing only a perfect half site. References: HPV-1a (Danos *et al.*, 1982), HPV-5 (Zachow *et al.*, 1987), HPV-6b (Schwarz *et al.*, 1983), HPV-8 (Fuchs *et al.*, 1986), HPV-9, HPV-17, HPV-20 and HPV-36 (Ensser & Pfister, 1990), HPV-11 (Dartmann *et al.*, 1986), HPV-16 (Seedorf *et al.*, 1985), HPV-18 (Cole & Danos, 1987), HPV-8, HPV-19 and HPV-25 (Krubke *et al.*, 1987), HPV-33 (Cole & Streeck, 1986), HPV-39 (Volpers & Streeck, 1991), HPV-47 (Kiyono *et al.*, 1990) and HPV-58 (Kirri *et al.*, 1992). (a) Cutaneous HPVs; (b) genital HPVs. The broken vertical lines are 100 bp upstream from known or putative E6 gene start sites.



has resulted in the interruption of the E2 gene leading to continuous expression of the immortalizing genes (Schneider-Maunoury *et al.*, 1987).

E2 protein repression of promoter activity has been demonstrated in HeLa cells, in an adrenocarcinoma cell line (SW13) and in primary human keratinocytes (Thierry & Yaniv, 1987; Bernard *et al.*, 1989; Romanczuck *et al.*, 1990). The results described here have been obtained by using the heterologous BPV-1 E2 gene product. Although different results have been reported for HPV and BPV E2 proteins (Chin *et al.*, 1988), there is experimental evidence suggesting that full-length HPV-16 and HPV-18 E2 proteins perform similarly to that of BPV-1 (Bernard *et al.*, 1989; Romanczuck *et al.*, 1990; Thierry & Howley, 1991).

Fig. 3. Differential response of genital HPV-18 (p18/42, lanes 3 and 4) and cutaneous HPV-20 (lanes 1 and 2) (a) promoter regions to the BPV-1 E2 gene product. Lanes 1 and 3, no E2 gene product; lanes 2 and 4, E2 gene product. HeLa cells were electroporated and a CAT assay was performed as described in Methods. The putative start site of transcription in HPV-20 is indicated by the arrow. (b) A schematic representation of the constructs.

Although we have not explored the molecular mechanism by which a full-length BPV-1 E2 protein represses CAT expression, the possibility that the E2 protein imposes a particular bend to the DNA that impedes it from looping out to form an active transcription complex has to be considered. Indeed, evidence exists for very strong bending of DNA upon binding of the E2 protein (Bedrosian & Bastia, 1990). The possibility that the binding of E2 protein to a site near the TATA box could physically hinder the binding of transcription factor IID or IIA to DNA seems less attractive. If this physical interference were the sole explanation for repression, the construct in which the distance between the proximal E2BS and the TATA box is 37 nucleotides might be expected to exhibit some decrease in repression compared to those constructs in which E2BSs are closer. We are currently exploring these possibilities.

We acknowledge F. Thierry, M. Yaniv, P. M. Howley, H. Barrera-Saldana and P. Fuchs for the kind gift of plasmids. We also thank Dr P. Fuchs and Dr T. Matsukura for communicating unpublished results. P.G. wishes to thank Givaudan S.A. and Foundation Aaron Saenz. This work was supported in part by CONACyT grant P228CC0-X891544 (to P.G. and A.G.C.) and by the Miguel Alemán A.C. Foundation (A.G.C.). This work is dedicated to the memory of Dr Carlos Fernandez Tomas, friend and colleague.

References

- ANDROPHY, E. J., LOWY, D. R. & SCHILLER, J. T. (1987). Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature, London* **325**, 70-73.
- BAKER, C. C., PHELPS, W. C., LINDGREN, V., BRAUN, M. J., GONDA, M. A. & HOWLEY, P. M. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *Journal of Virology* **61**, 962-971.
- BEDROSIAN, C. L. & BASTIA, D. (1990). The DNA-binding domain of HPV16-E2 protein interaction with the viral enhancer: protein-induced DNA bending and role of the nonconserved core sequence in binding site affinity. *Virology* **174**, 557-575.
- BERNARD, B. A., BAILLY, C., LENOIR, M.-C., DARMON, M., THIERRY, F. & YANIV, M. (1989). The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV 18 regulatory region in human keratinocytes. *Journal of Virology* **63**, 4317-4324.
- CHIN, M. T., HIROCHIKA, R., HIROCHIKA, H., BROKER, T. R. & CHOW, L. T. (1988). Regulation of human papillomavirus type 11 enhancer and E6 promoter by activating and repressing proteins from the E2 open reading frame: functional and biochemical studies. *Journal of Virology* **62**, 2994-3002.
- COLE, S. T. & DANOS, O. (1987). Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *Journal of Molecular Biology* **193**, 599-608.
- COLE, S. T. & STRECK, R. E. (1986). Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 33, which is associated with cervical cancer. *Journal of Virology* **58**, 991-995.
- CRIFE, T. C., HAUGEN, T. H., TURK, J. P., TABATABAI, F., SCHMID, P. G., DÜRST, M., GISSMANN, L., ROMAN, A. & TUREK, L. P. (1987). Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO Journal* **6**, 3745-3753.
- CRUM, C. P., MITAO, M., LEVINE, R. U. & SILVERSTEIN, S. (1985). Cervical papillomaviruses segregate within morphologically distinct precancerous lesions. *Journal of Virology* **54**, 675-681.
- DANOS, O., KATINKA, M. & YANIV, M. (1982). Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among Papovaviridae. *EMBO Journal* **1**, 231-236.
- DARTMANN, K., SCHWARZ, E., GISSMANN, L. & ZUR HAUSEN, H. (1986). The nucleotide sequence and genome organization of human papilloma virus type 11. *Virology* **151**, 124-130.
- DE VILLIERS, E.-M. (1989). Heterogeneity of the human papillomavirus group. *Journal of Virology* **63**, 4898-4903.
- DOSTATNI, N., THIERRY, F. & YANIV, M. (1988). A dimer of BPV-1 E2 containing a protease resistant core interacts with its DNA target. *EMBO Journal* **7**, 3807-3816.
- DÜRST, M., KLEINHEINZ, A., HOTZ, M. & GISSMANN, L. (1985). The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *Journal of General Virology* **66**, 1515-1522.
- ENSSER, A. & PFISTER, H. (1990). Epidermodysplasia verruciformis associated human papillomaviruses present a subgenus-specific organization of the regulatory genome region. *Nucleic Acids Research* **18**, 3919-3922.
- FUCHS, P. G., IFTNER, T., WENINGER, J. & PFISTER, H. (1986). Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus 8: genomic sequence and comparative analysis. *Journal of Virology* **58**, 626-634.
- GARCÍA-CARRANCA, A., THIERRY, F. & YANIV, M. (1988). Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *Journal of Virology* **62**, 4321-4330.
- GLOSS, B. & BERNARD, H.-U. (1990). The E6 E7 promoter of human papillomavirus type-16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distal element. *Journal of Virology* **64**, 5577-5584.
- HERDOMEL, P., BOURACHOT, B. & YANIV, M. (1984). Two distinct enhancers with different cell specificities coexist in the regulatory region of polyoma. *Cell* **39**, 653-662.
- HIROCHIKA, H., HIROCHIKA, R., BROKER, T. R. & CHOW, L. T. (1988). Functional mapping of the human papillomavirus type 11 transcriptional enhancer and its interaction with the trans-acting E2 proteins. *Genes & Development* **2**, 54-67.
- KIRRI, Y., IWAMOTO, S. & MATSUKURA, T. (1992). Human papillomavirus type 58 DNA sequence. *Virology* **185**, 424-427.
- KIYONO, T., ADACHI, A. & ISHIBASHI, M. (1990). Genome organization and taxonomic position of human papillomavirus type 47 inferred from its DNA sequence. *Virology* **177**, 401-405.
- KRUBKE, J., KRAUS, J., DELIUS, H., CHOW, L., BROKER, T., IFTNER, T. & PFISTER, H. (1987). Genetic relationship among human papillomaviruses associated with benign and malignant tumours of patients with epidermodysplasia verruciformis. *Journal of General Virology* **68**, 3091-3103.
- LEHN, H., KRIEG, P. & SAUER, G. (1985). Papillomavirus genomes in human cervical tumors: analysis of their transcriptional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* **82**, 5540-5544.
- MCBRIDE, A. A., BYRNE, J. C. & HOWLEY, P. M. (1989). E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* **86**, 510-514.
- MATSUKURA, T., KANDA, T., FURUNO, A., YOSHIKAWA, H., KAWANA, T. & YOSHIKAWA, K. (1986). Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 DNA integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. *Journal of Virology* **58**, 979-982.
- MAXAM, A. M. & GILBERT, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods in Enzymology* **65**, 499-560.
- MÜNGER, K., PHELPS, W. C., BUBB, V., HOWLEY, P. M. & SCHLEGEL, R. (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *Journal of Virology* **63**, 4417-4421.
- ORTH, G. (1987). Epidermodysplasia verruciformis. In *The Papovaviridae*, vol. 2, pp. 199-235. Edited by N. P. Salzman & P. M. Howley. New York: Plenum Press.

- PEISTER, H. (1987). Human papillomaviruses and genital cancer. *Advances in Cancer Research* **48**, 113-148.
- PHILIPS, W. C. & HOWLEY, P. M. (1987). Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product. *Journal of Virology* **61**, 1630-1638.
- ROMANZUCK, H., THIERRY, F. & HOWLEY, P. M. (1990). Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P₁₀₇ and type 18 P₁₀₅ promoters. *Journal of Virology* **64**, 2849-2859.
- SCHNEIDER-MAUNOURY, S., CROISSANT, O. & ORTH, G. (1987). Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *Journal of Virology* **61**, 3295-3298.
- SCHWARZ, E., DÜRST, M., DEMENKOWSKI, G., LATTEMAN, O., ZECH, R., WOLFSBERGER, E., SUHAI, S. & ZUR HAUSEN, H. (1983). DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *EMBO Journal* **2**, 2341-2348.
- SCHWARZ, E., FREESE, U. K., GISSMANN, L., MAYER, W., ROGGENBUCK, B., STREMLAU, A. & ZUR HAUSEN, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature, London* **314**, 111-114.
- SEEDORF, K., KRÄMMER, G., DÜRST, M., SUHAI, S. & ROWEKAMP, W. G. (1985). Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* **145**, 181-185.
- SPALHOLZ, B. A., YANG, Y. C. & HOWLEY, P. M. (1985). Transactivation of a bovine papilloma virus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell* **42**, 183-191.
- TAKAHASHI, K., VIGNERON, M., MATTHES, H., WILDEMAN, A., ZENKE, M. & CHAMBON, P. (1986). Requirement of stereospecific alignments for initiation from the simian virus 40 early promoter. *Nature, London* **319**, 121-126.
- THIERRY, F. & HOWLEY, P. M. (1991). Functional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P₁₀₅ promoter. *New Biologist* **3**, 90-100.
- THIERRY, F. & YANIV, M. (1987). The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO Journal* **6**, 3391-3397.
- THIERRY, F., GARCIA-CARRANCA, A. & YANIV, M. (1987). Elements that control the transcription of genital human papillomavirus type 18. *Cancer Cells* **5**, 23-32.
- VOLPERS, C. & STREECK, R. E. (1991). Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* **181**, 419-423.
- YEE, C., KRISHNAN-HEWLETT, I., BAKER, C. C., SCHLEGEL, R. & HOWLEY, P. M. (1985). Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *American Journal of Pathology* **119**, 361-366.
- ZACHOW, K. R., OSTROW, R. S. & FARAS, A. J. (1987). Nucleotide sequence and genome organization of human papillomavirus type 5. *Virology* **158**, 251-254.
- ZUR HAUSEN, H. & SCHNEIDER, A. (1987). The role of papillomaviruses in human anogenital cancers. In *The Papovaviridae*, vol. 2, pp. 245-263. Edited by N. P. Salzman & P. M. Howley. New York: Plenum Press.

(Received 11 November 1991; Accepted 17 February 1992)

Different Arrangement of Human Papillomavirus E2 Binding Sites Distinguishes Cutaneous Types from Those Associated with Mucosal Lesions

EFRAIN GARRIDO-GUERRERO,* ELBA CARRILLO,** MIRIAM GUIDO,***
ROCIO ZAMORANO,** ALEJANDRO GARCIA-CARRANCA,*** and
PATRICIO GARIGLIO****

- * *Laboratorio de Inmunología UMF, ENEP Izacala, UNAM, Tlalnepantla, Edo. de México (present address: Dept. of Molecular Biology, Howard Hughes Medical Institute, Princeton University, Princeton, NJ, USA)*
- ** *Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, México, D.F.*
- *** *Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F.*
- **** *Programa Multidisciplinario de Biomedicina Molecular IPN, México, D.F.*

Received for publication November 30, 1995; accepted April 26, 1996 (95/145 MB).

Abstract

High-risk-type human papillomavirus DNA sequences are found in a high percentage of carcinomas from the uterine-cervix, with the viral E1-E2 gene region usually disrupted and the E6 and E7 oncoproteins consistently expressed. The E2 protein is known to repress early transcription from genital HPV promoters having a proximal E2 binding site (E2BS) close to the TATA box. On the contrary, the E2 protein activates cutaneous early promoters having a longer distance between these sites. Using

an *in vivo* approach we analyzed the regulation, by the BPV-1 E2 protein, of a natural HPV-18 promoter where proximal E2BS were placed at variable positions relative to the TATA box, and of heterologous promoters where E2BS was placed upstream of any other known DNA-binding elements. Our results confirm that the E2 protein represses or activates HPV early gene transcription depending on the distance between the TATA box and the proximal E2BS. (*Arch Med Res* 1996; 27:389)

KEY WORDS: HPV; Cervical cancer; Gene regulation; E2 protein; E2 binding sites.

Introduction

Alteration of both proto-oncogenes and tumor suppressor genes plays an important role in the

development of all types of human cancers (1,2). However, in the early stages of genital carcinoma evolution, human papillomavirus (HPV) infection is greatly involved (reviewed in References 3 and 4). High-risk HPV types (such as HPV-16, or HPV-18) are frequently found associated with malignant uterine-cervix neoplasia. It has been described that the molecular organization of the different HPV genomes is very similar, with several early genes (E1 to E7), two late genes (L1 and L2) and a long control region (LCR) containing an origin of replication, the early promoter, and enhancer elements (3-5). In a high percentage of cervical carcinomas and cell lines derived from them, high-risk viral DNA has been found integrated into the

Correspondence to:

Dr. Patricio Gariglio, Depto. de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, P.O. Box 14-740, 07000 México, D.F. Tel. and FAX: (525) 747-7000 or (525) 747-7001, ext. 5313.

¹P. Gariglio is recipient of a CONACYT grant (4859N), a PNUD grant, a UNIDO grant and a Lic. Aaron Saenz fellowship. E. Garrido-Guerrero and E. Carrillo were supported by CONACYT fellowships. A. García-Carranca is recipient of a CONACYT grant (1705-M9209), and a PAPIIT grant (IN211394).

cellular genome (6-8), with the E1-E2 gene region usually being disrupted (7,9,10). However, the E6 and E7 viral oncogenes are consistently expressed in cervical carcinomas, suggesting that they contribute to the malignant phenotype (7,11). Expression of high-risk HPV E6 and E7 proteins together can efficiently induce immortalization of primary human keratinocytes (12,13) and E7 cooperates with activated *ras* or *fos* oncogenes to transform primary rodent cells (14,15). One of the host-cell target proteins of E7 from high-risk HPVs was found to be p105-RB (16). On the other hand, the E6 protein from HPV-16 and -18 binds and induces degradation of the tumor suppressor protein p53 (17). According to these observations it becomes extremely important to understand the mechanism by which HPV regulates E6 and E7 expression.

The highly conserved full-length (410 amino acids) E2 protein plays a crucial role in the viral replicative cycle. It is involved in the initiation of viral DNA replication and transcriptional regulation of early gene expression (18-21). The crystal structure of the bovine papillomavirus type 1 (BPV-1) E2 DNA-binding domain (carboxy-terminal 85-amino acids) indicates that E2 binds to specific DNA target through a dimeric antiparallel β -barrel (22); the DNA is smoothly bent over the barrel by the interaction of successive major grooves with a pair of α -helices symmetrically disposed on the outer circumference of the barrel. The DNA binding/dimerization domain is connected to a 160 amino acid acidic N-terminal activation domain through a proline-rich linker of variable length and composition (22). The E2 protein regulates HPV transcription by binding as a dimer to a specific DNA sequence, ACCG-N₁-CGGT (23,24) which is repeated several times in the LCR of all papillomaviruses (25,26). In the context of genital, but not cutaneous, HPV-18 full-length E2 protein represses transcription of the early promoter (26-29). The full-length BPV-1 E2 protein has been found to repress the HPV-11, HPV-16 and HPV-18 early promoters (27,29,30), and the E2 proteins from HPV-16 and -18 act similarly (29,30). The repression of the P105 promoter from HPV-18 can be explained by the short distance (3 nt) between the proximal E2 binding site (E2BS) and the TATA box. The binding of E2 protein to this site near the TATA box could physically hinder the binding of the transcription factor TBP or the complex TFIID. *In vitro*, binding of E2 to this site appears to destabilize the complex formed between TBP and the TATA box. However, purified E2 protein and TBP bind cooperatively to oligonucleotides containing a single E2BS located 8 bp away from the HPV-18 P105 TATA box (31).

Using an *in vivo* approach, we have undertaken a study of the mechanism by which the E2 protein represses transcription (26). In this work, we performed an analysis of the BPV-1 E2 regulatory activity on chimeric constructs where E2BS was placed at different positions relative to

the TATA box.

Materials and Methods

To increase the distance between the proximal E2BS and the TATA box from HPV-18 we used a plasmid (p18/42) which contains a 1053 bp BamHI fragment spanning the entire LCR, linked to the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) bacterial gene.

Oligonucleotide DNA primers 1 (5'-GGGAAGCTTTATTGTCCTGT-3') and 2 (5'-GCGCTCTAGAACCGTTTTCCGGT-3'), or 3 (5'-GCGCTCTAGAGTATAAAAG-3') and 4 (5'-GCAACTGACTGAAATGCCTC-3') were annealed to p18/42 plasmid and two DNA fragments were generated by PCR amplification. One fragment is flanked by HPV-18 nt 7530 near the distal site BssHII and an incorporated XbaI restriction site near the proximal E2BS. The other fragment is flanked by a newly generated XbaI site near the TATA box and an internal region of the CAT gene (contains 76 nt of the CAT gene). Amplified fragments were XbaI restricted and treated with ligase. The recombinant fragment (700 nt) was digested with BssHII and substituted for the BssHII-BssHII fragment on the p18/42 plasmid. Positive clones were selected by XbaI endonuclease digestion and their orientation confirmed with HindIII-BglII and RsaI digestions. This construct (pCG1) was digested with XbaI, filled in with the Klenow fragment of DNA polymerase I and religated in order to increase the distance between the proximal E2BS and the TATA box (pCGK construct). Positive clones were selected by the absence of the XbaI restriction site. A partial sequence of both plasmids showed that no other modification was introduced (critical promoter elements from P105 are intact).

Chimeric constructs containing mouse ribosomal protein promoters linked to the CAT gene were generated by inserting a double-stranded oligonucleotide containing a conserved E2BS and HindIII overhangs (5'-AGCTACCGAAAACGGT-3'), on the HindIII site of rpL30 or rps16 plasmids (both a generous gift from Dr. R. Perry). The structure of recombinants was verified by dideoxy sequencing (Sequenase, Amersham, plc). Oligonucleotides were synthesized on a Pharmacia-LKB Gene Assembler Plus.

Transient cotransfection assays were performed using COS and C-33A cell lines. Cells were grown in DMEM (COS) or (1:1) DMEM:F12 (C-33A) supplemented with 10% fetal calf serum. Twenty four hours before transfection 2×10^5 cells were seeded in a 6 cm diameter dish, then re-fed with 4.5 ml of medium 2 h before transfection. Calcium phosphate-DNA precipitates were prepared by standard procedures (32). In the presence of medium, 0.5 ml of precipitate (containing 3 μ g of CAT reported plasmid, 3 μ g of BPV-1 E2 expression vector-pC59- and 4 or 7 μ g of pGEM as carrier) was

added to each dish. After overnight incubation the precipitates were washed away, fresh medium was added and the transfected cells were incubated for an additional 30 h period. Cells were harvested and extracts prepared; the latter were normalized for protein content and assayed for CAT activity (33). All values shown represent averages from at least three independent transfection experiments.

Results

In order to separate the proximal E2BS from the TATA box on the natural context of the HPV-18 LCR we constructed two plasmids (pCG1 and pCGK) where the distance between these sites was increased. When C-33A cells were cotransfected with the reporter plasmid pCG1 (9 bp between the proximal E2BS and the TATA box) and the plasmid expressing E2, the promoter activity was repressed by 58% (Figure 1). A notable difference does exist when this value is compared to 90% repression obtained when BPV-1 E2 acts on the p18/42, containing the authentic viral promoter (see Figure 1). This observation suggests that even when a distance of 9 bp between the TATA box and E2BS exists, the E2 protein is capable of interfering with the formation of the transcription initiation complex. The presence of the trans-activation domain does not prevent the full length E2 protein from repressing *in vivo* transcription of the HPV-18 P105 promoter containing an additional 6 nt between the proximal E2BS and the TATA box.

On the other hand, when we evaluated the effect of BPV-1 E2 protein on the promoter activity of the pCGK construct (12 bp distance between TATA and E2BS), we observed an increase in the activity of approximately

50% in the presence of BPV-1 E2 (Figure 1). This result suggests that when the distance between E2BS and TATA sequences is increased to 12 bp, the E2 protein and TBP *in vivo* binds simultaneously to the promoter. In this context, the E2-TBP-TATA box complex could be a stronger transcriptional activator than the TBP alone, perhaps by increasing the binding affinity of TFIID for the promoter. The above experiments indicate that the same protein can function *in vivo* as either an activator or a repressor of transcription. This provides a further understanding of the mechanism by which the E2 transregulator can function in the natural context of the HPV-18 early promoter and by which the transcriptional regulation differs among genital and cutaneous HPVs.

To further explore the effect of E2 on heterologous promoters containing E2BS close to the TATA box, but upstream of other transcriptional elements, we used promoters from two mouse ribosomal protein genes; protein 30 from the Large subunit (rpL30), and protein 16 from the Small subunit (rpS16). These promoters lack a canonical TATA box, and contain internal elements (downstream of the cap site). We used short versions of these promoters to clone E2BS close to the cap site. When these heterologous promoters were used, we observed a low activation in the presence of E2 (Figure 2). Both chimeric promoters contain a single E2BS upstream of any other transcriptional element. In the case of rpL30k5, the E2BS is located 52 bp upstream of the cap site, while in rpS16h5, the E2BS is located 79 bp upstream of the cap site. These results are in contrast to previous observations indicating that E2 represses promoters having E2BS at 57 and 68 bp from the start site (26). In the case of the promoters for mouse ribosomal proteins, E2BS were placed upstream of any other site

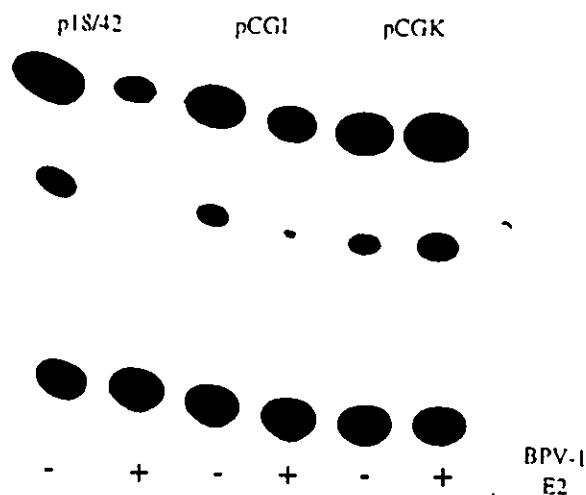
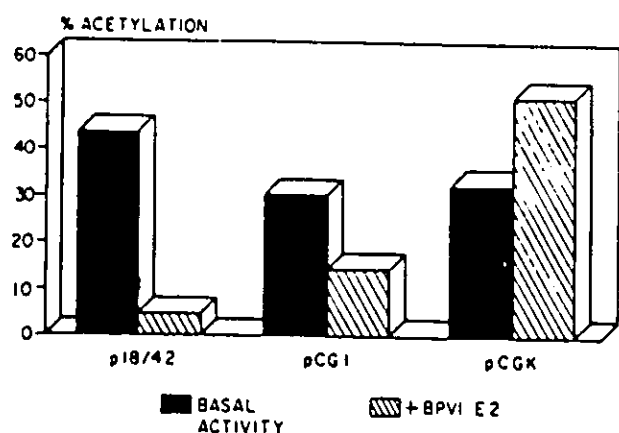


Figure 1. Effect of BPV-1 E2 on constructs presenting variable distances between the proximal E2BS and the TATA box. Constructs having 3 (p18/42), 9 (pCG1) and 12 (pCGK) bp distance between the proximal E2BS and the TATA box, and BPV-1 E2 expression plasmid or a plasmid containing the SV40 early promoter (pSV2) were cotransfected into C-33A cells (see Materials and Methods). CAT assays were performed as previously described and functional activity of p18/42, pCG1 and pCGK constructions evaluated. The percent acetylation shown in the bar graphic is the average of at least three independent experiments.

for the interaction of known transcription factors, since these promoters depend on internal elements (34,35).

Figure 3 shows a summary of data obtained on the effect of E2 on different constructs. As can be seen, while the natural HPV-18 promoter and a construct, where the proximal E2BS was separated from the TATA box by 6 bp, were repressed by E2, all other constructs (even pCGK1, where the same proximal site was further separated by an additional 3 bp) were activated by E2. Indeed, in the case of the promoters for mouse ribosomal proteins a slight activation was observed, even E2BS were placed in proximity to the cap site.

Discussion

Our results indicate that the E2 protein can transactivate or repress *in vivo* viral early gene expression. It is interesting to note that differences have been observed between the E2-mediated transactivation of the herpes simplex virus thymidine kinase (TK) promoter (containing E2BS) *in vitro* and in transient transfection experiments. The stimulation of the TK promoter reached only three- to fourfold *in vitro* when cellular extracts were used; these levels of activation were significantly lower than those observed *in vivo* (36). Moreover, the transcriptional stimulation of TK promoters containing one or several E2BS was similar *in vitro*, although in transfection experiments a very high synergy between two E2BS is characteristic of E2 trans-activation (37). This synergy could reflect the cooperative interaction of the cellular transcriptional machinery with the amino-terminal domains of multiple-bound E2 protein molecules (38). The lack of synergy observed *in vitro* might be due to lability or limiting amount of cellular factors required for E2 stimulation or improper modification of the E2 protein expressed and purified from yeast (31).

It is possible that E2-mediated repression of the HPV-18 P105 promoter results from competitive binding between E2 and TFIID on overlapping sites. However, the interference between E2 and TBP observed *in vitro* (31) was not as drastic as the *in vivo* E2-dependent HPV-18 P105 promoter repression (27-29). This transcriptional interference was more efficient when an E2 protein truncated from the amino-terminal domain was employed; thus truncated E2 proteins could interact more efficiently with E2BS in the presence of the cellular transcriptional machinery. On the other hand, full-length E2 could block more efficiently the binding of the more complex, and larger (>300 kDa) native TFIID complex than the interaction of purified TBP (37 kDa).

Enhanced expression of viral oncogenes in cells infected by genital "high risk" HPV types results in chromosomal instability and in an accumulation of mutational events. Cutaneous HPV types apparently follow other strategies to transform their host cells. In cutaneous lesions, continuous expression of the E6 and E7 genes seems to be compatible with the presence of the E2 protein. However, continuous expression of viral oncoproteins in genital mucosa cells requires viral DNA integration and E2 gene interruption (39). Our *in vivo* results suggest that the E2 transregulator can act as activator or repressor of the HPV-18 early promoter, depending on the distance between the TATA box and the proximal E2BS, thus supporting the idea that steric hindrance between TFIID and E2 could be the basis of repression.

It is important to notice that when E2BS were placed near the start site, but upstream of any known binding sites for transcription factors regulating expression of mouse ribosomal proteins, E2 was incapable of repressing their transcription. These results support the idea that binding of E2BS in-between binding sites for other viral or cellular factors is important for the repressor effect

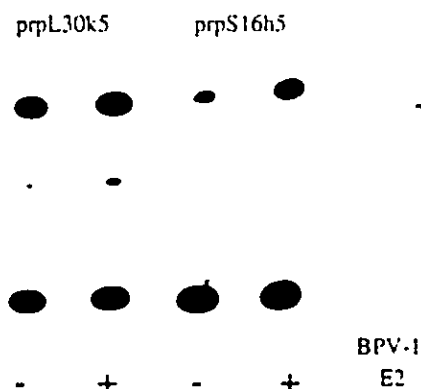
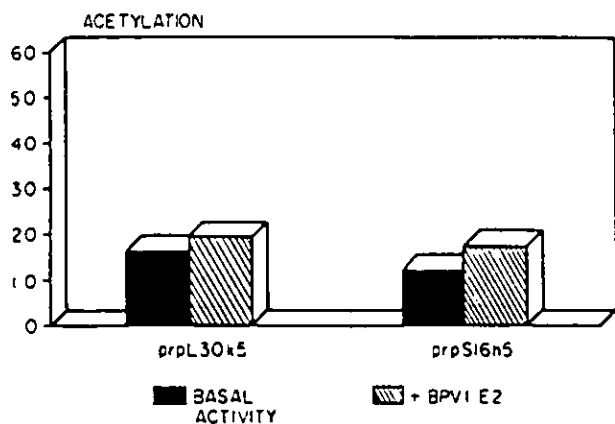


Figure 2. Effect of E2 on mouse ribosomal protein promoters with E2BS located at variable distance from the cap site. Construct rpl30k5 contains a single conserved E2BS cloned upstream of the Large ribosomal protein 30 gene, while construct rpS16h5 contains a single conserved E2BS cloned upstream of the Small ribosomal protein 16 gene, both from mouse. Both constructs were transfected in the absence (-), or presence (+) of E2. The summary of at least three independent experiments and a representative CAT assay are presented.

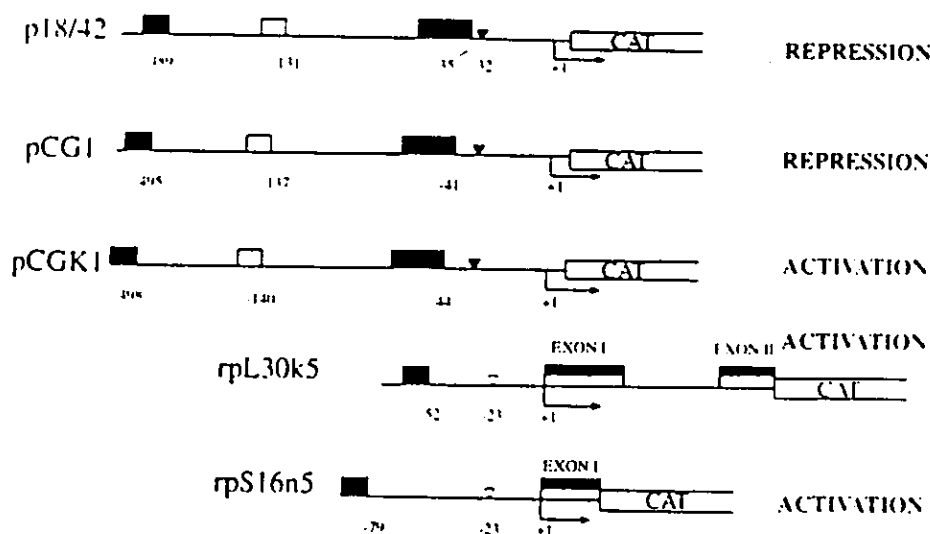


Figure 3. Effect of BPV-1 E2 on the expression of chimeric constructs with E2BS located at different positions relative to the TATA box. A) Schematic representation of the constructs. \rightarrow , transcription start site; \blacksquare , E2BS; \blacktriangledown , TATA box; ∇ , TATA-like elements. Chimeric CAT constructs were cotransfected with the BPV-1 E2 expression plasmid into C-33A cells. Cellular extracts and CAT assays were performed as described in Materials and Methods.

when it occurs close to the TATA box. By binding DNA in the vicinity of the TATA box, the E2 protein could be imposing a conformation on DNA that prevents other factors from interacting with each other.

Our results contribute to a better understanding of the replicative cycle differences between genital and cutaneous HPVs. They also support the hypothesis of multistep carcinogenesis during the development of genital neoplasia, being viral genome integration, E2 gene disruption and "high-risk" HPV oncogene expression of fundamental importance for the abrogation of cell growth arrest.

References

- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris C. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49.
- Gariglio P. Virus y cancer. *Ciencia y Desarrollo* 1995; 120:65.
- Pfister H. Human papillomavirus and genital cancer. *Adv Cancer Res* 1987; 48:113.
- zur Hausen H. Virus in human cancers. *Science* 1991; 254:1167.
- Butz K, Hoppe-Seyler F. Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J Virol* 1993; 67:6476.
- Dürst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* 1985; 66:1515.
- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature (London)* 1985; 314:111.
- Cullen AP, Reid R, Campion M, Lörincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 199; 65:606.
- Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1987; 61:962.
- Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL, García Carranca A. Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer* 1994; 56:640.
- Smotkin D, Wettstein FO. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:4680.
- Dürst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp P, Fusenig NE, Gissmann L. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* 1987; 1:251.
- Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, Doniger J, DiPaolo JA. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* 1987; 61:1061.
- Crook T, Storey A, Almond N, Crawford L. Human papillomavirus type 16 cooperates with activated ras and fos oncogenes in the hormone-dependent transformation of primary mouse cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:8820.
- Storey A, Pim D, Murray A, Osborn K, Banks L, Crawford L. Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO J* 1988; 7:1815.
- Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243:934.
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248:76.
- Ustav M, Stenlund A. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J* 1991; 10:449.

19. Yang L, Li R, Mohr IJ, Clark R, Botchan MR. Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. *Nature (London)* 1991; 353:628.
20. Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:5799.
21. Seo YS, Müller F, Lusky M, Gibbs E, Kim HY, Phillips B, Hurwitz J. Bovine papillomavirus (BPV) encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:2865.
22. Hegde RS, Grossman SR, Laimins LA, Sigler PB. Crystal structure at 1.7 Å of the bovine papillomavirus-1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. *Nature (London)* 1992; 359:505.
23. Dostatni N, Thierry F, Yaniv M. A dimer of BPV-1 E2 containing a protease resistant core interacts with its DNA target. *EMBO J* 1988; 7:3807.
24. McBride AA, Byrne JC, Howley PM. E2 polypeptides encoded by BPV type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:510.
25. Androphy EJ, Lowy DR, Schiller JT. Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature (London)* 1987; 325:70.
26. Guido M, Zamorano R, Garrido-Guerrero E, Gariglio P, García-Carranca A. Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the BPV-1 gene product. *J Gen Virol* 1992; 73:1395.
27. Thierry F, Yaniv M. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J* 1987; 6(11):3391.
28. Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M. The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 1989; 63:4317.
29. Romanczuck H, Thierry F, Howley PM. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol* 1990; 64:2849.
30. Chin MT, Hirochika R, Hirochika H, Broker TR, Chow LT. Regulation of human papillomavirus type 11 enhancer and E6 promoter by activating and repressing proteins from the E2 open reading frame: functional and biochemical studies. *J Virol* 1988; 62:2994.
31. Dostatni N, Lambert PF, Sousa R, Ham J, Howley PM, Yaniv M. The functional BPV1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev* 1991; 5:1657.
32. Wigler M, Silverstein S, Lee L, Pellicer A, Cheng YC, Axel R. Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell* 1977; 11:223.
33. Herbomel P, Bourachot B, Yaniv M. Two distinct enhancers with different cell specificities coexist in the regulatory region of polyoma. *Cell* 1984; 39:653.
34. Hariharan N, Kelly DE, Perry RP. Equipotent mouse ribosomal protein promoters have a similar architecture that includes internal sequence elements. *Genes Dev* 1989; 3:1789.
35. Hariharan N, Perry RP. A characterization of the elements comprising the promoter of the mouse ribosomal protein gene RPS16. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:3223.
36. Thierry F, Dostatni N, Arnos F, Yaniv M. Cooperative activation of transcription by bovine papillomavirus type 1 E2 can occur over a large distance. *Mol Cell Biol* 1990; 10(8):4431.
37. Gauthier JM, Dostatni N, Lusky M, Yaniv M. Two DNA-bound E2 dimers are required for strong transcriptional activation and for cooperation with cellular factors in most cells. *New Biol* 1991; 3:498.
38. Lambert PF, Dostatni N, McBride AA, Yaniv M, Howley PM, Arcangioli B. Functional analysis of the papillomavirus E2-transactivator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 1989; 3:38.
39. Schneider-Maunoury S, Croissant O, Orth G. Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J Virol* 1987; 61:3295.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

C. DISCUSION

En el presente trabajo se analizó el efecto trans-regulador de la proteína E2 sobre promotores quiméricos que controlan la expresión del gen reportero CAT. Para ello se comparó la posición del sitio de unión a E2 (E2BS) en relación al sitio de inicio de la transcripción (sitio +1). Se encontró que las construcciones con el E2BS proximal, a menos de 70 pb del sitio +1, fueron reprimidas, mientras que las construcciones que contienen más de 150 pb de distancia entre el E2BS y el sitio +1, la activan.

Por otro lado, también se consideró que el número de E2BS podría ser importante en la represión de los promotores. Sin embargo, la construcción que contiene solo un E2BS reprime de igual manera que las construcciones que contienen dos E2BS. Estos resultados conforman y extienden la observación de Thierry y Howley [65], donde el número de E2BS no modificó la represión del promotor P105 de HPV18 por la proteína E2 de BPV1. De aquí se concluye que un sólo sitio E2BS es suficiente para la represión transcripcional.

Los anteriores resultados fueron obtenidos en promotores quiméricos; sin embargo, a fin de conocer si la distancia del E2BS al sitio de inicio de la transcripción podría tener un significado biológico en el ciclo de vida de los HPVs, a partir de secuencias reportadas se analizó la posición natural de los E2BS en diversos HPVs presentes en lesiones cutáneas y de mucosa genital (ver figura 2). Se encontró diferencia en la posición del E2BS entre estos dos grupos: los HPVs de mucosa genital tienen dos E2BS muy cerca (menos de 100 pb) del sitio de inicio de la transcripción de los genes E6/E7 (figura 2b); mientras que en los HPVs cutáneos, el sitio E2BS más próximo está a más de 100 pb del sitio +1, o poseen un sitio incompleto de E2BS cerca de la caja TATA de E6/E7, como se encontró en HPV9 y HPV17 (figura 2a).

En el presente trabajo se encontró que el efecto trans-regulador de la proteína E2 de BPV1 dentro del promotor natural del HPV18 (genital) fue de represión, mientras que en el promotor natural de HPV20 (cutáneo) se observó una activación. Ello permitió confirmar que los promotores tempranos de HPV genitales y cutáneos son diferencialmente regulados por la proteína E2.

Se ha demostrado que el DNA de los HPVs presente en lesiones genitales malignas o en líneas celulares derivadas de estas, está integrado en el genoma celular [14, 46, 54, 57, 73]. En todos los casos en los que se ha estudiado la integración del virus, los genomas virales están interrumpidos en el marco abierto de lectura de los genes E1 o E2 [6, 54, 57]. En contraste con estas lesiones genitales malignas, en piel se ha encontrado que el DNA viral está en forma episomal [71]; esto habla de la importancia del gen E2 en el ciclo de vida de los HPVs. Por un lado como factor trans-regulador de la transcripción de las oncoproteínas virales E6 Y E7 responsables de mantener el estado transformado de la célula hospedera; y por el otro, su participación en la integración al genoma celular.

Por otro lado, la infección por los HPV16 y 18, considerados de alto riesgo, requieren de otros agentes que lesionen al DNA celular para llegar a desencadenar un cáncer genital, el cual al parecer resulta de la falla de los

mecanismos celulares que controlan la expresión de los genes virales persistentes. Seguramente la progresión de las lesiones tempranas hacia carcinomas esta determinada por factores co-carcinogénicos (virus del herpes, metabolitos mutagénicos del cigarro, hormonas, químicos, deficiencias inmunes, etc.), encontrados en estudios epidemiológicos, lo cual permite explicar los grandes periodos de latencia entre la infección primaria por el HPV y el desarrollo del tumor, así como el por qué el CaCu se desarrolla sólo en un porcentaje de los individuos infectados [73].

D. REFERENCIAS

1. Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. and Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49: 729.
2. Beeaudenon, S., Kremsdorf, D., Croissant, O., Jablonska, S., Wain-Hobson, S. and Orth, G. (1986). A new type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature (London)* 321: 246.
3. Bedell, M. A., Jones, K. H., Grossman, S. R. and Laimins, L. A. (1989). Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. *J. Virol.* 63: 1247.
4. Bernard, B. A., Bailly, C., Darmon, M., Thierry, F., and Yaniv, M. (1989). The intact HPV18-E2 gene product is a transcriptional repressor of the homologous E6 promoter in human keratinocytes. *J. Virol.* 63: 4317.
5. Bishop, J. M. (1987). The molecular genetics of cancer. *Science* 235: 305.
6. Broker, T. J. and Botchan, M. (1986). Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. *Cancer cells* 4: 17.
7. Campo, M. S. (1988). Viral and cellular oncogenes in papillomavirus-associated cancers. *Br. J. Cancer* 58 (Suppl. IX): 80.
8. Cantley, L. C., Auger, K. R., Carpenter, C. H., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R. and Soltoff, S. (1991). Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64: 281.
9. Cole, S. T. and Danos, O. (1987). Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J. Mol. Biol.* 193: 599.
10. Cripe, T. P., Haugen, T. H., Turk, J. P., Tabatabal, F., Schmid, P. G., Dürst, M., Gissmann, L., Roman, A. and Turek, L. P. (1987). Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implication for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* 6: 3745.
11. Curran, T. and Franza Jr., B. B. (1988). Fos and jun: the AP-1 connection. *Cell* 55: 395.
12. Chin, M. T., Hirochika, R., Hirochika, H., Broker, T. R. and Chow, L. T. (1988). Regulation of human papillomavirus type 11 enhancer and E6 promoter by activating and repressing proteins from the E2 open reading frame: functional and biochemical studies. *J. Virol.* 62: 2994.
13. Dostatni, N., Thierry, F. and Yaniv, M. (1988). A dimer of BPV1 E2 protein containing a protease resistant core interacts with its DNA target. *EMBO J.* 7: 3807.
14. Dürst, M., Kleinheinz, A., Holtz, M. and Gissmann, L. (1985). The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *J. Gen. Virol.* 66: 1515.

15. Dürst, M., Schwarz, E. and Gissmann, L. (1986). Integration and persistence of human papillomavirus DNA in genital tumors. En: Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer. (R. Peto, P. M. Howley, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York: 273.
16. Dürst, M., Croce, C. M., Gissmann, L., Scharz, E. and Huebner, K. (1987). Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1070.
17. Fearon, E. and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759.
18. Fukushima, M., Okagaki, T., Twiggs, L. B., Clark, B., Zachow, K., Ostrow, R. and Faras, A. (1985). Histological types of carcinoma of the uterine cervix and the detectability of human papillomavirus (HPV) DNA. *Cancer Res.* 45: 3252.
19. García-Carrancá, A., Miguel, F., Dahmus, M. E. and Gariglio, P. (1986). Structure of monkey kidney cell RNA polymerase II: characterization of RNA polymerase associated with SV40 late transcriptional complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 251: 232.
20. García-Carrancá, A., Alvarez-Salas, L., Bravo, C., Yaniv, M. and Gariglio, P. (1989). A nuclear factor from epithelial cells binds to conserved "TTGGCTT" motifs on the long control region of human papillomavirus type 18 (HPV18). En: Papillomavirus: UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series. (P. M. Howley, T. R. Broker, eds.) Alan R. Liss, Inc., New York: 124.
21. Gariglio, P., Ocadiz, R. and Saucedo, R. (1987). Human papillomavirus DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine cervix carcinoma. *Cancer cells* 5: 343.
22. Girl, I. and Danos, O. (1986). Papillomavirus genomes: from sequence data to biological properties. *Trends in Genetics* 2: 227.
23. Gius, D., Grossman, S., Bedell, M. A. and Laimins, L. A. (1988). Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 62: 665.
24. Gloss, B., Chong, T. and Bernard, H. U. (1989). Numerous nuclear protein bind the long control region of human papillomavirus types 16: a subset of 6 of 23 Dnase I-protected segments coincides with the location of cell-type specific enhancer. *J. Virol.* 63: 1142.
25. Green, M. R. (1989). When the products of oncogenes and antioncogenes meet. *Cell* 56: 1.
26. Hakama, M. (1986). Efficacy of screening for Cervical Cancer. En: Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer. (R. Peto, P. M. Howley, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York: 45.
27. Hansen, M. F. and Cavenee, W. K. (1988). Tumor suppressors: recessive mutations that lead to cancer. *Cell* 53: 172.
28. Harrison, S. M., Gearing, K. L., Kim, S. Y., Kingsman, A. J. and Kingsman, S. M. (1987). Multiple cis-acting elements in the control region of bovine papillomavirus type 1 (BPV-1). *Nucl. Acids Res.* 15: 10267.
29. Haugen, T. H., Turek, L. P., Mercurio, F. M., Cripe, T. P., Olson, B. J., Anderson, R. D., Seidl, D., Karin, M. and Schiller, J. T. (1988). Sequence-

- specific and general transcriptional activation by the bovine papillomavirus-1 E2 trans-activator require an N-terminal amphipathic helix-containing E2 domain. *EMBO J.* 7: 4245.
30. Hawley-Nelson, P., Androphy, E. J., Lowy, D.R. and Schiller, J. T. (1988). The specific DNA recognition sequence of the bovine papillomavirus E2 protein is an E2 dependent enhancer. *EMBO J.* 7: 525.
 31. Hirochika, H., Hirochika, B., Broker, T. R. and Chow, L. T. (1988). Functional mapping of the human papillomavirus type 11 transcriptional enhancer and its interaction with the transacting E2 protein. *Genes Dev.* 2: 54.
 32. Hubbert, N. L., Schiller, J. T., Lowy, D. R. and Androphy, E. J. (1988). Bovine papillomavirus transformed cell contain multiple E2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5864.
 33. Kanda, T., Furono, A. and Yoshiike, K. (1989). Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells. *J. Virol.* 62: 610.
 34. Koss, L. (1986). Sequence of events in carcinogenesis of the uterine cervix. En: Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer. (R. Peto, P. M. Howley, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York: 179.
 35. Lambert, P. F., Spalholz, B. A. and Howley, P. M. (1987). A transcriptional repressor encoded by BPV1 Shares a common carboxyl terminal domain with the E2 transactivator. *Cell* 50: 69.
 36. Lambert, P. F., Dostatni, N., McBride, A. A., Yaniv, M., Howley, P. M. and Arcangioli, B. (1989). Functional analysis of the papillomavirus E2 Transactivator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 3: 38.
 37. Lee, W., Michell, P. and Tjian, R. (1987). Purified transcription factor AP-1 interact with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49: 741.
 38. Mallon, R. G., Wojciechowicz, D. and Defendi, V. (1987). DNA-Binding activity of papillomavirus proteins. *J. Virol.* 61: 1655.
 39. McBride, A. A., Byrne, J. C. and Howley, P. M. (1989). E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 510.
 40. McDougall, J., Beckmann, A. and Galloway, D. (1986). The enigma of viral nucleic acids in genital neoplasia. En: Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer. (R. Peto, P. M. Howley, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York: 199.
 41. Morin, C., Braun, L., Casas-Cordero, M., Shah, K. V., Roy, M., Fostier, M. and Meisels, A. (1981). Confirmation of the papillomavirus etiology of condylomatous cervix lesion by the peroxidase-antiperoxidase technique. *J. N. C. I.* 66: 831.
 42. Nelson, J. H., Averette, H. E. and Richart, R. M. (1984). Dysplasia, carcinoma in situ and early invasive cervical carcinoma. *J. for Clinicians.* 34: 306.

43. Ocadiz, R., Saucedo, R., Cruz, M., Graef, A. and Gariglio, P. (1987). High correlation between molecular alteration of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine-cervix. *Cancer Res.* 47: 4173.
44. Peto, R. (1986). Introduction geographic patterns and trends. En: Banbury Report 21. Viral Etiology of Cervical Cancer, (R. Peto, P. M. Howley, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York: 3.
45. Pfister, H., Gissmann, L., zur Hausen, H. (1987). Partial characterization of the protein of human papillomavirus (HPV) 1-3. *Virology* 83: 131.
46. Pfister, H. (1984). Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 99: 112.
47. Phelps, W. C. and Howley, P. M. (1987). Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product. *J. Virol.* 61: 1630.
48. Phelps, W. C., Yee, C. L., Munger, K. and Howley, P. M. (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 53: 539.
49. Pirisi, L., Yasumoto, S., Feller, M., Doniger, J. and DiPaolo, J. A. (1987). Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virol.* 61: 1061.
50. Rows, W. E., Marret, L. D. and Reeves, W. C. (1986). An analysis of the association between herpes simplex virus type 2 antibodies and cervical cancer. En: Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer (R. Peto, P. M. Howley, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York: 187.
51. Raymond, C. A. (1987). Cervical dysplasia upturn worries gynecologists, health officials. *J. A. M. A.* 257: 2397.
52. Reid, R., Crum, C. P., Herschman, B. R., Fu, Y. S., Braun, L., Shah, K., Agronow, S. and Stanhope, C. (1984). Genital warts and cervical cancer. III Subclinical papillomaviral infection and cervical neoplasia are linked by a spectrum of continuous morphologic and biologic change. *Cancer* 53: 943.
53. Schlegel, R., Phelps, W. C., Zhang, Y and Barbosa, M. S. (1988). Quantitative keratinocyte assays identifies papillomavirus types associated with human cervical carcinoma and detects two distinct viral activities. *EMBO J.* 7: 3181.
54. Schneider-Maunoury, S., Croissant, O. and Orth, G. (1987). Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J. Virol.* 61: 3295.
55. Schreier, A. and Gruber, J. (1987). Transformation mechanisms of papillomavirus. *J. N. C. I.* 78: 779.
56. Schwarz, E., Schneider-Gädick, A., Roggenbuck, B. N., Mayer, W., Gissmann, L. and zur Hausen, H. (1986). Expression of human papillomavirus DNA in cervical carcinoma cell lines. En: Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer (R. Peto, P. M. Howley, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York: 281.
57. Schwarz, E., Freese, W. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremiau, A. and zur Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human

- papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature (London)* 413: 111.
58. Sinn, E., Müller, W., Pattengale, P., Tepler, I., Wallace, R., and Leder, P. (1987). Coexpression of MMTV/*v*-Ha-ras and MMTV/*c*-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell* 49: 465.
 59. Spalholz, B. A., Yang, Y. C. and Howley, P. M. (1985). Transactivation of a bovine papilloma virus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell* 42: 183.
 60. Stanbridge, E. J., Der, C. J., Doersen, C. J., Nishimi, R. Y., Peehl, D. M., Weissman, B. E. and Wilkinson, J. E. (1982). Human cell hybrids: analysis of transformation and tumorigenicity. *Science* 215: 252.
 61. Steinberg, B. M., Auborn, K. J., Brandsma, J. L. and Taichman, L. B. (1989). Tissue site-specific enhancer function of the upstream regulatory region of human papillomavirus type 11 in cultured keratinocytes. *J. Virol.* 63: 957.
 62. Syrjänen, K., Mantyjarvi, R., Parkkinen, S., Vayrynen, M., Saarikoski, S., Syrjänen, S. and Castren, O. (1986). Prospective follow-up in assessment of the biological behavior of cervical HPV-associated dysplastic lesions. En: Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer (R. Peto, P. M. Howley, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York: 167.
 63. Thierry, F., García-Carrancá, A. and Yaniv, M. (1987). Elements that control the transcription of genital human papillomavirus type 18. *Cancer cells* 5: 23.
 64. Thierry, F. and Yaniv, M. (1987). The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J.* 6: 3391.
 65. Thierry, F. and Howley, P. M. (1991). Functional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P105 promoter. *New Biologist* 3: 90.
 66. Thompson, T. C., Southgate, J., Kitchner, G. And Land, H. (1989). Multistage carcinogenesis induced by ras and myc oncogenes in a reconstituted organ. *Cell* 56: 917.
 67. Vousden, K. H., Doniger, J., DiPaolo, J. A. and Lowy, D. R. (1988). The E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 encodes a transforming gene. *Oncogene Res.* 3: 1.
 68. Whyte, P., Buchkovich, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A. and Harlow, E. (1988). Association between an oncogene and an antioncogene: the adenovirus E1A protein binds to the retinoblastoma gene product. *Nature (London)* 334: 124.
 69. Wu, T. C. and Mounts, P. (1988). Transcriptional regulatory elements in the non coding region of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 62: 4722.
 70. Yasumoto, S., Burkhardt, A., Doniger, J. and DiPaolo, J. A. (1986). Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of HIH 3T3 cells. *J. Virol.* 57: 572.
 71. zur Hausen, H. (1977). Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 78: 1.

72. zur Hausen, H. (1989). Papilloma viruses. En: DNA Tumor Viruses. Molecular biology of tumor viruses. Second edition, Part 2 (J. Tooze, ed.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 371.
73. zur Hausen, H. (1983). Herpes simplex virus in human genital cancer. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 25: 307.
74. zur Hausen, H. (1987). Papillomaviruses in human cancer. *Cancer* 59: 1692.