



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“ANALISIS DE LA PARTICIPACION DE PKA (proteína
cinasa dependiente de AMPc) EN LA REGULACION
TRANSCRIPCIONAL DE LA REGION DE
CONTROL DE HPV18”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

LILIA IVONNE CONTRERAS DIAZ

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. J. EFRAIN GARRIDO GUERRERO**

**LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MEXICO
2001**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
I. Cáncer	3
II. Cáncer cérvico uterino	3
III. Papilomavirus humano	4
IV. Función de las proteínas virales de HPV	6
V. Mecanismo de transformación	8
VI. Regulación de la expresión de HPV	10
VII. Proteína cinasa dependiente de AMP cíclico	12
VIII. Genes responsivos a AMPc	12
IX. Papel de CBP en la activación transcripcional por CREB y CREM	14
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
• Cultivo celular	19
• Plásmidos	19
• Oligonucleótidos	20
• Construcciones cortas de la LCR: wt, GREm y SP1m	20
• Construcción corta de la LCR que presenta el sitio de unión para YY1 proximal mutado	21
• Preparación de células competentes	22
• Purificación plasmídica	22
• Ensayos de transfección transitoria	23
• Cosecha celular	24
• Cuantificación protéica	24
• Ensayo de luciferasa	25
RESULTADOS	26
• PKA activa la transcripción de la LCR de HPV18	26

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

• Construcción corta de la LCR wt	27
• PKA activa la transcripción de la construcción que presenta la LCR corta de HPV18	29
• Construcciones cortas de la LCR con los sitios de unión para GRE y SP1 mutados	30
• Construcción corta de la LCR con el sitio de unión para YY1 mutado	31
• PKA activa la transcripción de las construcciones que presentan los sitios de unión para GRE, YY1 y SP1 mutados	35
• PKA activa la construcción pTiCRELUC	36
• PTICRECAT compete por CBP en la activación de p18/7806wt	39
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS	44

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

*A mis padres Pedro y Manuela
A mis hermanos Laura Verónica Pedro y Gaby
A todos mis amigos de esta época y de las pasadas
Por todos los que no están.....*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**Un sincero agradecimiento a todos y cada una de las personas que
intervinieron en la realización y conclusión de este trabajo**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ABREVIATURAS

NIC	Neoplasia intraepitelial cervical leve (I), moderada (II) o severa (III)
HPV	Virus del papiloma humano
BPV1	Virus del papiloma bovino
LCR	Región larga de control
NF1, AP1, KRF1, OCT1, GRE, YY1, SP1, C/EBP β	Factores transcripcionales celulares con sitios de unión dentro de la LCR
E1, E2, E4, E5, E6, E7	Proteínas virales tempranas
p105	Sitio de inicio de la transcripción de HPV18
pRB, p53	Proteínas supresoras de tumor
AMPc	Adenin monofosfato ciclico
PKA	Proteína cinasa activada por AMPc
CRE	Elemento de respuesta a AMPc
CREB	Proteína de unión a CRE
CBP y p300	Proteínas de unión a CREB. Coactivadores
C33-A	Línea celular de cervix

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

La fosforilación es uno de los mecanismos mediante los cuales la célula transduce una señal extracelular a su interior y genera respuestas que incluyen la activación transcripcional de genes específicos. Existen variadas rutas de transducción de señal que llevan a la activación de la transcripción, y una de ellas de gran importancia es la ruta de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA). La adenilato ciclasa es activada en respuesta a un estímulo extracelular, elevando los niveles intracelulares de AMP cíclico, estos a su vez activan a la PKA que inicia diversos eventos de fosforilación modificando la expresión de genes específicos que responden a AMPc.

La PKA es capaz de fosforilar una gran variedad de factores de transcripción, entre los que se encuentran algunos que están involucrados en la regulación de la expresión de los oncogenes de papilomavirus humano tipo 18, (tales como AP1, OCT1, GRE, YY1 y SP1). Sin embargo, la actividad transcripcional de estos factores, es dependiente de la activación de los coactivadores CBP y P300, que facilitan la comunicación entre los factores de transcripción y la maquinaria transcripcional basal.

En este trabajo demostramos que PKA incrementa la actividad transcripcional del promotor p105 de HPV18 en la línea celular C33-A. Del mismo modo que activa el promotor mínimo que posee los sitios de unión para GRE, YY1 y SP1 íntegros. Al parecer dicha activación es regulada por los coactivadores CBP y P300.

INTRODUCCIÓN

I. CÁNCER

Cuando las células se dividen sin control, el exceso de tejido desarrollado recibe el nombre de tumor o neoplasia. Los tumores pueden ser malignos a veces mortales, o bien pueden ser inofensivos. Las células de los tumores malignos se duplican continuamente, muy a menudo, de una forma rápida y sin control. Una propiedad de los tumores malignos es su capacidad para producir metástasis, es decir, la propagación de las células cancerosas a otras partes del organismo. Existen diversos factores que contribuyen al desarrollo de neoplasias, entre los más importantes son los medioambientales, mientras que los virus son una segunda causa. Estos factores alteran la estabilidad celular, causando mutaciones, pérdida cromosómica, amplificación y re-arreglos génicos (Münger, 1995).

II. CÁNCER CERVICO UTERINO

El cáncer es un problema de salud de gran interés en todo el mundo, siendo el cáncer cérvico uterino la enfermedad neoplásica más frecuente en la población femenina de los países subdesarrollados. En México éste cáncer ocupa el segundo lugar como causa de muerte entre la población femenina, ocasionando anualmente alrededor de 10 mil decesos. Debido a todo esto, el cáncer cérvico uterino representa un importante problema de salud y socioeconómico (SSA).

La lesión temprana del cáncer se conoce como neoplasia intraepitelial cervical (NIC), la cual ha sido definida por la presencia de anomalías intraepiteliales con células que exhiben núcleos atípicos. Estas lesiones poseen potencial de progresión a carcinoma invasor si no son eliminados. Las NIC's se agrupan en tres categorías dependiendo del grado de lesión: neoplasia leve (NIC I), moderada (NIC II) y severa (NIC III) o carcinoma *in situ*, el cual puede progresar a carcinoma invasor (Crum & McLachlin, 1995; Koss, 1987). Una NIC I presenta el

tejido completamente diferenciado, en una NIC II el tejido es menos diferenciado, y en una NIC III el tejido se encuentra totalmente indiferenciado. Estas lesiones avanzan o revierten de acuerdo con el daño genético en oncogenes, anti-oncogenes o dependiendo de la integridad del sistema inmune del paciente. Asimismo el tiempo de evolución y desarrollo de las NIC's, y el paso de éstas a carcinoma invasor, depende de la fisiología de cada individuo (Koss, 1987).

Entre los factores que predisponen al desarrollo del cáncer cérvico uterino está la multiparidad, múltiples parejas sexuales, el tabaquismo, el alcoholismo, el uso de anticonceptivos y un comienzo de una vida sexual activa a temprana edad, entre otros. Uno de los factores etiológicos implicados en el desarrollo del cáncer cérvico uterino, es la infección con el virus del papiloma humano (HPV). Aproximadamente el 95% de las biopsias derivadas de cáncer de cérvix presentan secuencias de DNA viral, con mayor frecuencia de los tipos 16 y 18 (zur Hausen, 1991; 1996), clasificados como virus de alto riesgo en base a su potencial oncogénico. Actualmente se han descrito más de 90 tipos de HPV y se clasifican con respecto a su actividad transformante en tipos de bajo riesgo, si solamente pueden provocar una neoplasia leve (NIC I), y tipos de alto riesgo si además de provocar una neoplasia leve, promueven el desarrollo de cáncer invasivo. Aquellos de bajo riesgo como HPV6 y HPV11 son frecuentes en verrugas genitales que muy raras veces progresan a lesiones malignas (zur Hausen, 1996).

III. PAPILOMAVIRUS HUMANO

El genoma de los papilomavirus contiene alrededor de 8000pb, es de DNA circular, de doble cadena y con 8 genes (generalmente) en la misma orientación en un arreglo conservado entre los distintos tipos virales (Danos et al, 1982). Estos genes se clasifican en los de la región de expresión temprana ("early"), que codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1 y E2), transactivación (E2) y transformación celular (E5, E6 y E7); y genes de expresión tardía ("late"), que codifican para las proteínas de la cápside (L1 y L2). Además, existe también una

región no codificante denominada región larga de control LCR ("long control región"). En HPV18 esta región es de aproximadamente 1Kb y está comprendida entre el extremo 3' del ORF ("open reading frame") de L1 y el extremo 5' del ORF E6. En este fragmento de DNA encontramos el origen de replicación viral, el promotor temprano, el potenciador constitutivo y diversos elementos de regulación (zur Hausen & de Villiers, 1994; Gius et al, 1988).

El genoma viral de los HPV's de alto riesgo, se encuentra generalmente integrado en el genoma celular en tumores malignos y líneas celulares derivadas de ellos (como HeLa, SiHa y CaSki); mientras que en lesiones leves, el DNA viral está presente en forma episomal preferentemente (Shirasawa et al, 1988; Spence et al, 1988; Schwarz et al, 1985) (Fig 1). La integración del DNA viral generalmente ocurre al azar, aunque en algunos casos sucede cerca de proto-oncogenes.

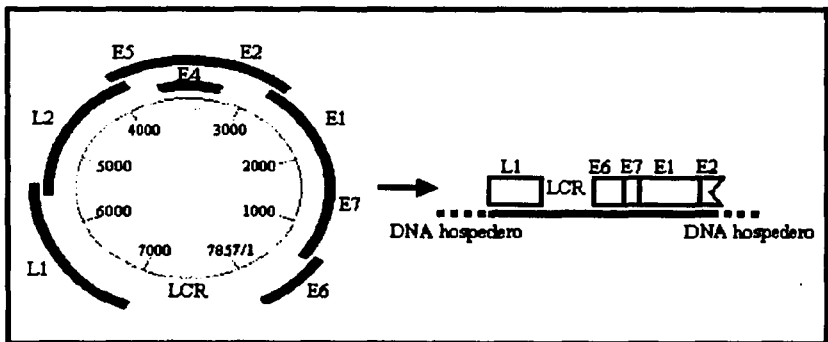


Fig 1. Genoma de HPV18 y su integración durante el desarrollo de cáncer. El genoma de este virus es de 7.9kb. Los factores que controlan la transcripción y replicación viral son localizados en la región de control (LCR). Los marcos de lectura (ORF) de los oncogenes E1 a E7 codifican para proteínas de expresión temprana; y ORF L1 y L2 codifican para las proteínas de expresión tardía. La integración del genoma viral ocurre durante la progresión maligna de muchos tumores con la interrupción de el ORF E2, liberando la expresión de los oncogenes E6 y E7.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estos virus infectan las células basales del epitelio en las que el virus se mantiene en forma episomal y se replica de manera coordinada con la división celular. La expresión de los genes virales tempranos estimula la proliferación de las células basales, resultando en una hiperplasia. La expresión de los genes que codifican para las proteínas de la cápside y producción de viriones, sólo ocurre en células diferenciadas del epitelio (Mansur & Androphy, 1993).

IV. FUNCIÓN DE LAS PROTEINAS VIRALES DE HPV

E1 es una fosfoproteína involucrada en la iniciación y elongación de la replicación viral, por lo que se une al origen de replicación que se encuentra localizado en la LCR. Ésta proteína tiene la capacidad de interactuar con la histona H1 y disgregar el nucleosoma; de esta forma es como promueve el inicio de la replicación (Conger et al, 1999). E2 también se une a E1 aumentando la afinidad de éste hacia el DNA (Mohr et al, 1990). E2 es la principal proteína que controla la transcripción del virus, actuando como un transregulador; éste se une a la región reguladora de HPV y actúa regulando positiva o negativamente la expresión del genoma viral. Esta actividad transreguladora depende esencialmente de la posición y número de los sitios E2 en la LCR. La proteína E2 actúa en forma dimérica y es capaz de activar la transcripción viral cuando su secuencia blanco se encuentra retirada de la caja TATA de un promotor, pero se comporta como un fuerte represor cuando su sitio de unión se encuentra muy cerca (menos de 200pb) de la caja TATA de un promotor. En los casos de HPV16 y 18, E2 actúa como un represor del promotor temprano que controla la expresión de los genes virales E6 y E7. La integración de los HPV interrumpe el marco de lectura abierto del gen E2, de tal manera que se pierde la expresión de esta proteína, y con ello se libera la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7 (Münger et al, 1989; zur Hausen, 1996).

La proteína E4 se expresa exclusivamente en estratos diferenciados del epitelio infectado, por lo que esta proteína participa estableciendo condiciones favorables para la maduración viral. E4 puede expresarse como una proteína de fusión con E1, formando un complejo que rompe los filamentos de queratina de las células suprabasales, permitiendo la salida de las partículas virales (Laimins, 1993; zur Hausen, 1996).

La proteína E5 es la principal proteína transformante de BPV1 (virus del papiloma de bovino) (Schiller et al, 1986) y al igual que E5 de HPV, tiene funciones múltiples (Pim et al, 1992). Estas proteínas pueden causar transformación de keratinocitos y pérdida de la dependencia de anclaje en fibroblastos de ratón; estimulan el crecimiento de células epiteliales de riñón de rata en cooperación con E7 de HPV16. E5 principalmente se localiza en Aparto de Golgi y en membrana plasmática, por lo que se encuentra relacionada con procesos de maduración protéica. Asimismo E5 se une a múltiples factores de crecimiento y reduce la degradación de receptores por lo que puede amplificar la señal mitogénica (zur Hausen, 1996).

Las proteínas codificadas por los marcos de lectura abiertos E6 y E7 de papilomavirus de alto riesgo poseen un papel importante en la transformación celular y en la promoción de tumores en ratones (Song et al, 1999). La expresión de estos oncogenes virales es un evento crucial en el proceso de carcinogénesis, ya que en ellos reside parte del potencial oncogénico de los papilomavirus dada su capacidad de inmortalización y transformación (Münger et al, 1989). Ambas proteínas de papilomavirus de alto riesgo participan en procesos de transformación celular y desarrollo de tumores en ratones (Song et al, 1999). Por consiguiente la interacción E6-p53 y E7-pRB es considerada el mecanismo más importante en el proceso de transformación celular (Tommasino & Crawford, 1995; Voudsen, 1993), y la expresión de estos genes es necesaria para mantener el fenotipo transformado de la célula.

V. MECANISMO DE TRANSFORMACIÓN

La proteína E6 de papilomavirus de alto riesgo se une a la proteína p53 y promueve su degradación a través de la vía de la ubiquitina (Scheffner et al, 1990, 1993; Werness et al, 1990). El supresor de tumor p53 controla la proliferación celular activando o reprimiendo genes involucrados en el ciclo celular. Durante estrés genotóxico, p53 arresta el ciclo celular para que ocurra la reparación de DNA o conduce la célula hacia apoptosis cuando ocurre un daño irreparable en el DNA. La disminución de los niveles de p53 en la célula no permite que la reparación del DNA o que la entrada a apoptosis se lleve a cabo; de esta manera ocurre la acumulación de las alteraciones somáticas en la célula. Es así como E6 tiene la habilidad de alterar las vías involucradas con el control del ciclo celular (Burns & El-Deiry, 1999; Tommasino & Crawford, 1995).

La proteína E7 de los virus de alto riesgo es capaz de interactuar con el producto del gen del retinoblastoma, pRB (Dyson et al, 1989), inactivándolo. Éste último participa en la regulación del crecimiento celular y la pérdida de la función de pRB se asocia con varios tipos de cáncer (retinoblastoma, osteosarcoma, y carcinoma de prostata), dado que hay inducción constante de la replicación de DNA con baja fidelidad. pRB controla la salida de la fase G1 y entrada a S del ciclo celular. pRB se une a factores de transcripción como E2F, factor que regula la transcripción de genes necesarios para la replicación del DNA. Ésta interacción pRB-E2F es regulada por eventos de fosforilación, E2F hipofosforilado se encuentra unido a pRB, y es inactivo; cuando se une E7 con pRB se libera el factor E2F dejándolo activo al ser fosforilado (Fig 2).

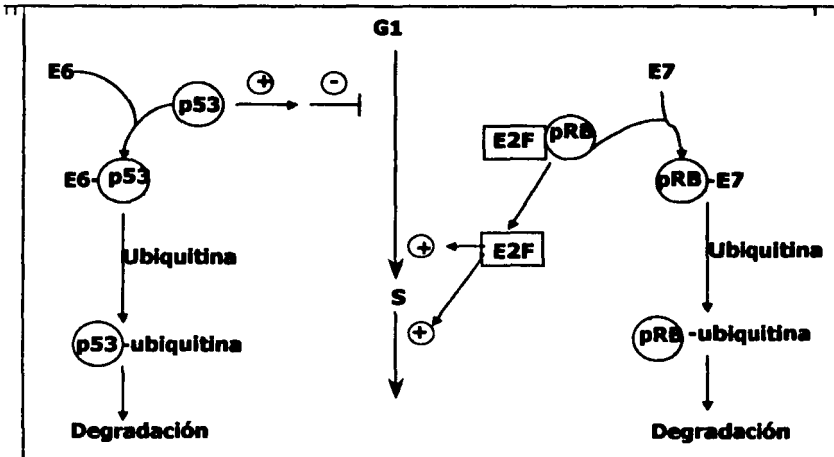


Fig 2. Efecto de las proteínas E6 y E7 en el ciclo celular. Posible mecanismo por el cual E6 y E7 alteran el ciclo celular al unirse a los supresores de tumor p53 y pRB respectivamente. E6 promueve la degradación de p53 por ubiquitinación. E7 se une a pRB y lo secuestra, de manera que el factor transcripcional E2F se mantiene transcripcionalmente activo.

También se ha visto que E7 presenta otras funciones implicadas en la transformación celular independientemente de su capacidad de unión con pRB. E7 puede unirse también con las proteínas p107, p130 y con el complejo ciclina A/cdk2. Los primeros dos regulan la transcripción de la familia E2F en diferentes fases del ciclo celular por lo que una sobreexpresión de cualquiera de estos genes puede causar una constante replicación de las células. La unión de E7 con la ciclina A/cdk2 permite que la célula escape del punto de control ("checkpoint") normal, lo que trae como consecuencia una baja fidelidad de la replicación del DNA (Tommasino & Crawford, 1995).

E7 de HPV16 es capaz de immortalizar células de ratón, pero requiere de la presencia de E6 para una completa transformación. De la misma manera en células de humano, la transformación depende de la expresión simultánea y cooperación

entre el producto de los genes E5, E6 y E7. Puesto que las tres proteínas son capaces de interferir con el funcionamiento normal del epitelio e inducir transformación celular, se ha considerado a estos oncogenes como el principal mecanismo de acción de los papilomavirus.

VI. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HPV

La expresión de los oncogenes E5, E6 y E7 de HPV18 se encuentra regulada por la LCR, que inicia en el nucleótido 105 (p105) frente al marco de lectura abierto de E6. Esta región presenta sitios de unión para factores de transcripción virales y celulares. Entre los factores celulares podemos encontrar a NF1 (Butz & Hoppe-Seyler, 1993), AP1 (Thierry et al, 1992), KRF1 (Mack & Laimins, 1991), OCT1 (Hoppe-Seyler et al, 1991), SP1 (Hoppe-Seyler & Butz, 1992), YY1 (Bauknecht et al, 1992) C/EBP β (Bauknecht et al, 1996) y un elemento de respuesta a glucocorticoides (Medina-Martínez et al, 1996). La mayoría de estos factores se unen a la región central de la LCR, muchos de ellos estimulan al promotor y algunos de ellos tienen una función dual, es decir pueden activar o reprimir, como es el caso de YY1 (Bauknecht et al, 1995). Es así como esta región es regulada por distintos factores de transcripción que le permiten actuar de manera positiva y/o negativa según el contexto de acción.

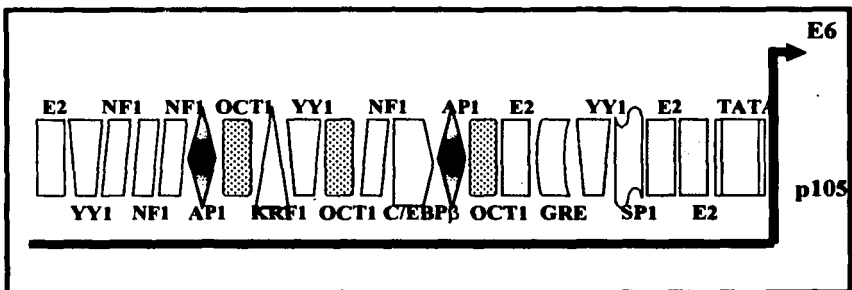


Fig 3. Representación esquemática de la LCR de HPV18. Se encuentran indicados los sitios de unión para diversos factores de transcripción virales y celulares.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La regulación transcripcional es un mecanismo de control crítico para diversos procesos biológicos como son el crecimiento y diferenciación celular. Asimismo, la regulación transcripcional de los genes de papilomavirus es dependiente de la RNA polimerasa II, de factores de transcripción sitio específicos, de la maquinaria de transcripción basal y de coactivadores celulares, que se encuentran finamente regulados por eventos de fosforilación (Boulikas, 1995).

La fosforilación protéica es una de las modificaciones post-traduccionales más versátiles extensamente usadas por la célula. Los dos principales sistemas de transducción de señales incluyen el AMPc y el diacilglicerol (DAG) como segundos mensajeros. Cada vía es también caracterizada por una proteína cinasa específica (proteína cinasa A y proteína cinasa C, respectivamente) y su secuencia blanco en la cual repercuten [elemento de respuesta a AMPc (CRE), y elemento de respuesta a 12-O-tetradecanoiforbol acetato (TPA), respectivamente] (Sassone-Corsi et al, 1990). La activación de éstas proteínas cinasas es estimulada por factores de crecimiento que se unen a sus receptores. Éstas cascadas de señalización por fosforilación pueden ser bidireccionales y existe un control dinámico entre fosfatasa y cinasas (Sassone-Corsi, 1998).

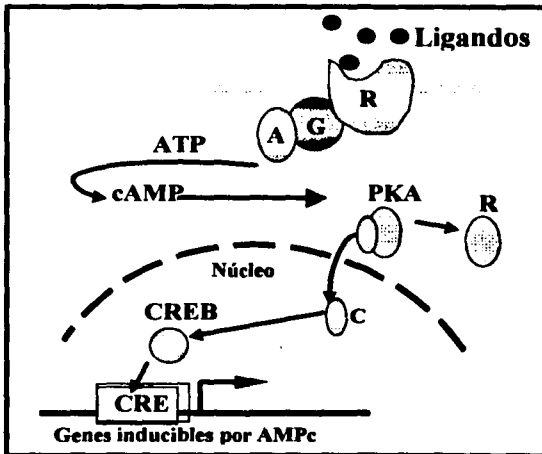


Fig 4. Transducción de señales por AMPc. Representación esquemática del trayecto por el cual los ligandos se unen a los receptores (R) de la membrana celular y su consecuencia en la expresión de ciertos genes. Al unirse los ligandos a sus receptores, activan las proteínas G, la cual estimula la adenilato ciclasa (AC). Esta convierte el ATP en AMPc, promoviendo la disociación de la proteína tetramérica inactiva PKA. Las subunidades catalíticas (C) se libera de las subunidades reguladoras y migra al núcleo, donde fosforilan a proteínas activadoras de la transcripción, como CREB. CREB actúa como un dímero al unirse a un elemento de respuesta a AMPc (CRE).

VII. PROTEÍNA CINASA DEPENDIENTE DE AMP CICLICO.

Los niveles intracelulares de AMPc son regulados principalmente por la adenilato ciclasa. Esta enzima es modulada por varios estímulos extracelulares mediados por sus receptores y su interacción con proteínas G, de manera que la unión de un ligando específico a su receptor provoca la activación o inhibición de la vía dependiente de AMPc. El AMPc se une a dos subunidades reguladoras del complejo tetramérico proteína cinasa A (PKA), liberando las subunidades catalíticas. La PKA puede entrar al núcleo dónde fosforila a diferentes proteínas nucleares, transfiriendo grupos fosfato del ATP a ciertos aminoácidos (S, T) de determinadas proteínas, entre ellas a CREB ("cAMP-response element binding protein") y CREM ("cAMP-responsive element modular"), estimulando así la expresión de un número importante de genes y originando la síntesis de enzimas, canales iónicos y neuropeptidos, así como factores de transcripción que a su vez activan otros genes (Fig 4) (Chrivia et al, 1993; Sassone-Corsi, 2000).

VIII. GENES RESPONSIVOS A AMPc

CREB, CREM y ATF1 ("activating transcription factor 1"), son algunos de los factores de transcripción que son fosforilados directamente por la PKA. Estas proteínas presentan un alto grado de homología en su secuencia en el curso de la evolución. Estos factores pertenecen a la clase de proteínas bZip, con cierre de leucinas; un alfa hélice, necesaria para la dimerización y un dominio adyacente básico rico en residuos de lisina y arginina necesarios para el contacto directo con el DNA.

Estas proteínas actúan como dímeros y son capaces de heterodimerizar entre ellas, pero sólo son posibles ciertas combinaciones de dimerización. Los dímeros se unen a una secuencia de DNA (CRE), la cual es definida como una secuencia palindrómica de 8pb TGACGTCa. Varios genes son regulados por estímulos endocrinales y contienen secuencias similares en su región promotora, asimismo el extremo 5' del palíndromo es el mejor conservado. Algunos factores

ATF/CREB son capaces de heterodimerizar con Fos y Jun, y esto puede cambiar la afinidad específica de unirse a CRE con respecto a sitios de unión Fos-Jun (Sassone-Corsi, 1995).

La parte amino terminal de CREB y CREM contiene un dominio de activación modular (AD) que está dividido en dos regiones independientes: la caja-P, la cual contiene un grupo de sitios fosfoaceptores para varias cinasas; y dos dominios ricos en glutamina (Q1 y Q2), estos dominios sirven como superficie de interacción con componentes de la maquinaria de transcripción basal y han sido caracterizados en otros factores como SP1 (Fig 5).

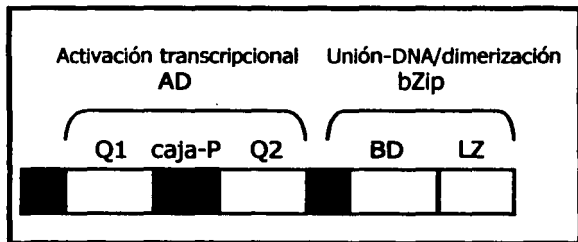


Fig 5. Estructura CREB y CREM. Los dominios de activación transcripcional, unión al DNA y dimerización son indicados. La fosforilación de las serinas 133 y 117 de CREB/CREM de la caja-P produce la activación de estas proteínas.

Las proteínas de unión a CRE pueden actuar como activadores y represores de la transcripción dependiendo de la heterodimerización, y las isoformas generadas por el procesamiento alternativo, poliadenilación alternativa e iniciación de la traducción alternativa (Sassone-Corsi, 2000).

La activación transcripcional de CREB requiere de la fosforilación de la serina 133 por PKA, o por otras cinasas en la serina 142. La regulación de la fosforilación de CREB puede ser ocasionada por señales mitogénicas (Fig 6) desencadenadas por factores de crecimiento y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Parker et al, 1996). La fosforilación de la serina 142 desestabiliza la interacción de CREB y su coactivador CBP ("CREB binding protein").

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. PAPEL DE CBP EN LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL POR CREB Y CREM

CBP y p300 son proteínas que se unen a CREB con la misma afinidad sólo cuando éste se encuentra fosforilado. Éstas actúan como proteínas puente acoplando los componentes de la maquinaria de transcripción basal, con factores de transcripción sitio específicos, por lo que no se unen directamente al DNA. Ambas proteínas presentan una identidad en su secuencia con tres dominios ricos en cisteína/histidina, un bromodominio y un dominio rico en glutamina en el extremo carboxilo terminal.

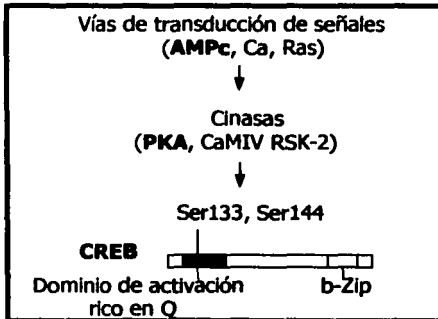


Fig 6. Activación de CREB. La activación de CREB puede ocurrir por diferentes cinasas. PKA es regulada por los niveles intracelulares de AMPc. La cinasa dependiente de Ca^{+2} /calmodulina tipo IV, es activada por concentraciones de Ca^{+2} . La unión de NGF y EGF a sus receptores induce la cascada de fosforilación que incluye a Ras unido a proteínas G. La activación de éstas y otras vías es dependiente del tipo celular, asimismo del estímulo recibido por la célula.

Estos coactivadores participan en una variedad de procesos celulares, tales como crecimiento celular, diferenciación, reparación del DNA, y apoptosis (Giles et al, 1998); son requeridos para la activación de genes músculo-específicos y arresto del ciclo celular durante la diferenciación de células musculares (Eckner, 1996). Debido a que estos coactivadores se encuentran mutados en algunos cánceres como en la leucemia mieloide aguda y enfermedades como el Síndrome de Rubinstein-Taybi, han sido denominados también anti-oncogenes celulares (Giordano & Avantaggiati, 1999).

CBP y p300 reclutan directamente a la RNA polimerasa II por interacción con componentes de la maquinaria de transcripción basal. De manera semejante CBP y p300 tienen la capacidad de interactuar con varios factores de transcripción, revelando su función como integradores moleculares, asimismo regulando los complejos eventos de señalización a nivel transcripcional. En este caso CBP y p300 actúan como puentes físicos (Chrivia et al, 1993). Otra característica de estos coactivadores es su actividad acetiltransferasa sobre las histonas nucleosomales (Fig 7), la cual facilita la transcripción al remodelar la cromatina, y regular los niveles de acetilación de activadores y factores de transcripción. Asimismo CBP y p300 son capaces de asociarse con otros coactivadores nucleares con actividad acetiltransferasa, formando un complejo multicoactivador que contribuye al inicio de la transcripción (Goldman et al, 1997).

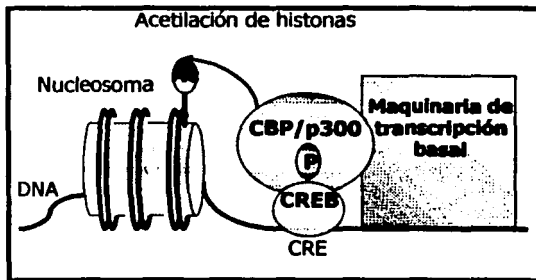


Fig 7. Función coactivadora de CBP y p300. Ambas proteínas actúan como puentes conectando la maquinaria de transcripción con factores de transcripción sitio específicos, al mismo tiempo que acetilan las histonas del nucleosoma.

CBP y p300 pueden sufrir diferentes grados de fosforilación en respuesta a distintos estímulos celulares que incrementan su potencial de activación para actuar en las diferentes cascadas de señalización (Liu et al, 1998). Esta activación también es dependiente del tipo celular (Kamei et al, 1991), asimismo, los diferentes estímulos conducen a la asociación con múltiples factores de transcripción. Dicha activación puede ser potenciada por algunas cinasas, entre ellas PKA (Swope et al, 1996; Vo & Goodman, 2001).

De esta manera, la activación de CBP por PKA, conduce a un incremento en la activación de la transcripción de ciertos genes, en muchos de los cuales participan algunos factores de transcripción (blancos directos de CBP y p300) como OCT1, AP1, SP1 y YY1, mismos que participan en la regulación de HPV18.

JUSTIFICACIÓN

El papilomavirus humano es considerado como el principal agente etiológico del cáncer cervico uterino. En la mayoría de los tumores cervicales el DNA de HPV está integrado en el genoma celular. Durante la integración se libera la expresión de los oncogenes virales E6 y E7, los cuales junto con E5 alteran el ciclo celular. El control de la transcripción de éstas oncoproteínas se encuentra bajo el dominio de la LCR, la cual es regulada de manera diferencial en las distintas líneas celulares. Durante la transcripción de ésta, participan la RNA polimerasa II, factores de transcripción generales y sitio-específicos, y coactivadores celulares.

La regulación de la expresión de los genes es un mecanismo de control muy fino, en el cual muchas veces intervienen procesos de fosforilación. Los diferentes grados de fosforilación de las proteínas pueden alterar las interacciones físicas entre los factores de transcripción mediante modificaciones post-traduccionales, regulando positiva o negativamente la transcripción.

Una de las principales cinasas de las vías de señalización es la proteína cinasa dependiente de AMPc. Un incremento en los niveles de PKA afecta la función de un sin número de proteínas nucleares y citoplasmáticas al ser fosforiladas. En el núcleo, el estado de fosforilación de factores de transcripción y proteínas relacionadas parece modular su función directamente. Esto pone en relieve la importancia que tiene el estudio de estos procesos de fosforilación sobre la regulación del papilomavirus humano, asimismo, los diferentes grados de fosforilación quizás son críticos en la respuesta a estímulos extracelulares en diferentes células, por lo que es necesario analizar la función que ejerce PKA en la regulación transcripcional de los HPV en líneas celulares derivadas de carcinoma cervical.

OBJETIVOS

Para determinar el efecto que tiene la proteína cinasa A (PKA) sobre la LCR de HPV18, nos proponemos como objetivos:

General:

Determinar el efecto de PKA sobre la actividad transcripcional del promotor p105 de HPV18 en la línea celular C33-A.

Específicos:

- Generar las construcciones cortas de la LCR con los sitios GRE y SP1 mutados y wt, a partir de las construcciones que presentan a la LCR completa con tales sitios mutados y el plásmido wt.
- Emplear mutagénesis sitio dirigida para mutar el sitio de unión proximal para el factor transcripcional YY1.
- Determinar el efecto que ejerce PKA sobre la actividad transcripcional de dichas construcciones.
- Determinar el posible mecanismo de acción de PKA sobre la LCR de HPV18.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

La línea celular C33-A es derivada de carcinoma cervical y se encuentra libre de secuencias de HPV. Las células se cultivan a 37°C con 5% CO₂ en medio DMEM/F12 (GIBCO BRL), suplementado con 2mM de L-Glutamina, 50U/ml de penicilina y 50µg/ml de estreptomycinina y 10% de suero de bovino neonato (Equitech).

Plásmidos

A continuación se muestra un cuadro con los plásmidos empleados en este trabajo, así como una breve descripción de estos:

<i>PBL</i>	vector base que contiene el gen reportero de luciferasa y al gen de resistencia para ampicilina
<i>p18URRLUC</i>	contiene a la LCR completa de HPV18 frente al gen reportero de luciferasa, comprendida entre los nucleótidos 6929 y 88, clonada entre los sitios de corte para las enzimas BamH I y Hind III del vector base pBL (Hoppe-Seyler et al, 1991)
<i>p18GREm</i>	contiene la LCR de HPV18, del nt 6929 al nt 88, clonada en pBL. El plásmido presenta el sitio único de unión para GRE en el nt 7839 mutado (Butz & Hoppe-Seyler, 1993)
<i>p18SP1m</i>	contiene la LCR de HPV18, del nt 6929 al nt 88 clonada en pBL. El plásmido presenta el sitio único de unión para SP1 mutado en el nt 7847 (Butz Hoppe-Seyler, 1993)
<i>PPKA</i>	Comprende la longitud que codifica para la subunidad alfa de PKA, el vector contiene los genes de resistencia para neomicina y ampicilina
<i>pTICRELUC</i> y <i>pTICRECAT</i>	ambos plásmidos contienen un sitio de reconocimiento para CREB/ATF-1 y un promotor mínimo constituido por el iniciador de la TdT y la caja TATA frente al gen reportero de luciferasa y cloramfenicol acetil transferasa, respectivamente

Oligonucleótidos

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados (GIBCO BRL) para las construcciones se enlistan en el siguiente cuadro:

Oligonucleótido	Secuencia	Posición en la LCR
YY1pms	5'acatactatacCCGCGGtGaatTcAGCGaacaattgta3'	7841 a 15
YY1pma	3'-aaccgcgtcgtgtatgatatgGGCGCCaCttaAgTCGctt 5'	7833 a 13
LCR 88	5' ggc aagctt ttctacatctttatatacacc 3'	66 a 88
LCR 7806	5' ggg gga tcc tacatagtttatgcaaccgaaat 3'	7806 a 7829

Cuadro 1. Descripción de los oligonucleótidos usados en las construcciones. Los oligonucleótidos LCR88 y LCR7806 presentan con negritas los sitios de corte para las enzimas Hind III y BamH I respectivamente. *Los extremos 5'de estos oligonucleótidos tienen un sitio de restricción precedido por 3 nucleótidos extra para hacer más eficiente el corte correspondiente. Los oligonucleótidos YY1pm sentido y antisentido presentan la mutación en mayúsculas; su secuencia ya había sido reportada por Bauknecht y colaboradores en 1995. Ambos oligonucleótidos son complementarios en 30 bases.

Construcciones cortas de la LCR: wt, GRE-m y SP1-m

En mezclas de PCR independientes se emplearon cada uno de los plásmidos correspondientes como templado (p18URRLUC, p18GREm y p18SP1m), y los oligonucleótidos LCR7806 y LCR88, para generar las construcciones cortas: wt y las que presentan el sitio de unión para GRE mutado y SP1 mutado, respectivamente. Los productos obtenidos son fragmentos de 157pb, que son purificados a partir de gel de agarosa, de manera que se recupera únicamente el producto de PCR que porta la mutación y wt. Este fragmento fue digerido con las enzimas BamH I y Hind III. Precedida a la restricción, los fragmentos fueron purificados para después realizar la clonación en el vector base pBL. A las construcciones obtenidas se les denominó p18/7806wt, p18/7806GREm p18/7806SP1m.

Construcción corta de la LCR que presenta el sitio de unión para YY1 proximal mutado

Se utilizaron los oligonucleótidos internos complementarios entre sí por 30pb, portadores de la mutación: YY1pms (sentido) y YY1pma (antisentido); así como los oligonucleótidos externos flanqueantes: LCR7806 (sentido) y LCR88 (antisentido). Ya que estos últimos oligonucleótidos presentan los sitios de corte para las enzimas BamH I y Hind III respectivamente, la clonación es dirigida.

Esta construcción se realizó mediante 3 ensayos de PCR. En el primer ensayo, se utilizó el plásmido p18URRLUC como templado y los oligonucleótidos YY1pms y LCR88; en un segundo PCR se empleó el mismo templado y los oligonucleótidos YY1pma y LCR7806; ambos productos de PCR se purificaron y se mezclaron en un tercer PCR para ser empleados como templado, ya que son fragmentos complementarios que portan la mutación en el sitio de unión proximal para YY1 de la LCR de HPV 18. Además en esta región son complementarios al 100%. Este ensayo de PCR se dividió en 2 etapas, en la primera se adicionaron los componentes de la reacción, y los productos de los PCRs anteriores y se sometió a 10 ciclos de amplificación. En la segunda etapa se adicionaron los oligonucleótidos LCR7806 y LCR88, para generar un fragmento de aproximadamente 160pb con la mutación deseada y con los sitios de corte para las enzimas BamH I (5') y Hind III (3'). Este fragmento, después de ser digerido (con las enzimas BamH I y Hind III) y purificado, se clonó en el vector pBL, el cual fue previamente restringido con las mismas enzimas.

El sitio de unión wt para el factor YY1 presenta en su secuencia un sitio de corte para la enzima Ase I, que se pierde cuando se integra la mutación, pero se genera un sitio de corte para la enzima EcoR I. Se empleó este criterio para la selección de las clonas que portan la mutación.

La secuenciación de los candidatos correspondientes para cada construcción se realizó mediante PCR, utilizando el Kit para secuenciación de ADN: Big Dye™ (Applied Biosystems) y el análisis se realiza en el secuenciador automático ABI PRISM 310, en la Unidad de Síntesis de Ácidos Nucléicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN.

Preparación de bacterias competentes (método con CaCl_2)

Se creció un cultivo de la cepa bacteriana DH5 α de *Escherichia coli* en 5ml medio SOB (bacto-triptona 2%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 0.05% a un pH de 7.5) y se incubó a 37°C con agitación constante a 200rpm durante 12 h. Posteriormente se inocularon 500 μ l de este precultivo en 250ml de medio SOB suplementado con 20mM de MgSO_4 /ml y se incubó a 37°C a 200rpm durante aproximadamente 3 h, hasta que las bacterias alcanzaron una densidad óptica de 0.4 a 600nm. Se colectó el cultivo en tubos de 15ml cónicos de pre-enfriado manteniéndose en hielo 10 min. Se empastillaron las células por centrifugación a 2000rpm por 15min a 4°C, eliminando así el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 10ml de CaCl_2 0.1M pre-enfriado y se incubaron durante 30min en hielo. Nuevamente se centrifugaron a 2000rpm por 15min a 4°C y la pastilla se resuspendió en 2ml de CaCl_2 0.1M pre-enfriado, se incubaron durante 10min y se hicieron alícuotas de 200 μ l en tubos eppendorf para almacenarse a -80°C.

Purificación plasmídica

Se transformó en la cepa DH5 α de *Escherichia coli*, con cada uno de los plásmidos mediante un choque térmico a 42°C (las bacterias fueron previamente tratadas con el método de CaCl_2 para ser competentes) y realizar la purificación de los plásmidos con el Kit tip-500 de QIAGEN:

Se picó una colonia de la caja de cultivo con las bacterias transformadas con el plásmido en turno y se cultivó en 5ml de medio Luria con Ampicilina

100µg/ml a 37°C con agitación moderada durante 12h. Las bacterias se empastillaron a 5000rpm durante 10min a 4°C y se resuspendieron en 10ml del buffer P1 (Tris-Cl 50mM, EDTA 10mM y RNAsa A 100µg/ml a pH 8.0), después de adicionaron 10ml de buffer P2 (NAOH 200mM y SDS 1%) con la finalidad de lisar las células, se agitaron suavemente por inversión (4-6 veces) y se incubaron 5min a temperatura ambiente con el propósito de desnaturalizar el DNA cromosomal sin afectar el DNA plasmídico. Posteriormente se adicionaron 10ml de buffer P3 preenfriado (acetato de potasio 3M pH de 5.0), se agitó suavemente y se incubó en hielo durante 20min para neutralizar el buffer P2. En este paso el DNA cromosomal forma agregados que son capaces de causar la precipitación de las proteínas y el RNA que ha sido degradado por la RNAsa. La muestra se centrifugo a 13000rpm, 30min a 4°C para empastillar estos contaminantes que han coprecipitado. El sobrenadante se pasó por la columna de intercambio iónico QIAGEN-tip 500 ya equilibrada con 10ml de buffer QBT (NaCl 750mM, MOPS 50mM, isopropanol 15% y Triton X-100 0.15% a un pH de 7.0). La columna se lavó con 30ml de buffer QC (NaCl 1M, MOPS 50mM e isopropanol 15% a un pH de 7.0) y después se eluyó el plásmido con 15ml de buffer QF (NaCl 1.25mM, Tris-Cl 50mM e isopropanol 15% a un pH de 8.5). El DNA eluido se precipita con isopropanol y se lava con etanol al 70% por centrifugación. La pastilla de DNA se secó, se resuspendió en 500µl de agua desionizada estéril (milli-Q) y se almacenó a 4°C.

Ensayos de transfección transitoria

Las transfecciones se realizaron mediante el método de precipitación con fosfato de calcio (van der Eb & Graham, 1980) en la línea celular C33-A, con las construcciones correspondientes. Para ello, 24 h antes de la transfección, se sembraron 350,000 células en placas de cultivo de 6 pozos a partir de una caja p100 que se encontraba al 90% de confluencia. Una hora antes de la transfección, el medio de cultivo de las células se cambió para inducir la mitosis, ya que es sólo en

ese momento en el que el DNA transfectado puede entrar al núcleo. En un tubo de microfuga estéril se adicionaron 5-7.5µg de DNA total (ajustado con DNA de esperma de salmón) y 16µl de CaCl₂ 2M ajustándose a un volumen de 125µl totales con agua desionizada estéril (milli-Q). En un tubo de polipropileno se adicionaron 125µl de HeBS 2X (275mM NaCl, 10mM KCl, 1.4mM Na₂HPO₄, 10mM Dextrosa, 50mM Hepes) a pH 7.05. La solución DNA-CaCl₂ se mezcló por goteo y en agitación constante con el HeBS. Esta mezcla de transfección se incubó un min a 37°C y después se le adicionó un volumen (250µl) de medio suplementado para detener la reacción evitando así la formación de grandes cristales, los cuales no son permeables a la célula. La mezcla se homogenizó por vortex y se distribuyó sobre la monocapa celular. 14 h post-transfección, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y se les adicionó medio fresco para evitar muerte celular por toxicidad (Fig 8).

Cosecha celular

La cosecha se realizó 40h post-transfección: se eliminó el medio de la monocapa celular por vacío, y se lavaron las células 2 veces con PBS 1X seguidos de la adición de 150µl de buffer de lisis 1X (del Kit Luciferase Assay System de Promega). Las células se incubaron por 15min en agitación constante con el buffer de lisis, después se recuperó el lisado celular con fragmentos de hule estériles en tubos de microfuga. Los lisados se agitaron con vortex y se centrifugaron a 12000rpm 5 min a 4°C y así recuperar 130µl del sobrenadante (Fig 8).

Cuantificación protéica

Los lisados celulares se cuantifican por el método de Bradford: se toman 6µl del lisado y se colocan en un tubo de microfuga nuevo, junto con 54µl de buffer de lisis 1X y 540µl de reactivo de Bradford. Se agita suavemente y se cuantifica a 595nm para normalizar (Fig 8).

Ensayo de luciferasa

Para el ensayo de luciferasa se emplearon 70 μ l del lisado celular ya normalizado, a los cuales se les adicionaron 50 μ l de reactivo de luciferasa. Las unidades relativas de luminiscencia se cuantificaron en el luminómetro Fluoroskan Ascent FL (Labsystems) (Fig 8).

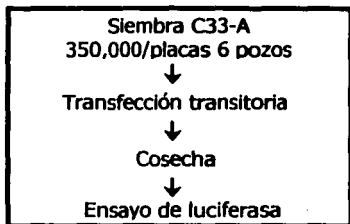


Fig 8. Síntesis de la estrategia empleada en la transfección transitoria. Se siembran 350,000 células C33-A en placas de 6 pozos 24 h antes de la transfección. Una vez que se lleva a cabo la transfección se requieren de 40h para realizar la cosecha y efectuar el ensayo de luciferasa.

RESULTADOS

PKA activa la transcripción de la región de control de HPV18

Para analizar el efecto que tiene PKA sobre la regulación transcripcional de la LCR de HPV18, cotransfectamos el plásmido p18URRLUC (que posee la LCR completa de HPV18 frente al gen reportero de luciferasa) y el plásmido pPKA (que codifica para la subunidad alfa de PKA) en células C33-A. Los resultados nos muestran que PKA incrementa la transcripción de la LCR completa dos veces por arriba de la basal (Fig 9). Todos los resultados mostrados aquí representan el promedio de 3 ensayos independientes en los que se tomó a la basal como uno relativo.

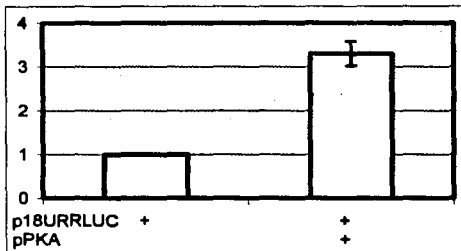


Fig 9. PKA activa la transcripción de la LCR completa. Ensayo de luciferasa. Se transfecó 1µg del plásmido reportero p18URRLUC y 500ng del plásmido transactivador pPKA. PKA induce un incremento en la actividad transcripcional de la LCR de HPV18, representada por veces de activación con respecto a la basal.

Esto puede explicarse, porque la función de algunos factores de transcripción sitio específicos de la LCR posiblemente se encuentran regulados por fosforilación, esto nos sugiere que la fosforilación favorece la unión de estos factores de transcripción con su secuencia consenso.

Ya que la función de PKA podría estar implicada en la activación transcripcional de la LCR mediante la fosforilación de algunos de los factores que tienen sitios de unión dentro de ésta, decidimos realizar una construcción corta de la LCR para identificar cual es la región responsiva de dicha activación, en la cual deletamos el extremo 5' de la LCR hasta el nucleótido 7806.

Construcción corta de la LCR wt

Mediante PCR generamos el fragmento corto de la LCR que abarca de la posición 7806 a la 88 de HPV18. En el ensayo de PCR utilizamos como templado el plásmido p18URRLUC con los oligonucleótidos LCR7806 y LCR88, a una temperatura de alineamiento de 53° C. El fragmento obtenido es de aproximadamente 160pb (Fig 10). El fragmento se purificó a partir de gel de agarosa, con un Kit para extracción de DNA de Boehringer Mannheim. Posteriormente se digirió con las enzimas BamH I y Hind III. Posterior a la restricción el fragmento fue purificado mediante precipitación con acetato de amonio para después realizar la ligación en el vector base pBL, previamente restringido con las mismas enzimas.

Con la mezcla de ligación se transformaron células competentes de la cepa bacteriana DH5α de *E. coli*. A partir de cultivos líquidos de las colonias obtenidas de la transformación se realizó una extracción plasmídica en pequeña escala para llevar a cabo el análisis de restricción con las enzimas BamH I y Hind III, y corroborar que las clonas candidato tengan el fragmento esperado (Fig 11).

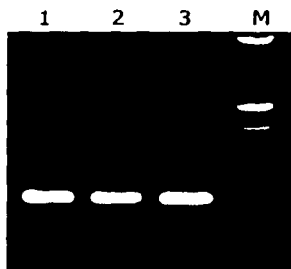


Fig 10. Fragmentos de ~160pb, generados con los oligonucleótidos LCR7806 y LCR88. 1)wt y los que presentan la mutación en los sitios: 2)GRE, 3)SP1, y 4) marcador de 100pb.



Fig 11. Candidato restringidos con BamH I y Hind III. Las enzimas liberan el fragmento clonado de 157pb con los sitios de unión para GRE, SP1 mutados y wt (señalado con las flechas). Candidato sin restringir y restringido en cada caso. M) marcador de 100pb.

La construcción que obtuvimos fue denominada p18/7806wt, y presenta los sitios de unión para GRE, YY1 y SP1 íntegros (Fig 12 y 13).

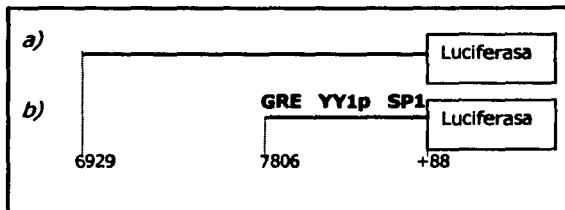


Fig 12. Construcción corta de la LCR. a) el plásmido p18URRLUC contiene el LCR completa desde el nucleótido 6929 hasta el 88 frente al gen reportero de luciferasa. b) construcción corta de la LCR, comprende desde el nucleótido 7806 hasta el 88.

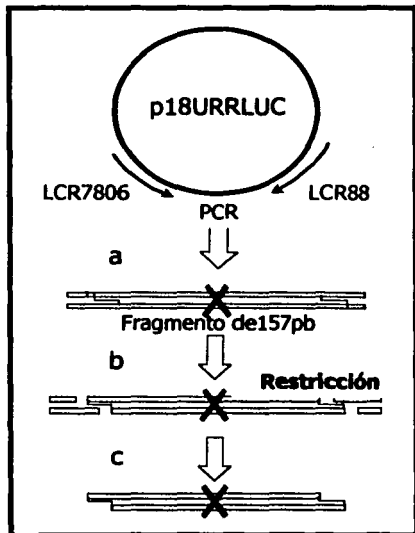


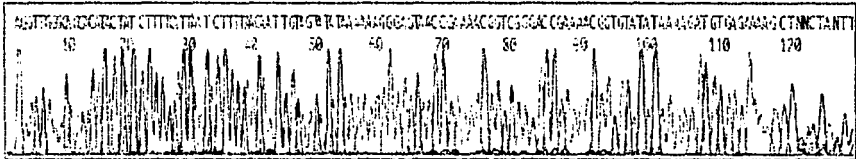
Fig 13. Estrategia experimental empleada para obtener las construcciones p18/7806GREm, p18/7806SP1m y p18/7806wt. En mezclas de PCR independientes se emplearon cada uno de los plásmidos correspondientes como templado, y los oligonucleótidos LCR7806 y LCR88. Los productos obtenidos son fragmentos de 157pb (a), estos PCR's fueron purificados a partir de gel de agarosa, de esta manera se recuperó únicamente el producto de PCR wt y los que portan la mutación. Este fragmento fue digerido con las enzimas BamH I y Hind III (b). Precedida a la restricción, los fragmentos fueron purificados (c) para después realizar la clonación en el vector base pBL.

Después de seleccionar a los candidatos que portan el fragmento, se realizó la secuenciación automática de los mismos para corroborar que no se introdujeron cambios no deseados. La secuencia obtenida de esta construcción se muestra a continuación:

5'AGGTTGGGCAGCACATACTACTTTTCATTAATACTTTTAACAATTGT
 AGTATATAAAAAAGGGAGTAACCGAAAACGGTCGGGACCGAAAACGGTGTAT
 AATAAAGATGTGAGA 3'. A continuación se muestra el electroferograma
 representativo obtenido para la secuencia wt:

Mode: 310
 Versión: 3.0
 ABI-CB: 4700
 Versión: 3.0

Sample:
 APLW100
 Well:
 Lane 1



PKA activa la transcripción de la construcción que presenta la región de control corta de HPV18

Cotransfectamos la construcción p18/7806wt junto con el plásmido PKA en células C33-A y observamos que PKA sigue presentando su comportamiento de activador (Fig 14).

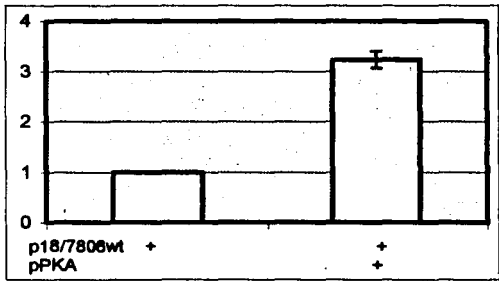


Fig 14. PKA activa la transcripción de la LCR corta. Ensayo de cotransfección de la construcción p18/7806wt (3µg) con el plásmido que codifica para PKA (500ng), donde observamos que ésta cinasa sigue activando la construcción con la LCR corta.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Puesto que PKA se encuentra activando una construcción que sólo posee sitios de unión para los factores de transcripción GRE, YY1 y SP1, decidimos realizar tres construcciones que presenten mutados cada uno de estos sitios y de esta manera determinar que factor es el responsable de la activación por PKA (Fig 15).

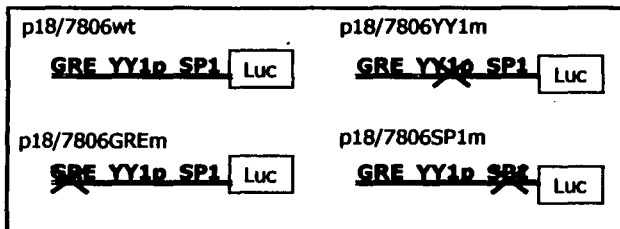


Fig 15. Construcciones mutadas de la LCR corta. Estas construcciones presentan los sitios de unión para GRE, YY1 y SP1 mutados.

Construcciones cortas de la LCR con los sitios de unión para GRE y SP1 mutados

Se siguió la misma estrategia empleada para la construcción p18/7806wt, pero los templados utilizados en este caso son los plásmidos p18GREm y p18SP1m (Fig 10 y 11). Las construcciones generadas se denominaron p18/7806GREm y p18/7806SP1m, respectivamente. La figura 13 presenta un diagrama de la estrategia empleada para la obtención de las construcciones cortas de la LCR: p18/7806wt, p18/7806GREm y p18/7806SP1:

La secuencia obtenida para la construcción p18/7806/GREm: 5'GGTTGGGCAGCggATACTATACTTTTCATTAATACTTTTAACAATTGTAGTATATAAAA AAGGGAGTAACCGAAAACGGTCGGGACCGAAAACGGTGTATATAAAAAGATGTGAGA 3'.

La secuencia obtenida de la construcción p18/7806/SP1m es la siguiente: 5'GGTTGGGCAGCACATACTATACTTTTCATTAATACTTTTAACAATTGTAGTATATAAAA AAGGGAGTgACCGAAAACGGTCGGGACCGAAAACGGTGTATATAAAAAGATGTGAGA3'.

COPIA CON
FALLA DE ORIGEN

Las bases en minúscula son los nucleótidos que cambiaron; en el resto de la secuencia no se encontraron bases alteradas.

Construcción corta de la LCR con el sitio de unión para YY1 mutado

Mediante PCR, generamos un fragmento de 114pb (Fig 16, carril 2), con los oligonucleótidos YY1pms (sentido) y LCR88 (antisentido), el templado p18URRLUC, con una temperatura de alineamiento de 35° C. Este fragmento presenta la mutación del sitio YY1 proximal en su extremo 5'. En un segundo PCR, generamos un fragmento de 75pb (Fig 16 carril 1), utilizando a los oligonucleótidos LCR7806 (sentido) y YY1pma (antisentido), con el mismo templado pero a una temperatura de alineamiento de 50° C. Este fragmento presenta la mutación del sitio de unión proximal para el factor YY1 en su extremo 3'. Ambos fragmentos presentan 30pb complementarias en el sitio de unión proximal para YY1, de tal manera que al mezclarlos forman un híbrido en sus extremos 3' (fragmento de 75pb) y 5' (fragmento de 114pb), en la región que tiene la mutación.

Los productos de los PCR's se migraron electroforéticamente en gel de agarosa y se purificaron con el Kit para extracción de DNA de Boehringer Mannheim, para utilizarlos en un tercer PCR en donde utilizamos a estos fragmentos de 114pb y 75pb como templado para generar el fragmento completo de 157pb con la mutación deseada (Fig 16 carril 3 y Fig 17)

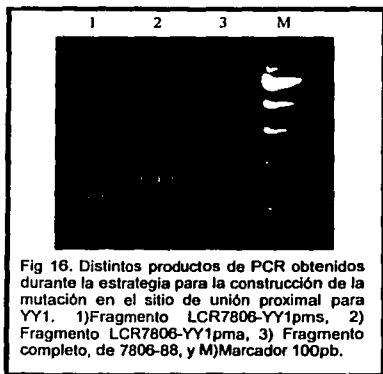


Fig 16. Distintos productos de PCR obtenidos durante la estrategia para la construcción de la mutación en el sitio de unión proximal para YY1. 1) Fragmento LCR7806-YY1pms, 2) Fragmento LCR7806-YY1pma, 3) Fragmento completo, de 7806-88, y M) Marcador 100pb.

Este tercer ensayo de PCR se dividió en dos etapas, en la primera se adicionaron todos los componentes de la mezcla de PCR, excepto los oligonucleótidos, sometándose a 10 ciclos de amplificación. Esto nos permite generar el fragmento completo, al rellenar los fragmentos sobrelapantes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

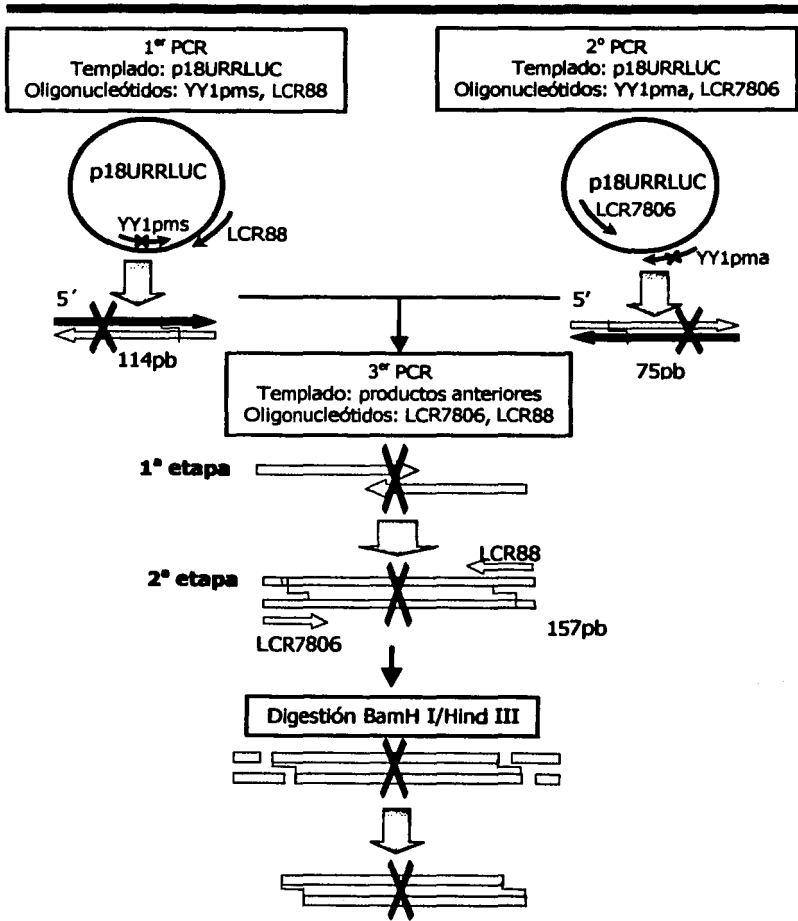


Fig 17. Estrategia experimental para generar la construcción p18/7806YY1m. En un 1^o ensayo de PCR, se utilizó al plásmido p18URRLUC como templado y a los oligonucleótidos YY1pms y LCR88 y en otra reacción (2^o PCR), a los oligonucleótidos YY1pma y LCR7806, de esta manera, se generaron fragmentos complementarios que portan la mutación en el sitio de unión proximal para YY1 de la LCR de HPV18. Además en esta región son complementarios al 100%. Ambos fragmentos fueron mezclados en un 3^o PCR con los oligonucleótidos LCR7806 y LCR88, para generar un fragmento de 157pb con la mutación deseada y con los sitios de corte para las enzimas BamH I (5') y Hind III (3'). Este fragmento, después de ser digerido (con las enzimas BamH I y Hind III) y purificado, sé clonó en el vector pBL, previamente restringido con las mismas enzimas.

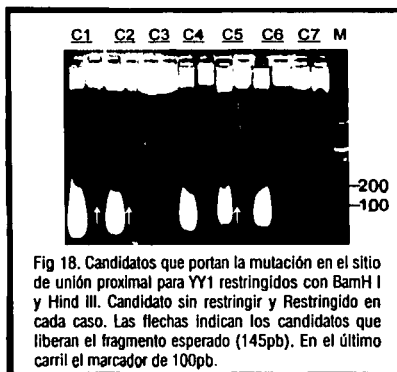
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

La temperatura de alineamiento empleada durante esta primera etapa fue de 35°C, para favorecer el empalme de las regiones complementarias de los fragmentos de 114pb y 75pb. Después, se adicionaron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos flanqueantes LCR7806 y LCR88, durante 15 ciclos más de amplificación (Fig 17).

El fragmento se purificó a partir de gel de agarosa, se digirió con las enzimas BamH I y Hind III, posteriormente se precipitó con acetato de amonio para eliminar las enzimas y poder clonar el fragmento dentro del vector pBL.

Con la mezcla de ligación se transformó a la cepa bacteriana DH5α de *E. coli*, se realizó una extracción plasmídica a partir de cultivos líquidos de las colonias candidato, y de esta manera llevar a cabo el análisis de restricción con las enzimas BamH I y Hind III, para corroborar que las clonas candidato tengan el fragmento esperado (Fig 18).

Posteriormente a los candidatos que poseen el fragmento de ~160pb, se digirieron con las enzimas EcoR I y Ase I. Como se mencionó anteriormente, la LCR wt presenta en la secuencia de unión para YY1, un sitio de corte para la enzima Ase I. Cuando generamos la mutación en el sitio de unión para YY1 se pierde el sitio de corte para esta enzima, pero se genera el sitio de corte para la enzima EcoR I. Esto nos ayudó a elegir una sola clona portadora de la mutación. A continuación se corroboró la mutación mediante la secuenciación. A esta construcción le denominamos p18/7806YY1m.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La secuencia obtenida de la construcción con la mutación en el sitio de unión proximal para YY1 (p18/7806/YY1pm), las bases en minúscula son las bases cambiadas, el resto de la secuencia no se encuentra alterada: 5'GGTTGGGCAGCACATACTATACccg~~ggg~~TgAATtCag~~cg~~AACAATTGTAGTATATAAAAA AGGGAGTAACCGAAAACGGTCGGGACCGAAAACGGTGTATATAAAAGATGTGAGA 3'.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PKA activa la transcripción de las construcciones que presentan los sitios de unión para GRE, YY1 y SP1 mutados

Cotransfectamos las construcciones p18/7806GREm, p18/7806YY1m y p18/7806SP1m, con el plásmido que codifica para PKA. Encontramos que la actividad en las tres construcciones continúa mostrando una activación en presencia de PKA (Fig 19).

Estos resultados nos sugieren que PKA no está actuando (fosforilando) directamente ninguno de estos tres factores, lo que nos hace suponer que PKA podría estar actuando sobre el coactivador CBP ("CREB binding protein") endógeno, ya que se sabe que CBP es blanco de fosforilación por PKA y actúa como una proteína puente al conectar estos factores con la maquinaria de transcripción basal (Chrivia, etal 1993), así al mutar alguno de los sitios, la unión con CBP puede estar siendo sustituida por cualquiera de los otros dos factores.

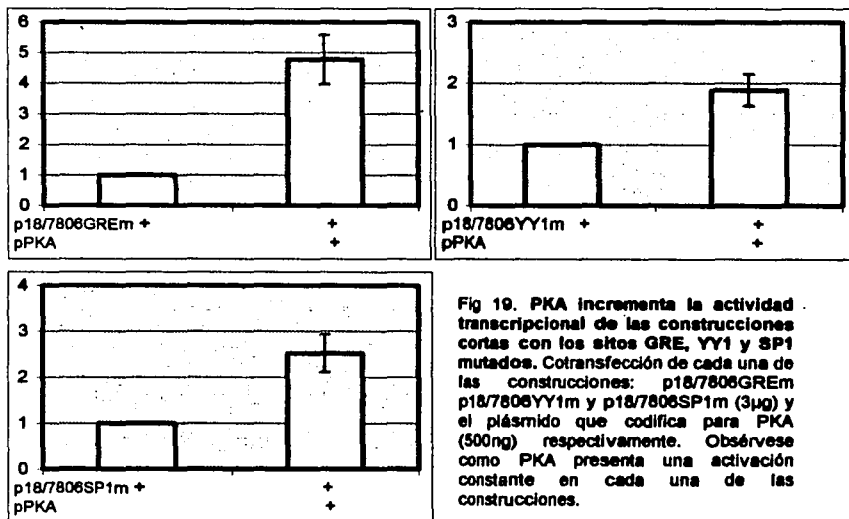


Fig 19. PKA incrementa la actividad transcripcional de las construcciones cortas con los sitios GRE, YY1 y SP1 mutados. Cotransfección de cada una de las construcciones: p18/7806GREm p18/7806YY1m y p18/7806SP1m (3µg) y el plásmido que codifica para PKA (500ng) respectivamente. Obsérvese como PKA presenta una activación constante en cada una de las construcciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PKA activa la construcción pTICRELUC

Para estudiar el posible efecto de PKA en CBP cotransfectamos la construcción pTICRELUC que sólo posee una secuencia CRE ("cAMP-response element") frente al gen reportero de luciferasa, con el plásmido pPKA en células C33-A, y observamos que PKA actúa como un activador en dicha construcción (Fig 20). Lo que nos hace suponer que PKA está actuando también sobre el CBP endógeno en este caso.

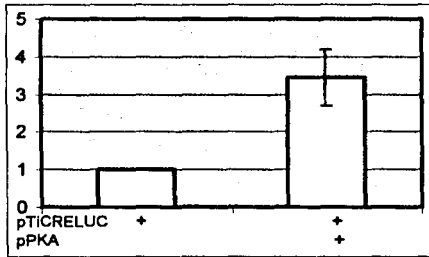


Fig 20. PKA activa la transcripción de pTICRELUC. Cotransfectamos 500ng del plásmido pTICRELUC con 500ng del plásmido pPKA. La gráfica muestra que PKA induce un incremento de aproximadamente dos veces por arriba de la basal, dónde los responsables de dicha activación probablemente sean CREB y CBP.

El factor transcripcional CREB es fosforilado directamente por la PKA (Sassone-Corsi, 1995), esta fosforilación de CREB, es necesaria para que se encuentre activa y se pueda unir a su secuencia consenso CRE, activando así la expresión de genes inducibles por CREB (Boulikas, 1995). Por otro lado CBP también es fosforilado por la vía de la PKA y consecutivamente puede interaccionar con TFIIB y factores generales de la transcripción envueltos en la actividad de la RNA polimerasa II (Kwok et al, 1994); de esta manera la fosforilación de CREB y CBP por PKA ayuda a la activación de genes con secuencias CRE (Fig 21).

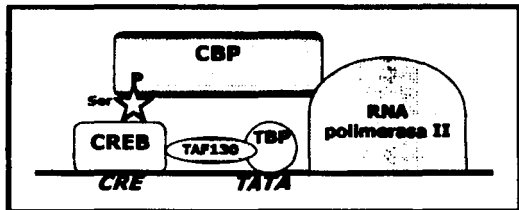


Fig 21. Activación de CREB y CBP por PKA. CBP fosforilado puede actuar como un puente entre CREB y el complejo de pre-iniciación transcripcional favoreciendo la transcripción.

Para corroborar que PKA está actuando como un activador específico, se empleó un inhibidor de cinasas, la estaurosporina. Se repitió la misma transfección y dos horas antes de la cosecha se realizaron 4 lavados con PBS 1X, se les adicionó 1ml de OPTIMEM (medio mínimo, libre de antibióticos, glutamina y suero) a las células, después de una hora se les adicionó el inhibidor (en concentraciones de 200, 500 y 1000mM) diluido en 1ml de OPTIMEM, para incubarlas 60min más y seguir con la cosecha normal (Fig 22).

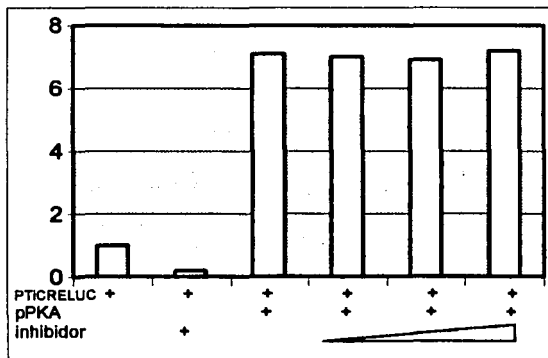


Fig 22. Activación de la transcripción de pTICRELUC por PKA en presencia de un inhibidor de cinasas. La activación por la PKA no se vió afectada aún empleando altas concentraciones de estaurosporina, no obstante la actividad basal de pTICRELUC en presencia de 1µM del inhibidor, es reprimida seguramente porque se encuentra inhibiendo otras cinasas no dependientes de PKA que probablemente estén repercutiendo sobre la maquinaria de transcripción basal.

El inhibidor no tuvo efecto alguno, probablemente porque la estaurosporina no es un inhibidor específico de PKA o probablemente su mecanismo de inhibición no es mediado por la subunidad alfa de la PKA (el plásmido que empleamos para las transfecciones codifica para ésta).

Debido a que el inhibidor no presentó el efecto que esperábamos se decidió emplear un competidor, pTiCRECAT, éste plásmido es el análogo de pTiCRELUC, a diferencia de que el primero cuenta con el gen reportero de CAT en lugar del reportero de luciferasa. Para ello se cotransfectó el plásmido pTiCRELUC y el plásmido pPKA en presencia de distintas concentraciones de pTiCRECAT (250, 500 y 1000ng), y observamos que ni aún con la concentración máxima de pTiCRECAT (1µg) se obtuvo una represión total (Fig 23).

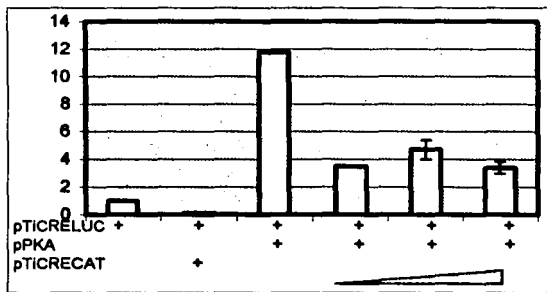


Fig 23. Efecto de PKA sobre la actividad transcripcional de pTiCRELUC en presencia de diferentes concentraciones de pTiCRECAT. pTiCRECAT se encuentra compitiendo por los mismos factores de transcripción empleados por pTiCRELUC.

Se esperaba que la actividad disminuyera hasta la basal o por debajo de esta. Posiblemente existen algunos factores que una vez que son fosforilados por PKA se unen a el promotor y no se vuelven a separar, existiendo una fuerte afinidad cuando son fosforilados, quizás por ese motivo la concentración máxima de pTiCRECAT no logra abatir al 100% la activación que ejerce PKA.

FALLA DE ORIGEN

pTICRECAT compete por CBP en la activación de p18/7806wt

Analizamos directamente el efecto del competidor sobre la construcción que presenta la LCR corta. Para lo cual cotransfectamos el plásmido p18/7806wt (3 μ g) con el plásmido pPKA (500ng) en presencia de concentraciones crecientes de pTICRECAT (1 μ g, 3 μ g y 5 μ g), y los resultados nos muestran que pTICRECAT se halla compitiendo por los mismos factores necesarios para la activación de p18/7806wt, es decir, por CBP (Fig 24).

El coactivador CBP es una fosfoproteína cuya actividad de unión a la proteína CREB es estimulada por la acción de la PKA y los niveles de esta proteína son regulados por el AMPc en respuestas a señales mitogénicas. Es así como la fosforilación de CREB y CBP incrementa su capacidad de interactuar (Swope et al, 1996).

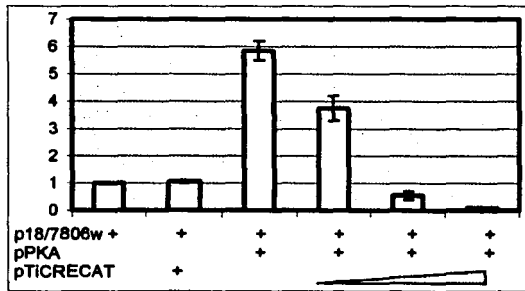


Fig 24. Efecto de PKA sobre la actividad transcripcional de la LCR corta en presencia de un competidor. Ensayo de cotransfección del plásmido p18/7806wt y el plásmido pPKA con concentraciones crecientes de pTICRECAT. Obsérvese como pTICRECAT está actuando como un competidor.

DISCUSIÓN

El carcinoma cervical es uno de los tumores que más comúnmente afectan a las mujeres en todo el mundo. Estos tumores se asocian con la presencia de algunos tipos específicos de papilomavirus humano, como los tipos 16, 18, 33 y 42. Los genes virales que participan en la transformación celular son E6 y E7, y en la regulación de su expresión participan una variedad de factores celulares, algunos de los cuales son regulados por eventos de fosforilación.

Nuestros resultados indican que la sobreexpresión exógena de la subunidad catalítica de la PKA, activa la transcripción del promotor p105 de HPV18 al cotransfectar ambos plásmidos en la línea celular C33-A. Este incremento en la actividad del promotor viral por la expresión de PKA, la observamos también cuando evaluamos el promotor mínimo (p18/7806wt) de HPV18 el cual contiene únicamente sitios de unión para los factores transcripcionales GRE, YY1 y SP1.

La activación de la transcripción del promotor inducida por PKA, no parece estar directamente relacionada con la unión de alguno de los factores de transcripción (GRE, YY1 y SP1) a sus sitios blanco en el promotor p105, ya que aquellas construcciones del promotor p105 de HPV18 en las que se realizó la mutagénesis de los sitios de unión a cada uno de estos factores, mostraron una activación similar por PKA.

Estos resultados podrían explicarse considerando que la fosforilación de los factores GRE, YY1 y SP1 por la vía de PKA, no es suficiente para inducir la actividad transcripcional de promotores que poseen sitios de unión para estos factores, o bien que PKA en nuestro sistema particularmente no se encuentra fosforilando de manera directa a ninguno de estos factores (aunque los tres son blanco de fosforilación por la vía de la PKA).

Existen reportes sobre la modulación de la actividad transcripcional del receptor de glucocorticoides por la proteína cinasa A y genes que tienen secuencias GRE se ven afectados por esta cinasa (Christoffels et al, 1998; Massaad et al, 1999).

De igual manera, Rohlf y colaboradores en 1997 encontraron que la función del factor de transcripción SP1 responde a niveles de AMP cíclico el cual puede ser activado en respuesta a un estímulo mitogénico como el suero presente en el medio de cultivo de las células, y consecuentemente los genes dependientes de SP1 pueden ser estimulados por la vía de señalización de la PKA. Por otra parte YY1 es un factor de transcripción multifuncional implicado en la regulación positiva y negativa del HPV18 así como en la iniciación de la transcripción, y al parecer la actividad de este factor esta regulada también por eventos de fosforilación que incluyen la PKA entre otros (Goldman et al, 1997).

Cualquier promotor que posee sitios de unión a factores de transcripción que son regulados por PKA, requiere además de la fosforilación del mismo factor, de la participación de alguno de los coactivadores celulares como CBP y p300, los cuales actúan como proteínas puente comunicando la maquinaria transcripcional basal con factores de transcripción sitio específicos.

Los coactivadores CBP/p300 son fosfoproteínas cuya actividad de unión a factores sitio específicos (de los cuales CREB es prototipo), es estimulada por la acción de la PKA y los niveles de esta proteína son regulados por el AMPc en respuesta a señales mitogénicas (Mayr & Montminy, 2001). Esto nos hace suponer que en células epiteliales como las cervicales las cuales mantienen una tasa alta de replicación, la expresión de genes regulados por PKA es un proceso muy común (Shen, 1998).

Estos cofactores al ser fosforilados por la vía de la PKA son capaces de interactuar con los factores de transcripción GRE, YY1 y SP1 (Gouilleux, 1999; Shetty et al, 1997; Galvin & Shi, 1997).

Al cotransfectar la construcción pTICRELUC que sólo posee una secuencia CRE ("cAMP-response element") frente al gen reportero de luciferasa, con el plásmido pPKA en células C33-A, observamos que PKA actúa como un activador en dicha construcción.

Esta activación se debe a que la fosforilación de CREB y CBP por la subunidad catalítica de la PKA, induce su interacción con la maquinaria transcripcional basal, promoviendo la iniciación de la transcripción de cualquier gen con secuencias CRE. De la misma forma, la fosforilación de CBP/p300 endógeno por PKA puede estar favoreciendo la activación del promotor mínimo de HPV18, ya que cada una de las construcciones en las cuales se mutó el sitio de unión para un factor de transcripción específico, aun posee los restantes sitios de interacción para los otros factores de transcripción.

Por todo lo anterior podemos concluir que PKA activa la transcripción del promotor p105 de HPV18 en la línea celular C33-A, asimismo PKA produce un incremento en la actividad transcripcional del promotor mínimo (p18/7806wt) de HPV18.

La activación que ejerce PKA sobre la construcción que presenta la LCR corta (p18/7806wt) que tiene los sitios de unión para los factores de transcripción GRE, YY1 y SP1 no depende de la fosforilación de dichos factores, sino involucra cofactores como CBP y p300, los cuales al ser fosforilados benefician la comunicación entre los factores de transcripción GRE, YY1 y SP1 con la maquinaria transcripcional basal, así dicha unión estimulada por la acción de la PKA favorece la activación del promotor mínimo de HPV18.

CONCLUSIONES

- * La PKA activa la transcripción del promotor p105 de HPV18.
- * La PKA es capaz de activar la transcripción del promotor mínimo de HPV18 el cual posee únicamente sitios de unión para los factores transcripcionales GRE, YY1 y SP1. Dicha activación no se encuentra relacionada con la presencia exclusiva de alguno de los sitios de unión para estos factores transcripcionales.
- * La PKA incrementa la actividad de unión de CBP/p300 a diversos factores de transcripción, lo que nos lleva a proponer que la activación ejercida por PKA en HPV18 es mediada por la fosforilación de CBP/p300 la cual una vez activada, se une a los factores de transcripción sitio específico y a la maquinaria transcripcional basal, activando la transcripción.

REFERENCIAS

Bauknecht T., Angel P., Royer H.D. & zur Hausen H.A. 1992. **Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1.** EMBO J, 11(12):4607-17.

Bauknecht T., Jundt F., Herr I., Oehler T., Delius H., Shi Y., Angel P. & zur Hausen H.A. 1995. **A switch region determines the cell type-specific positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter.** J Virol, 69(1):1-12.

Bauknecht T., See R.H. & Shi Y. 1996. **A novel C/EBP -YY1 complex controls the cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region.** J Virol, 70(11):7695-705.

Boulikas T. 1995. **Phosphorylation of transcription factors and control of the cell cycle.** Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 5(1):1-77.

Burns T.F. & El-Deiry W.S. 1999. **The p53 pathway and apoptosis.** J Cell Physiol, 181(2):231-9.

Butz K. & Hoppe-Sejler F. 1993. **Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region.** J Virol, 67(11):6476-86.

Christoffels V.M., Grange T., Kaestner K.H., Cole T.J., Darlington G.J., Croniger C.M. & Lamers W.H. 1998. **Glucocorticoid receptor, C/EBP, HNF3, and protein kinase A coordinately activate the glucocorticoid response unit of the carbamoylphosphate synthetase I gene.** Mol Cell Biol, 18(11):6305-15.

Chrivia J.C., Kwok R.P., Lamb N., Hagiwara M., Montminy M.R. & Goodman R.H. 1993. **Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP.** Nature, 365(6449): 855-59.

Conger K.L., Liu J.S., Kuo S.R., Chow L.T. & Wang T.S. 1999. **Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase.** J Biol Chem, 274(5):2696-705.

Crum P.C. & McLachlin M.C. 1995. **Cervical intraepithelial neoplasia.** J Cell Bio Supp, 23:71-79.

Danos O., Katinka M. & Yaniv M. 1982. **Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae.** EMBO J, 1(2):231-236

Dyson N., Howley P.M., Münger K. & Harlow E. 1989. **The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product.** Science, 243(4893): 934-37.

Eckner R. 1996. **p300 and CBP as transcriptional regulators and targets of oncogenic events.** Biol Chem, 377(11):685-8.

Galvin K.M. & Shi Y. 1997. **Multiple mechanisms of transcriptional repression by YY1.** Mol Cell Biol, 17(7):3723-32.

Giles R.H., Peter D.J. & Brauning H. 1998. **Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease.** TIG, 14(5): 178-83.

Giordano A. & Avantaggiati M.L. 1999. **p300 and CBP: partners for life and death.** J Cell Physiol, 181:218-30.

Gius D., Grossman S., Bedell M.A. & Laimins L.A. 1988. **Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18.** J Virol, 62(3): 665-672.

Goldman P.S., Tran V.K. & Goodman R.H. 1997. **The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation.** Recent Prog Horm Res, 52:103-19; discussion 119-20.

Gouilleux F. 1999. **Interactions entre récepteur des glucocorticostéroïdes et facteurs de transcription.** J Soc Biol, 193 (4): 369-73.

Hoppe-Seyler F., Butz K. & zur Hausen H.H. 1991. **Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1.** J Virol, 65(10):5613-18.

Hoppe-Seyler F. & Butz K. 1992. **Activation of human papillomavirus type 18 E6-E7 oncogene expression by transcription factor Sp1.** Nucleic Acids Res, 20(24):6701-06.

Kamei Y., Xu L., Heinzel T., Tochia J., Kurokawa R., Gloss B., Lin S-C., Heyman R.A., Rose D.W., Glass C.K. & Rosenfeld M.G. 1996. **A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP1 inhibition by nuclear receptors.** Cell, 85: 403-14.

Koss L.G. 1987. Cytologic and histologic manifestation of human papillomavirus infection of the female genital tract and their clinical significance. Cancer, 60:1942-50.

Kwok R.P.S., Lundblad J.R., Chrivia J.C., Richards J.P., Bächinger H.P., Brennan R.G., Roberts S.G.E., Green M.R. & Goodman R.H. 1994. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. Nature, 370:223-6.

Laimins L.A. 1993. The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer. Infectious Agents and Disease, 2(2): 74-86.

Liu Y-Z., Chrivia C.J. & Latchman S.D. 1998. Nerve growth factor up-regulates the transcriptional activity of CBP through activation of the p42/p44^{MAPK} cascade. J Biol Chem, 273 (49): 32400-07.

Mack D.H., & Laimins L.A. 1991. A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP-1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA, 88: 9102-06.

Mansur P.C. & Androphy J.E. 1993. Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. B B Acta, 1155: 323-45.

Massaad C., Houard N., Lombes M. & Barouki R. 1999. Modulation of human mineralocorticoid receptor function by protein kinase A. Mol Endocrinol, 13(1):57-65.

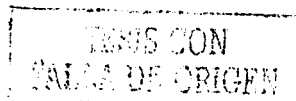
Mayr B. & Montminy M. 2001. Transcription regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. Nat Rev Mol Cell Bio, 2:599-608.

Medina-Martinez O., Morales-Peza N., Yaniv M., Garcia-Carranca A. & Thierry F. 1996. A single element mediates glucocorticoid hormone response of HPV18 with no functional interactions with AP1 or hbm. Virology, 217(1): 392-96.

Mohr I.J., Clark R., Sun S., Androphy E.J., MacPherson P. & Botchan M.R. 1990. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. Science, 250(4988):1694-99.

Münger K., Phelps W.C., Bubbs 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. J Virol, 63(10): 4417-21.

Münger K. 1995. The molecular biology of cervical cancer. J Cell Biochem Suppl, 23:55-60.



Parker D., Ferreri K., Nakajima T., LaMorte V.J., Evans R., Koerber S.C., Hoeger C. & Montminy M.R. 1996. **Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism.** *Mol Cell Biol*, 16(2):694-703.

Pim D., Collins M. & Banks L. 1992. **Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor.** *Oncogene*, 7(1):27-32.

Rohlf C., Ahmad S., Borellini F., Lei J. & Glazer R.I. 1997. **Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase.** *J Biol Chem*, 272(34):21137-41.

Sassone-Corsi P., Ransone L.J. & Verma I.M. 1990. **Cross-talk in signal transduction: TPA-inducible factor jun/AP-1 activates cAMP-responsive enhancer elements.** *Oncogene*, 5(3):427-31.

Sassone-Corsi P. 1995. **Transcription factors responsive to cAMP.** *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11:355-77.

Sassone-Corsi P. 1998. **Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM.** *Bioch & Cell Biol*, 30:27-38.

Sassone-Corsi P. 2000. **CREM: a master-switch regulating the balance between differentiation and apoptosis in male germ cells.** *Mol Reprod Dev* 2000 Jun;56(2 Suppl):228-9.

Scheffner M., Werness B.A., Huibregtse J.M., Levine A.J. & Howley P.M. 1990. **The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53.** *Cell*, 63(6): 1129-36.

Scheffner M., Huibregtse J.M., Vierstra R.D. & Howley P.M. 1993. **The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53.** *Cell*, 75(3): 495-505.

Schiller J.T., Vass W.C., Vousden K.H. & Lowy D.R. 1986. **E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene.** *J Virol*, Jan;57(1):1-6.

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*, 314(6006): 111-14.

Shen M.R., Chou C.Y., Wu M.L. & Huang K.E. 1998. **Differential osmosensing signalling pathways and G-protein involvement in human cervical cells with different tumour potential.** *Cell Signal*, Feb;10(2):113-20.

Shetty S., Takahashi T., Matsui H., Ayengar R. & Raghov R. 1999. **Transcriptional autorepression of Max1 gene is mediated by interactions of Max1 protein with a multi-protein transcriptional complex containing TATA-binding protein, Sp1 and cAMP-response-element-binding protein-binding protein (CBP/p300).** Biochem J, 339 (Pt 3):751-8.

Shirasawa H., Tomita Y., Kubota K., Kasai T., Sekiya S., Takamizawa H. & Simizu B. 1988. **Transcriptional differences of the human papillomavirus type 16 genome between precancerous lesions and invasive carcinomas.** J Virol, 62(3): 1022-27.

Song S., Pitot H.C. & Lambert P.F. 1999. **The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals.** J Virol, 73(7):5887-93.

Spence R.P., Murray A., Banks L., Kelland L.R. & Crawford L. 1988. **Analysis of human papillomavirus sequences in cell lines recently derived from cervical cancers.** Cancer Res, 48(2): 324-28.

SSA: <http://www.ssa.gob.mx>

Swope D.L., Mueller C.H.L. & Chrivia J.C. 1996. **CREB-binding protein activates transcription through multiple domains.** J Biol Chem, 271 (45): 28138-45.

Thierry F., Spyrou G., Yaniv M. & Howley P. 1992. **Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes.** J Virol, 66(6):3740-48.

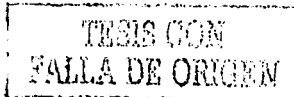
Tommasino M. & Crawford L. 1995. **Human papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle.** Bioessays, 17(6): 509-18.

van der Eb A.J. & Graham F.L. 1980. **Assay of transforming activity of tumor virus DNA.** Methods Enzymol, 65(1):826-39.

Vo N. & Goodman R.H. 2001. **CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation.** J Biol Chem, 276(17):13505-8.

Vousden K. 1993. **Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes.** J. FASEB, 7: 872-79.

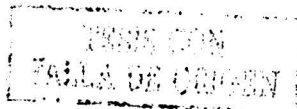
Werness B.A., Levine A.J. & Howley P.M. 1990. **Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53.** Science, 248(4951): 76-79.



zur Hausen H. 1991. **Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer.** Virology, 184 (1): 9-13.

zur Hausen H. & de Villiers E.M. 1994. **Human papillomaviruses.** Ann Rev Microbiol, 48: 427-447.

zur Hausen H. 1996. **Papillomavirus infections a major cause of human cancers.** Biochim Biophys Acta 1288(2):F55-78.



**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**