

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“MECANISMO MOLECULAR DE LA INDUCCION DE LA EXPRESION
GENICA DE TGF-BETA-1 EN CELULAS TRANSFORMADAS CON EL
VIRUS DE PAPILOMA HUMANO”**

TESIS DE DOCTORADO
AREA INMUNOLOGIA

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

P R E S E N T A

M. en C. OSCAR PERALTA ZARAGOZA

DIRECTOR DE TESIS
DR. VICENTE MADRID MARINA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PUBLICA



Universidad Nacional
Autónoma de México

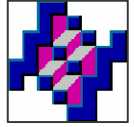


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



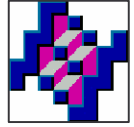
DEDICATORIA

A mi esposa CLAUDIA GÓMEZ CERÓN de Peralta, por su entusiasta motivación y su constante apoyo en la realización de éste trabajo, así como en mi vida personal y profesional, mil gracias.

A HILDA MARGARITA ZARAGOZA MUÑOZ, con el afecto, gratitud y admiración que siento hacia ella, por sus enseñanzas, espíritu incansable y por su confianza en mí; gracias por ser mi madre.

A mis hermanos: JOAQUÍN PERALTA ZARAGOZA, ALEJANDRO PERALTA ZARAGOZA, ARMANDO PERALTA ZARAGOZA, DAVID PERALTA ZARAGOZA Y MARIO PERALTA ZARAGOZA, así como a sus respectivas familias; que sin el regalo incondicional de su apoyo y amor que de ellos recibo, posiblemente nunca hubiera perseverado en mi esfuerzo.

A todas aquellas personas que de alguna manera influyeron en mi vida, muchas gracias.



AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS

Le doy gracias a Dios y a la vida por haberme brindado la oportunidad de existir en este momento, en este espacio y en éste tiempo.

De manera muy especial le expreso mis más sinceros y profundos agradecimientos a mi Maestro, Amigo y Guía: Dr. VICENTE MADRID MARINA, ya que de no haber sido por el cuidadoso esmero que puso en mi formación, así como por sus valiosas sugerencias, sus comentarios, por su apreciable afecto, pero sobre todo por su excelente calidad humana; la realización de esta tesis doctoral, no hubiera podido llegar a su conclusión. Así mismo del agradezco a todos los miembros del Laboratorio 4 planta baja del CISEI-INSP.

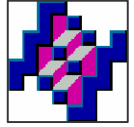
Agradezco al Dr. Félix Recillas Targa por sus valiosas sugerencias, así como por su apoyo incondicional y por su amistad que me brindó durante el desarrollo de esta tesis y en mi vida.

Les expreso mis agradecimientos a los Drs. Fernando Esquivel Guadarrama y Joaquín Sánchez Castillo por sus valiosas sugerencias en la corrección de los manuscritos.

Agradezco de igual manera a cada uno de los miembros del jurado de tesis: Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet, Dr. Vicente Madrid Marina, Dr. Jaime Berumen Campos, Dr. Alfonso Dueñas González, Dr. Jesús Chimal Monroy, Dra. Marcela Lizano Soberón y Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdes. Así como al Dr. Juan Manuel Alcocer González, Dr. Patricio Gariglio Vidal y Dra. Lourdes Gutiérrez Xicotencatl, por sus valiosas recomendaciones para esta tesis.

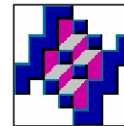
No quisiera omitir mis agradecimientos a todas y cada una de las personas que me brindaron su apoyo de alguna u otra manera y que fueron decisivas en algún momento durante la realización de esta tesis y de mi vida. A todas ellas y sin excepción alguna, muchas gracias.

Finalmente le agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por haberme permitido incorporarme a un programa de postgrado de excelencia (Doctorado en Ciencias Biomédicas). Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento obtenido con número de expediente 1018-M9111, y por la obtención de una beca de postgrado para Doctorado con número de expediente 117983. Al Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) por brindarme los apoyos en infraestructura e instalaciones, así como por los financiamientos para la realización de la presente tesis. Al Sistema Nacional de Investigadores (SNI) por haberme brindado el nombramiento de candidato a investigador.



JURADO DE EXAMEN DE GRADO

PRESIDENTE: DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET
SECRETARIO: DR. VICENTE MADRID MARINA
VOCAL: DR. JAIME BERUMEN CAMPOS
VOCAL: DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ
VOCAL: DR. JESÚS CHIMAL MONROY
VOCAL: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
VOCAL: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDES

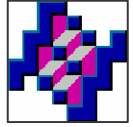


CONTENIDO

TEMA	PAGINA
I. ABREVIATURAS Y PALABRAS CLAVE	8
II. RESUMEN	9
III. ABSTRACT	10
IV. INTRODUCCION	14
V. ANTECEDENTES	12
V.1. Cáncer cérvico uterino y HPV	12
V.2. Ciclo viral del HPV	18
V.3. Respuesta inmune contra la infección por HPV	20
V.4. TGF- β 1 y la respuesta inmune anti-tumoral	26
V.5. Estructura y mecanismos de acción de TGF- β 1	29
V.6. Control del ciclo celular por TGF- β 1	36
V.7. Caracterización del promotor del gen humano de TGF- β 1	40
V.8. Regulación génica de TGF- β 1	42
V.9. Trans-regulación de genes por las oncoproteínas de HPV	44
VI. JUSTIFICACION	46
VII. HIPOTESIS	47
VIII. OBJETIVOS	48
VIII.1. Objetivo General	48
VIII.2. Objetivos Específicos.....	48
IX. METODOLOGIA	49



IX.1. Células y condiciones de cultivo	49
IX.2. Ensayo de ELISA.....	49
IX.3. Amplificación de la región reguladora 5' de TGF- β 1 por PCR	49
IX.4. Análisis por RT-PCR semicuantitativo	50
IX.5. Estrategia de clonación y construcciones de plásmidos	50
IX.6. Transfección de DNA y experimentos de CAT	52
IX.7. Ensayos de DNasa y de Footprinting	52
IX.8. Análisis de electroforesis con movilidad retardada (EMSA)	54
X. RESULTADOS	58
X.1. Expresión de TGF- β 1 humano en células transformadas con HPV	58
X.2. Obtención de la región promotora del gen humano de TGF- β 1	58
X.3. Regulación de la actividad del promotor del gen humano de TGF- β 1 por los productos de los oncogenes E6 y E7 de HPV-16	69
X.4. Identificación de los elementos reguladores en el promotor del gen humano de TGF- β 1 responsables de la trans-activación por E6 y E7 de HPV-16	82
X.5. Una secuencia de reconocimiento específica para Sp1 es crítica para el mecanismo de trans-activación del promotor del gen humano de TGF- β 1 por E6 y E7 de HPV-16	89
X.6. Las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 interactúan <i>in vitro</i> con la secuencia de reconocimiento para Sp1e en el promotor del gen humano de TGF- β 1	92
XI. DISCUSION	97
XII. CONCLUSIONES	102
XIII. PERSPECTIVAS	103
XIV. AGRADECIMIENTOS	104



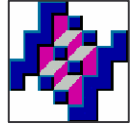
XV. REFERENCIAS	105
XVI. ANEXOS	116

PUBLICACIONES GENERADAS COMO PRODUCTOS DE LA REALIZACION DE LA PRESENTE TESIS

1). **Peralta-Zaragoza O**, Martínez Lagunas A, Madrid Marina V. TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA-1: STRUCTURE, FUNCTION AND REGULATION MECHANISMS IN CANCER. Revista Salud Pública de México. 43(4): 340-351; 2001.

2). **Peralta-Zaragoza O**, Bermúdez-Morales VH, Gutiérrez-Xicotencatl L, Alcocer-González JM, Recillas-Targa F, Madrid Marina V. TGF- β 1 PROMOTER IS TRANS-ACTIVATED BY HPV-16 E6 AND E7 ONCOPROTEINS. Immunology. 453-457; 2004.

3). **Peralta-Zaragoza O**, Bermúdez-Morales VH, A, Gutiérrez-Xicotencatl L, Alcocer-González JM, Recillas-Targa F, Madrid-Marina V. E6 AND E7 ONCOPROTEINS FROM HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 INDUCE ACTIVATION OF HUMAN TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA-1 PROMOTER THROUGHOUT Sp1 REGULATORY ELEMENT. Viral Immunology. 2006 (Aceptado).

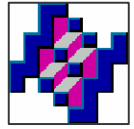


I. ABREVIATURAS

5'-UTR:	Región 5' no traducida (Untranslation).
AP-1.	Factor de transcripción y secuencia de unión para el factor de transcripción AP-1 (Activation Protein 1).
ATCC:	American Type Culture Cells.
CAT:	Gen reportero de cloranfenicol acetil transferasa.
Células NK:	Células asesinas naturales (Natural Killer).
Cdk:	Cinasas dependientes de ciclinas (Cyclin dependent kinases).
CMNSP:	Células Mononucleares de Sangre Periférica.
DEPC:	Dietilpirocarbonato.
EGFR:	Receptor para el factor de crecimiento epitelial (Epithelial Growth Factor Receptor).
EMSA:	Ensayo de electroforesis con movilidad retardada (Electrophoresis Mobility Shifting Assay).
Genes E:	Genes de activación transcripcional temprana (Erly) de HPV.
Genes L:	Genes de activación transcripcional tardía (Late) de HPC.
HAT:	Proteínas con actividad de acetilación de histonas (Histone Acetyl Transferase).
HDACs :	Proteína con actividad de desacetilación de histonas (Histone Deacetilases).
HPV:	Virus del papiloma humano (Human Papilloma Virus).
IARC:	Agencia internacional para la investigación en cáncer (International Agency for Research on Cancer).
Kips:	Proteínas inhibidoras de cdk (Cdk inhibitor proteins).
LAP:	Proteína asociada a latencia (Latency Association Protein) de TGF- β 1.
LCR:	Región larga de control (Long Control Region) del genoma de HPV.
MH:	Dominio Mad Homology.
p53:	Gen que codifica para la proteína celular supresora de tumores p53.
p300/CBP:	Proteína de unión al AMPc de 300 kDa (cAMP Binding Protein).
PAGE:	Gel de electroforesis de poliacrilamida (Polyacrylamide Gel Electrophoresis).
pRb:	Gene que codifica para la proteína celular supresora de tumores de retinoblastoma.
SBE:	Elemento de unión a Smad (Smad Binding Element).
Smad:	Proteínas similares a Mad (Similar Mad) transductoras de señal inducidas por TGF- β 1.
Sp1:	Factor de transcripción y secuencia de unión para el factor de transcripción Sp1 (Stimulation protein 1).
TGF-β1:	Factor de crecimiento transformante beta 1 (Transforming Growth Factor beta 1).
TRAF:	Factores asociados de respuesta a TNF (TNF Response Association Factors).
TRE:	Elementos de respuesta a TPA (TPA Response Element).

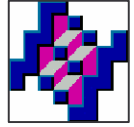
PALABRAS CLAVE

Cáncer cervical, HPV, Oncogene E6, Oncogene E7, Sp1, TGF-beta-1



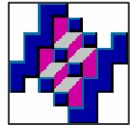
II. RESUMEN

El HPV representa el principal agente etiológico en el desarrollo del cáncer cervical, y los oncogenes E6 y E7 participan en la transformación e inmortalización celular, y pueden trans-regular la expresión de genes celulares e influir en la evolución del proceso neoplásico. Existe una relación entre la expresión de TGF-beta-1 y el desarrollo del cáncer cervical, sin embargo los mecanismos por los cuales el HPV influye en la expresión de TGF-beta-1 aun no se conocen. Por tal motivo, en el presente estudio se analizó si las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 están involucradas en la expresión génica de TGF-beta-1 en células cervicales tumorales. Por lo tanto, se generaron construcciones de plásmidos con lesiones progresivas del promotor de TGF-beta-1 con las que se transfectaron en células C33A (HPV-) y se co-transfectaron con los plásmidos pSV2E6 y pSV2E7. Los resultados obtenidos indican que E6 y E7 inducen la actividad del promotor central de TGF-beta-1. El análisis de interacción DNA-proteína demostró que la secuencia Sp1e del promotor de TGF-beta-1 participa en la formación de complejos DNA-proteína específicos asociados a las oncoproteínas E6 y E7. El análisis mutacional de la secuencia Sp1e reveló que esta secuencia elimina la trans-activación del promotor central de TGF-beta-1 inducido por las oncoproteínas E6 y E7. Estos resultados sugieren que en el mecanismo de trans-activación del promotor de TGF-beta-1 inducido por E6 y E7 de HPV-16 hay una interacción física y una cooperación funcional entre las oncoproteínas virales y el elemento regulador Sp1e del promotor central de TGF-beta-1; lo cual puede explicar la contribución de las oncoproteínas de HPV-16 en la expresión de TGF-beta-1, y explicar parte de los mecanismos de escape de la respuesta inmune anti-tumoral durante el desarrollo del cáncer cervical.



III. ABSTRACT

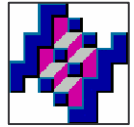
HPV infection represents the main etiologic agent in cervical cancer development and HPV E6 and E7 oncogenes are involved in cell transformation and immortalización, and they may trans-regulate the cellular genes to influence the evolution of the neoplastic process. An association between TGF-beta-1 gene expression and cervical cancer development has been suggested, however the mechanisms by which HPV influences TGF-beta-1 gene expression remains unclear. For this reason, in the present study we analyzed the mechanism throughout HPV-16 E6 and E7 oncoproteins regulate TGF-beta-1 promoter in cervical tumor cells. Thus, we generate several plasmid constructs with progressive deletions of TGF-beta-1 promoter which were transfected in C33A cells (HPV-) and were co-transfected with pSV2E6 and pSV2E7 plasmids. Our results showed that E6 and E7 oncoproteins increased TGF-beta-1 core promoter activity. Furthermore, we identified specific DNA sequence motif in TGF-beta-1 core promoter responsible for trans-activation which corresponds to Sp1e binding site associated to HPV-16 E6 and E7 oncoproteins. Mutational analysis showed that Sp1e recognition site abolished the trans-activation caused by E6 and E7. These results suggest that in the trans-activation mechanism of TGF-beta-1 promoter induced by HPV-16 E6 and E7 oncoproteins there is a physical interaction and functional cooperation between viral oncoproteins and Sp1e regulatory element of TGF-beta-1 central promoter. This could explain the contribution of HPV-16 oncoproteins in TGF-beta-1 gene expression, and part of escape mechanisms of anti-tumoral immune response during cervical cancer development.



IV. INTRODUCCION

El estudio del proceso neoplásico se ha enfocado al análisis de los mecanismos de transformación e immortalización celular y ambos eventos involucran la desregulación de la expresión de genes, ya sea por mutaciones o por interacciones con proteínas virales, como es el caso de la infección por el virus de papiloma humano (HPV Human Papilloma Virus) en el cáncer cérvico uterino [1]. Una característica de las células tumorales es su capacidad para proseguir con el ciclo celular de manera independiente del control del organismo hospedero. En esta proliferación celular autónoma participan genes que codifican para la producción autócrina de factores de crecimiento mitogénicos, genes para la expresión de receptores a factores de crecimiento, y genes involucrados en la biosíntesis de intermediarios en las vías de transducción de señales. Sin embargo, la activación de las vías mitogénicas en el proceso tumoral no es suficiente para la transformación neoplásica completa. También están involucradas señales de control negativo, que limitan la expansión clonal de las células tumorales y protegen al organismo de la proliferación desregulada de las células neoplásicas [2]. En condiciones normales, el factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1 Transforming Growth Factor beta-1) es una citocina que regula la homeostasis celular y participa en el control del ciclo celular. La desregulación de la expresión génica de TGF- β 1 por mecanismos endógenos propios del proceso neoplásico, podría contribuir a la pérdida del control del ciclo celular regulado por TGF- β 1 y favorecer las condiciones para el desarrollo de las células cancerosas.

En el cáncer cérvico uterino, la infección por HPV es considerada como el principal agente etiológico de la enfermedad, y se han realizado amplios estudios en el análisis de las funciones oncogénicas de las oncoproteínas virales E6 y E7 [3-7]. Las actividades tumorogénicas de E6 y E7 son promovidas por su asociación con las proteínas celulares supresoras de tumores p53 y pRb principalmente [8]. Adicionalmente, E6 y E7 pueden trans-regular la expresión de genes celulares y contribuir al avance de la célula tumoral [9-12]. Hay evidencias que sugieren que TGF- β 1 tiene una importante función en el proceso de carcinogénesis [13]. En este sentido, se ha reportado una estrecha asociación entre la expresión de TGF- β 1 y el desarrollo del cáncer cérvico uterino [14-16]. Además, también se han evidenciado alteraciones en la expresión de otros miembros de la familia de TGF- β en células de cáncer cervical infectadas con HPV-16 [16]. Sin embargo, hasta este momento no se



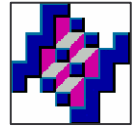
conocen exactamente cuales son los mecanismos que participan en los eventos de regulación de la expresión del gen de TGF- β 1 en las células infectadas por HPV.

Por tal motivo, en el presente estudio se analizaron los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de regulación de la expresión del gen humano de TGF- β 1, mediado por los oncogenes E6 y E7 de HPV-16, en células cervicales tumorales humanas. Los resultados obtenidos sugieren que E6 y E7 de HPV-16 influyen en la expresión del gen de TGF- β 1 por un mecanismo de tras-activación a través de una secuencia de DNA de unión para el factor de transcripción Sp1 presente en el promotor central de TGF- β 1. Además, este efecto funcional de trans-activación fue verificado por el análisis de interacción DNA-proteína en el promotor central de TGF- β 1. Los resultados obtenidos confirman el hecho de la interacción de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 con secuencias específicas del promotor central de TGF- β 1. En particular con la secuencia para el factor de transcripción Sp1e. Estos resultados en conjunto, apoyan fuertemente el hecho de que la expresión del gen de TGF- β 1 durante el desarrollo del cáncer cérvico uterino puede ser explicada en parte por la influencia de los oncogenes E6 y E7 de HPV-16 sobre el promotor de este gen. En consecuencia, los hallazgos aquí reportados tienen implicaciones sobre los efectos biológicos de TGF- β 1 en el contexto de la inducción de una eficiente respuesta inmune anti-tumoral contra el cáncer cérvico uterino.

V. ANTECEDENTES

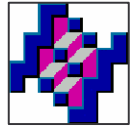
V.1. CANCER CERVICO UTERINO Y HPV

El cáncer cérvico uterino es un problema mundial de salud con más de 500,000 nuevos casos al año [17, 18], y en México ocupa el primer lugar de incidencia en cánceres de la población femenina [19]. En el desarrollo del cáncer cervical están involucrados varios factores de riesgo como: La infección por el HPV; alteraciones en la expresión de proto-oncogenes celulares (c-myc, ras, erbB2, bcl2, etc.); alteraciones en las funciones de genes supresores de tumores (p53 y pRb); y alteraciones de la respuesta inmune anti-tumoral del huésped [5, 8, 20-24]. La infección por HPV representa el principal agente etiológico de esta neoplasia y los datos clínicos y epidemiológicos asocian a la infección por HPV con el desarrollo del cáncer cervical [21]. Se han identificado más de 200 diferentes tipos de HPVs que se



clasifican de alto y bajo riesgo por su presencia en lesiones benignas y malignas [26], por su capacidad de immortalizar cultivos celulares *in vitro* [27], y por la afinidad que tienen las oncoproteínas E6 y E7 por las proteínas celulares supresoras de tumores p53 y pRb respectivamente [8]. Se ha reportado que el 99.7% de los carcinomas cervicales se asocian con la presencia del genoma de HPV de alto riesgo [25]. El HPV no puede ser aislado ni cultivado en forma convencional, y el elevado cruce antigénico que tienen todos los tipos de HPV no permite que sean serotificables. Este hecho ha conducido a que la tipificación del HPV esté basada en el grado de homología del DNA, por lo que el criterio de clasificación es por genotipificación. Por lo tanto, se define un tipo viral de HPV como aquel que posee más del 10% de diferencia en la secuencia de nucleótidos del segmento más conservado de la proteína estructural mayor L1. En la genotipificación de los HPVs de alto riesgo se encuentran los tipos HPV-16 y HPV-18; mientras que en los de bajo riesgo se consideran los tipos HPV-6 y HPV-11 principalmente.

El HPV tiene un genoma circular de DNA de doble cadena de aproximadamente 8000 pb, compuesto de dos marcos abiertos de lectura, una región de transcripción temprana (E de Erly) que codifica para proteínas involucradas en la replicación y transcripción viral (genes E1 y E2), y en la transformación e immortalización de células normales (oncogenes E5, E6 y E7); una región de transcripción tardía (L de Late) que codifica para proteínas de la cápside (genes L1 y L2) que formaran los viriones; y una región reguladora larga de control (LCR Long Control Region) que comprende de 400 a 1000 pb dependiendo del tipo viral y contiene secuencias de regulación en *cis* para la transcripción de los genes virales [4, 7] (**Figura 1**). La transcripción de los genes de HPV se realiza en una sola dirección (hebra positiva) y genera una gran cantidad de transcritos por los múltiples patrones de splicing. Estos transcritos son traducidos como proteínas de fusión o bien como productos policistrónicos [28]. La participación de los oncogenes E6 y E7 en el cáncer cérvico uterino es necesaria para establecer y mantener la neoplasia. Esto se ha confirmado por la transformación de células animales e immortalización de fibroblastos y de queratinocitos humanos al ser transfectados por los oncogenes E6 y E7 [26, 27, 28]. De la misma manera, el análisis mutacional de las secuencias de E6 y E7 ha demostrado que los productos de estos oncogenes son responsables de la transformación celular. Por lo tanto, las oncoproteínas E6 y E7 de HPV tienen especial atención de estudio, ya que permiten entender los mecanismos moleculares de oncogénesis viral en humanos, y representan un adecuado blanco de análisis para el desarrollo de estrategias terapéuticas contra el cáncer cérvico uterino.



El proceso de integración de HPV en el genoma de la célula hospedera se relaciona con el proceso de transformación celular [30, 31]. Los HPVs de alto riesgo pueden encontrarse de forma episomal en lesiones precancerosas, o bien, pueden estar integrados al genoma celular en lesiones cancerosas [20]. Al momento de la integración del genoma viral, éste se rompe en el marco abierto de lectura de los genes E1-E2 y los sitios de inserción en el genoma celular son diversos, aunque el DNA de HPV se ha encontrado integrado en posiciones cercanas a proto-oncogenes celulares como *c-myc*, *c-raf*, *c-src*, etc. La integración puede ser intragénica como en el caso del gen *c-myc* en donde induce rearrreglos y amplificaciones génicas [32]. Esto sugiere que un mecanismo de inducción de la transformación puede ser por activación en *cis* de algunos proto-oncogenes celulares. No obstante, ésta no es la única vía de transformación por HPV.

Otro mecanismo de inducción de la transformación es por alteración de las funciones de los genes celulares supresores de tumores *p53* y *pRb* por interacción con las oncoproteínas E6 y E7 de HPV. Se sabe que E6 se une a varias proteínas celulares incluyendo a E6BP y E6AP, una ligasa de la vía de proteólisis por ubiquitina [33]. Los complejos E6/E6AP se asocian con la proteína *p53* para una rápida degradación por el proteosoma y la pérdida de *p53* induce un incremento de la inestabilidad genética [34, 35]. Por otra parte, se conoce que E7 se une a la proteína *pRb* y a miembros de la familia de *pRb* [36]. Las interacciones ocurren inicialmente con la forma hipofosforilada de *pRb* lo que produce la liberación del factor de transcripción E2F activo, lo que induce la expresión de genes involucrados en la progresión del ciclo celular. Esta interacción produce una desregulación de la proliferación y diferenciación celular, o bien, inhibición del proceso de apoptosis [36] (Figuras 2 y Figura 3). Otro mecanismo adicional de transformación celular que se ha reportado para E6 y E7 de HPV es a través de sus propiedades de transregulación de genes celulares e inducción de la actividad de telomerasa [9-12]. Todos estos eventos pueden estar participando en la evolución del cáncer cérvico uterino, incluyendo el desarrollo de un estado de inmunosupresión local y alteraciones de más de un oncogen para generar la transformación e inmortalización celular [24].

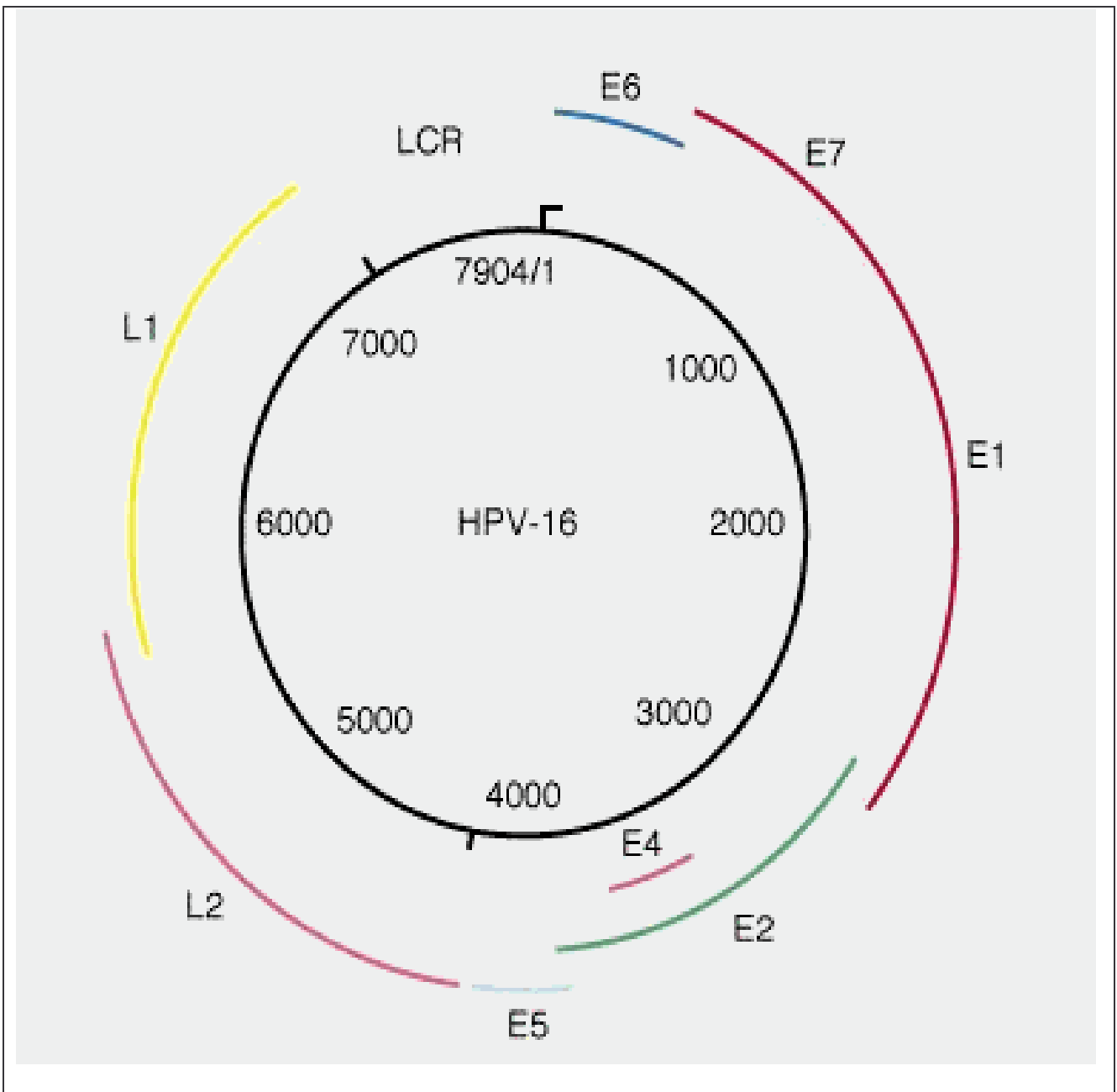
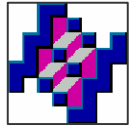


FIGURA 1. Genoma del virus de papiloma humano (HPV). El genoma está constituido por una doble cadena de DNA de aproximadamente 8000 pb. Se indica la localización de la región larga de control (LCR), de los genes de activación transcripcional temprana (genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7), y los genes de activación transcripcional tardía (genes L1 y L2). Se indica también el sitio de inicio de la transcripción.

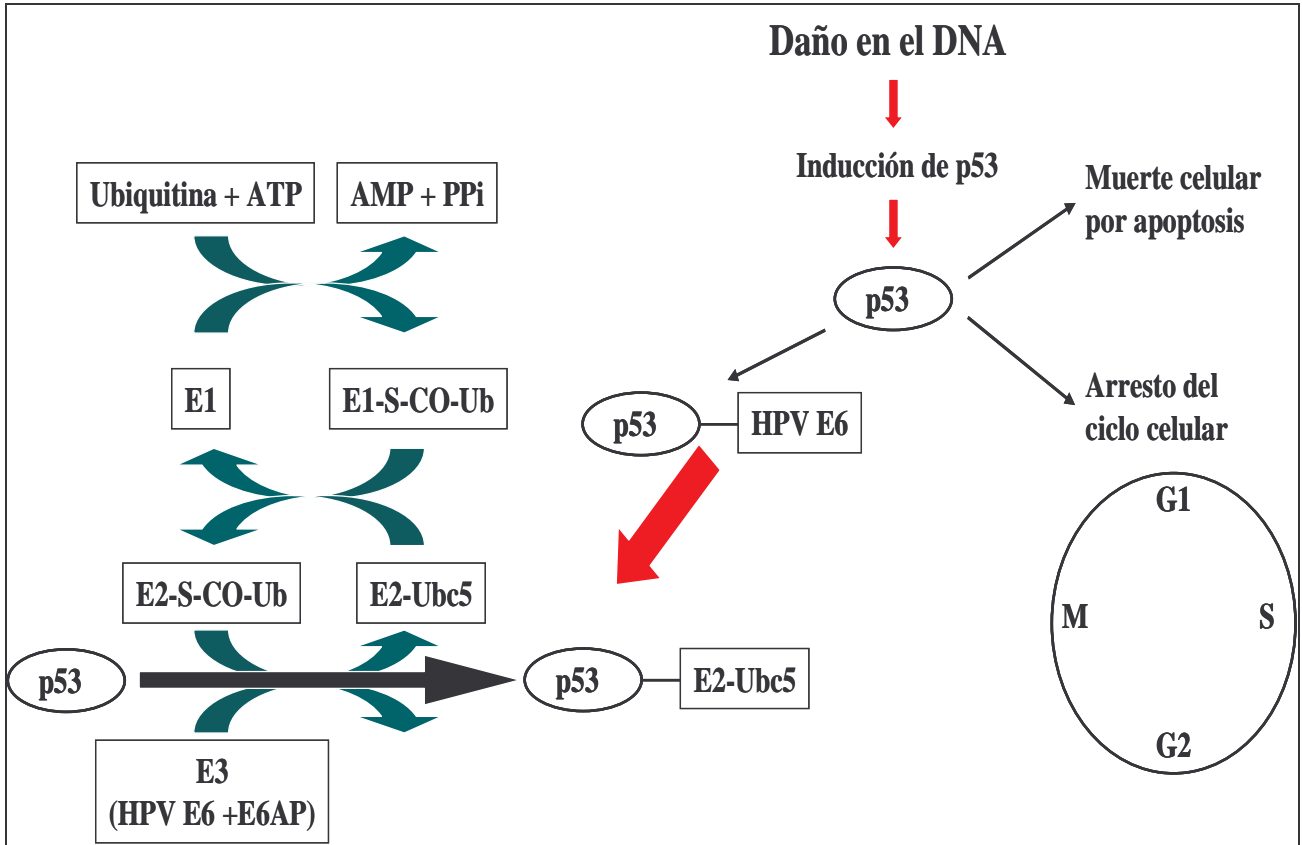
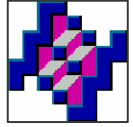


FIGURA 2. Mecanismos de acción de la oncoproteína E6 de HPV-16 sobre la proteína supresora de tumores p53. La proteína p53 participa en la regulación del ciclo celular o en la inducción del proceso de apoptosis cuando la célula tiene daño en el DNA. Estas funciones de p53 son alteradas cuando ocurre la interacción con la oncoproteína E6 de HPV-16 o HPV-18. Este evento marca a la proteína p53 para dirigirla a su degradación por la vía de ubiquitina (E1, E2, E3) dependiente del proteosoma.

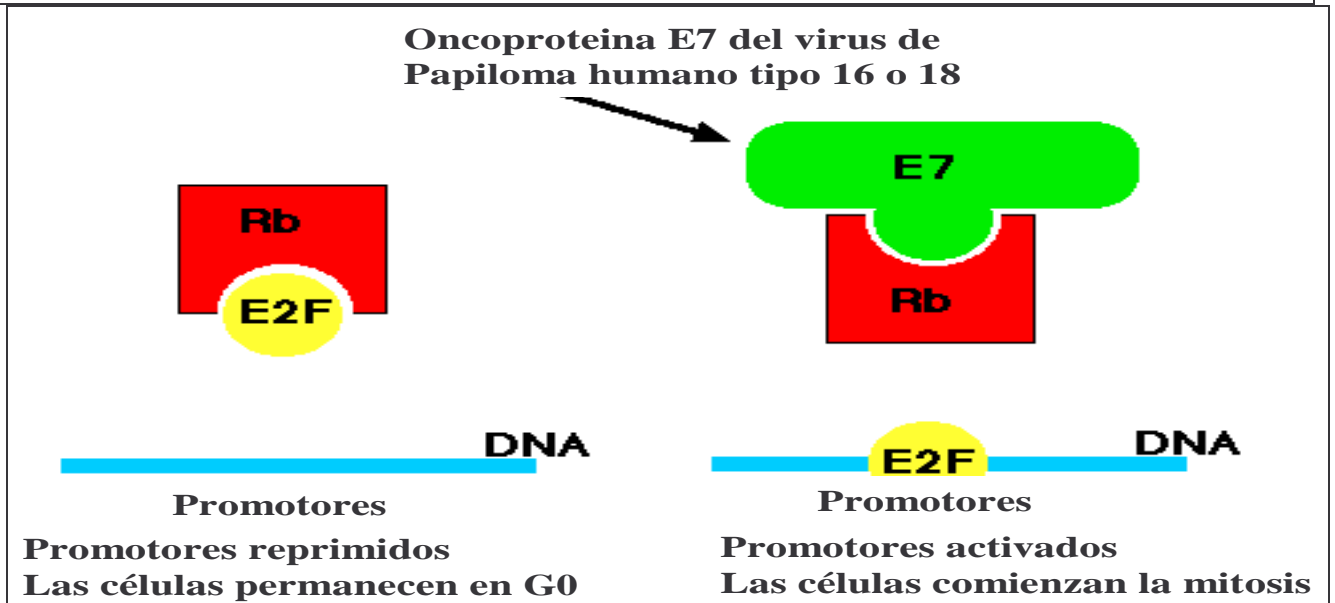
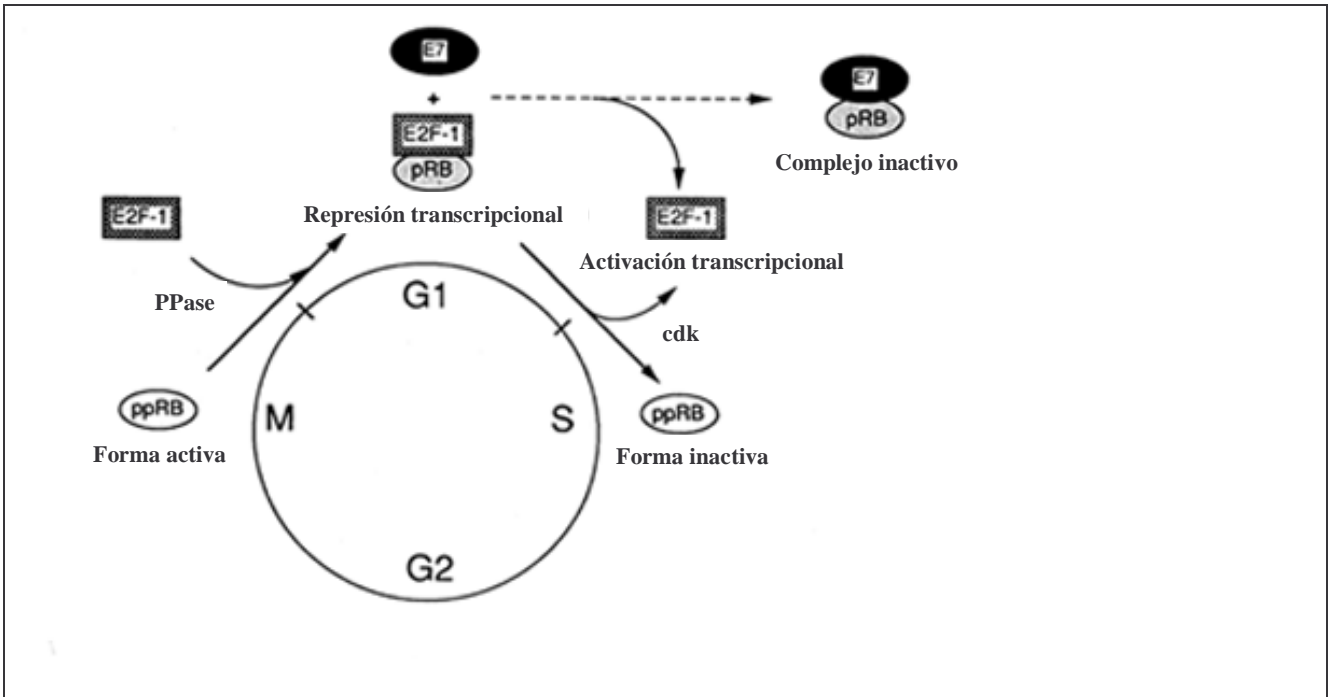
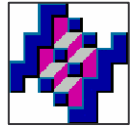


FIGURA 3. Mecanismo de acción de la oncoproteína E7 de HPV-16 sobre la proteína celular supresora de tumores pRb. La proteína pRb regula el ciclo celular y lo arresta en respuesta al daño en el DNA. La funcionalidad de pRb depende de su estado de fosforilación el cual es regulado por los complejos ciclinas-cdks. La forma hipofosforilada de pRb se asocia con el factor de transcripción E2F mientras que la forma hiperfosforilada permite la disociación de E2F, el cual participa en la transcripción de una gran cantidad de genes. La asociación de pRb con la oncoproteína E7 de HPV-16 o HPV-18 impide la unión de E2F con pRb y por lo tanto se induce la transcripción desregulada de genes blancos para E2F.



V.2. CICLO VIRAL DEL HPV

La infección por HPV se inicia en las células basales del cérvix en división, que expresan receptores para el virus (integrina $\beta 4-\alpha 6$). Una vez que el HPV ha penetrado la célula blanco, el virus pierde la cápside y comienza la transcripción de los oncogenes E6 y E7 por la acción de los factores de transcripción propios de las células cervicales que interactúan con el LCR del HPV. Inicialmente se expresa el oncogen E6 para generar una oncoproteína básica de aproximadamente 150 aminoácidos que se une a la proteína celular p53 y promueve su proteólisis por la vía de ubiquitinación dependiente del proteosoma [35, 37]. Simultáneamente se expresa el oncogen E7 para producir una fosfo-oncoproteína nuclear ácida de aproximadamente 98 aminoácidos que se asocia con la proteína celular pRb hipofosforilada y promueve la liberación de los factores transcripcionales de la familia de E2F, lo que induce la progresión de la fase S a la fase G2 del ciclo celular [36]. Posteriormente se transcriben los genes E1 y E2. La proteína viral E2 funcional se une al LCR del HPV en la secuencia específica de reconocimiento para E2 (ACCGN₄CGGT) y regula la expresión de los genes virales. La unión de E2 al DNA viral induce la interacción de la proteína E1 con el sitio de origen de la replicación (Ori). Una vez terminada la replicación viral, E2 regula negativamente la expresión de los oncogenes E6 y E7, lo que permite la liberación de p53 y pRb, y continuar con la diferenciación celular [33-37].

El gen E4 codifica para una proteína cuya función no está totalmente esclarecida. Se sabe que E4 es una proteína ácida, fosforilada y constituye del 20% al 30% del total de las proteínas virales en verrugas. Además, se ha reportado que E4 se expresa antes que la proteína L1 y que puede unirse al citoesqueleto, a citoqueratinas y al Zinc [38]. Esta condición representa una alteración del proceso normal de queratinización y puede ser una ventaja selectiva para el ciclo viral. Además, se tienen evidencias de que la expresión de la proteína E4 coincide con el comienzo de la amplificación vegetativa del DNA viral en lesiones cervicales de bajo grado [38]. El gen E5 codifica para una proteína de naturaleza hidrofóbica constituida de aproximadamente 80 aminoácidos. Esta proteína viral mantiene el estímulo de proliferación celular al inhibir la degradación del receptor del factor de crecimiento epitelial EGFR (Epitelial Growth Factor Receptor), por inhibición de la acidificación endosomal que es inducido por interacción con la ATPasa protónica [39]. Como evento final, un promotor de la región tardía activa la expresión de los genes L1 y L2 que participan en la síntesis de los viriones maduros que son liberados a la capa externa del epitelio escamoso en las células muertas [38, 39] (**Figura 4**).

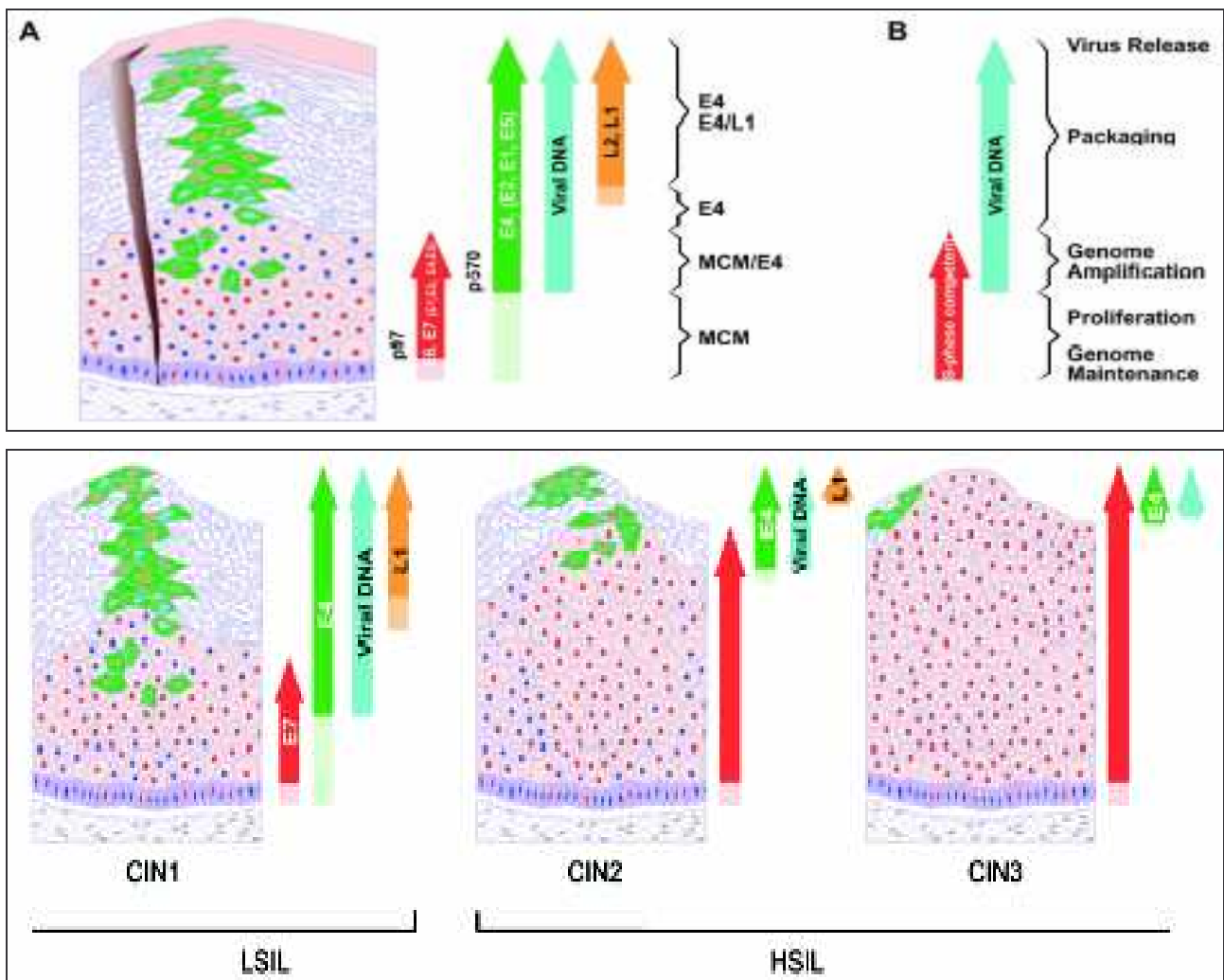
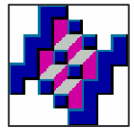
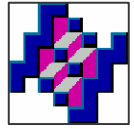


FIGURA 4. Modelo de expresión de las proteínas de HPV en el epitelio cérvico uterino. El epitelio diferenciado está representado esquemáticamente y la expresión de las proteínas virales de HPV está indicada con flechas. En los paneles **A** y **B** se indica la expresión de las proteínas virales en las capas de diferenciación de los queratinocitos. En el panel **C** se representa los cambios de expresión de las proteínas virales en una manera predecible durante la progresión del cáncer. En lesiones tempranas (LSIL Low-grade squamous intraepithelial lesions, o CIN1 cervical intraepithelial neoplasia) ocurre la infección productiva de HPV. En lesiones avanzadas (HSIL High-grade squamous intraepithelial lesions o CIN2 y CIN3) el orden de los eventos de expresión de las proteínas virales están alterados y resulta en una infección abortiva (Doorbar et al. J. Virol. 2003).

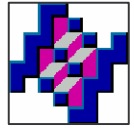


En infecciones productivas causantes de lesiones, el genoma de HPV se mantiene episomal con un gran número de copias (de 50 a 100) y es dependiente de la diferenciación celular. Por el contrario, en células provenientes de cáncer cérvico uterino, no se observa la producción de virus, ya que ocurre la integración azarosa del DNA viral en el genoma celular [38]. La integración del genoma viral ocurre entre los marcos abiertos de lectura de los genes E1-E2 y permite la expresión de los oncogenes E6 y E7, bloquea el proceso de diferenciación celular y promueve el fenotipo displásico avanzado característico de las células que no responden a los efectos supresores de las citocinas como TNF- α y de TGF- β 1 [40, 41]. Estos mecanismos oncogénicos del HPV han llevado a proponer que los tipos virales de alto riesgo como HPV-16 y HPV-18 sean considerados por la IARC (Internacional Agency for Research on Cancer) como agentes carcinogénicos humanos.

V.3. RESPUESTA INMUNE CONTRA LA INFECCION POR HPV

Un componente importante que contra resta la evolución del proceso neoplásico es la inducción de una eficiente respuesta inmune anti-tumoral. La adecuada respuesta del sistema inmune contra el desarrollo del cáncer cérvico uterino puede inducir la regresión de lesiones cervicales tempranas. No obstante, un alto porcentaje de estas lesiones progresan hacia estadios más avanzados de la enfermedad. Por lo tanto, el entendimiento de las funciones de la respuesta inmune en el desarrollo del cáncer cérvico uterino representa un aspecto relevante para comprender el fracaso o éxito del organismo para resolver esta enfermedad.

En la respuesta inmune innata las células epiteliales en condiciones normales, incluyendo a los queratinocitos cervicales, tienen la capacidad de sintetizar de manera constitutiva niveles basales de citocinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento y quimiocinas [42]. Sin embargo, este conjunto de interleucinas pueden ser inducidas por diferentes estímulos como son las infecciones virales. Se ha reportado que las células cancerosas infectadas con HPV producen TNF- α [40], IFN- α e IFN- β [43] y TGF- β 1 [14, 15, 41]; los cuales tienen efectos anti-virales y anti-proliferativos en los estadios tempranos del desarrollo de las células tumorales. No obstante, en estos estudios los resultados son contradictorios e incluso no concluyentes, lo que sugiere que las diferentes respuestas mediadas por la secreción de interleucinas sobre las células tumorales tienen efectos diversos que dependen de la especificidad del tipo

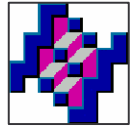


viral de HPV, de los diferentes estadios de progresión del tumor, y del estado fisiológico del blanco celular sobre el que actúan. Otro componente de la respuesta inmune innata contra la infección por HPV es la activación de las células asesinas naturales (NK de Natural Killer) que generalmente están presentes en lesiones asociadas al virus [44]. La reducción de la actividad citotóxica de las células NK contra queratinocitos aislados de lesiones pre-malignas de pacientes con epidermodisplasias verruciformes, sugiere la importancia de la función de las células NK en la prevención del desarrollo del cáncer cérvico uterino [44].

En relación a la respuesta inmune adaptativa, se ha demostrado que en verrugas cutáneas, condilomas y lesiones intracervicales que contienen DNA de HPV, hay un bajo número de células dendríticas en comparación con las existentes en el tejido normal [44]. Específicamente, se ha descrito una disminución de la densidad de células de Langerhans en infecciones genitales por HPV, lo cual podría sugerir una migración de las células de Langerhans como células presentadoras de antígeno de la epidermis a los nódulos linfoides para la presentación de antígenos a los linfocitos T nativos [45]. Sin embargo, se ha sugerido que las células de Langerhans en lesiones con HPV, pueden estar funcionalmente alteradas, lo cual podría contribuir a la persistencia de la infección viral.

La respuesta inmune humoral en la infección por HPV no ha sido estudiada de manera sistemática, debido a que la inducción de anticuerpos contra HPV no tiene una función relevante en la eliminación de la infección. Sin embargo, se han realizado estudios para detectar anticuerpos dirigidos contra antígenos de HPV por ELISA para utilizarlos como marcadores de exposición acumulada de la infección. Hasta el momento, son pocos los estudios al respecto y el consenso de los resultados indican que la seroprevalencia contra antígenos como VLPs (Virus-Like Particles) de HPV-16, -18 y -33 aumenta conforme aumenta la edad, con un 50 % en individuos mayores de 50 años [46, 47] y del 35 % en población general [46]. Además, la seroprevalencia contra las proteínas E2, E4 y E7 alcanza un máximo entre los 21 y 35 años, con niveles máximos para E2 del 30 % y para E4 del 35 % [47].

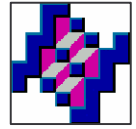
La activación de los linfocitos T CD4+ cooperadores en pacientes con cáncer cervical también ha sido analizada por varios grupos, sobre todo la respuesta dirigida hacia las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 y HPV-18 [44, 48, 49]. En estos estudios se ha analizado la respuesta proliferativa de los linfocitos T CD4+ en pacientes con lesiones intracervicales severas, en donde se ha observado una eficiente respuesta



en sujetos que no tienen progresión de lesiones en comparación con sujetos con regresión de la enfermedad. [48]. Las proteínas E2 y L1 de HPV-16 también han sido estudiadas como potenciales moléculas para inducir la activación de los linfocitos T CD4+, en donde se ha reportado una mejor respuesta en sujetos con lesiones intraepiteliales cervicales que en sujetos sanos [49, 50].

Los hallazgos reportados en estos estudios poblacionales proporcionan una información valiosa para conocer la respuesta inmune celular, específicamente de los linfocitos T CD4+ cooperadores *in vivo* en pacientes con diferentes grados de avance de la enfermedad. Sin embargo, presentan inconsistencias al analizar en conjunto los resultados de los diferentes estudios, y esto es debido a varios factores. En primera instancia tienen diferencias en la selección de los determinantes antigénicos a evaluar. El principal argumento en este sentido es el uso de diferentes péptidos o determinantes antigénicos para inducir la activación de los linfocitos T CD4+. Por lo tanto, la respuesta a los diferentes determinantes antigénicos será tan variada como la cantidad de moléculas analizadas. En segundo término, estos protocolos tienen diferencias en la selección de los sujetos en las poblaciones estudiadas. Tercero, los estudios transversales son limitados, ya que los eventos importantes de eliminación del virus o regresión de la enfermedad no pueden ser analizados en periodos de tiempos cortos, y en los estudios longitudinales escasamente se tiene toda la información de la historia natural de la enfermedad de los sujetos de estudio. En consecuencia, las conclusiones a las que llegan estos reportes poblacionales permiten visualizar que hay una ausencia de correlación entre la respuesta de los linfocitos T CD4+ cooperadores y la historia natural de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de estas limitaciones en este tipo de estudios, lo rescatable es el hecho de que la activación de los linfocitos T CD4+ durante el desarrollo del cáncer cervical, es un componente importante de la respuesta inmune celular, ya que son necesarios en la inducción de la síntesis de anticuerpos por parte de los linfocitos B, así como en la activación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos del tumor. Sin embargo, la activación de los linfocitos T CD4+ cooperadores por si mismos no puede correlacionar directamente con la eliminación del virus, ya que no tienen propiedades efectoras en el contexto de la respuesta inmune anti-tumoral (**Figura 5**).

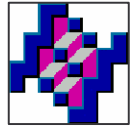
Por otra parte, se han desarrollado varios estudios para el análisis de la actividad de los linfocitos T CD8+ citotóxicos por activación con las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 y HPV-18 [51-53]. En estos estudios se ha demostrado que la inmunización de fibroblastos normales transfectados con E6 o E7 de HPV-16 induce la regresión de tumores que expresan E6 o E7 respectivamente, y esta regresión es



mediada por los linfocitos T CD8+ [52]. Los estudios en población humana han demostrado que hay activación de linfocitos T CD8+ específicos contra E6 y E7 en pacientes que tienen infección de HPV-16 y el fenotipo de las poblaciones de linfocitos T identificados incluye tanto a CD4+ y CD8+ [51]. En otros estudios se ha evaluado la asociación entre la activación de linfocitos T CD8+ específicos para E6 y E7 de HPV-16 y la persistencia de la infección por HPV-16 [53]. Los datos reportados evidencian una ausencia de respuesta de linfocitos T CD8+ contra la oncoproteína E6, pero no para la oncoproteína E7, lo cual correlaciona con la persistencia de la infección viral y sugiere que la respuesta de los linfocitos T CD8+ a E6 puede ser importante en la eliminación de la infección del HPV-16.

Adicionalmente, también se ha analizado la actividad de memoria citotóxica de los linfocitos T CD8+ y su relación por la presencia de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 [54]. Los resultados reportados demuestran que los linfocitos T CD8+ de memoria específicos para las oncoproteínas virales, están presentes en pacientes que son positivos a la infección por HPV-16, lo que sugiere una posible protección por parte de los linfocitos T CD8+ citotóxicos de memoria específicos para E6 y E7 de HPV-16 [54]. Estas evidencias sugieren que la actividad de los linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos contra las oncoproteínas E6 y E7 de HPV es relevante en el desarrollo del cáncer cérvico uterino, y por lo tanto, la ausencia de la activación de los linfocitos T CD8+ contra las oncoproteínas virales correlaciona con una persistencia de la infección por HPV. En conjunto, estas evidencias sugieren el desarrollo de un mecanismo de vigilancia inmune como respuesta a la aparición o desarrollo de focos neoplásicos asociados a la infección por HPV (**Figura 5**).

Los estudios de inmunoregulación sugieren la clasificación fenotípica de los linfocitos T CD4+ cooperadores en Th1 por el patrón de expresión de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12; las cuales inducen la respuesta inmune celular; y en linfocitos T CD4+ cooperadores Th2 que expresan las citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y que activan la respuesta inmune humoral [55, 56]. Esta dicotomía funcional de citocinas Th1 y Th2 puede tener una función importante en la historia natural de la infección por HPV. Algunos reportes sugieren que la infección por HPV evoca una respuesta Th1. Por ejemplo, la vacunación contra HPV en modelos animales se caracteriza por la secreción de citocinas Th1 como IFN- γ e IL-2 [57]. Además, se ha demostrado la producción de IL-2 por células mononucleares de sangre periférica en respuesta a péptidos de HPV-16 en mujeres con lesiones de bajo grado o con cáncer, y en



mujeres con citología normal con historia de infección con HPV-16 [58]. Varios grupos han analizado el nivel de expresión del RNAm y de las proteínas de diferentes citocinas Th1 y Th2 en células cervicales exfoliadas de sujetos HPV+, en tejidos de biopsias cervicales de sujetos con lesiones de alto y bajo grado, o con cáncer cervical, y en células mononucleares de sangre periférica [59-62]. Los datos reportados por estos grupos han permitido identificar la ausencia de una respuesta de citocinas Th1, lo cual puede estar asociado con la persistencia de la infección o con el desarrollo de neoplasias asociadas al HPV. Esto sugiere que la inducción de la expresión de citocinas Th1 es un componente importante de la respuesta inmune para la eliminación de la infección por HPV. Por otra parte, se ha identificado la reducción de los niveles de IL-1, TNF y GM-CSF en varias líneas celulares cervicales inmortalizadas con HPV y de cáncer cérvico uterino, comparadas con células cervicales normales [63]. Además, se ha reportado la misma correlación de expresión de citocinas en muestras de biopsias de pacientes con lesiones cervicales de alto y bajo grado comparado con muestras de epitelio escamoso cervical normal [54]. Estas evidencias epidemiológicas han demostrado que hay un desequilibrio en el balance de expresión de citocinas Th1-Th2 que se asocia con un aumento en la frecuencia de neoplasias malignas. No obstante, existen regresiones espontáneas de lesiones cervicales, producto de la generación de una adecuada respuesta inmune contra HPV. Sin embargo, en muchos casos, a pesar de que se genera una eficiente respuesta anti-tumoral, no existe regresión del tumor.

En otros tipos de tumores se han identificado diversos mecanismos de escape a la respuesta inmune, como son la expresión del receptor soluble para TNF- α , expresión de IL-10 y secreción de TGF- β 1 [24, 65, 66]. Nuestro grupo ha identificado que la mayoría de las muestras de cáncer cervical con HPV-16 analizadas no expresan IL-2, IL-12 y TNF- α ; mientras que IL-4, IL-10 y TGF- β 1 se expresan en la mayoría de los tumores estudiados. Estos datos sugieren que existe una expresión preferencial de citocinas Th2 y de citocinas Th3 inmunosupresoras como TGF- β 1. Como consecuencia, el desarrollo de un estado de inmunosupresión local en el micro ambiente del tumor puede favorecer el desarrollo del cáncer cérvico uterino y eventualmente evadir la respuesta inmune que se pudiera generar. Estas evidencias sugieren la posibilidad de que el HPV puede modular la síntesis de citocinas en los queratinocitos infectados, o alternativamente, que los individuos con una respuesta anormal en el perfil de expresión de citocinas pueden estar en un riesgo incrementado de infección por HPV o desarrollo de neoplasias (**Figura 5**).

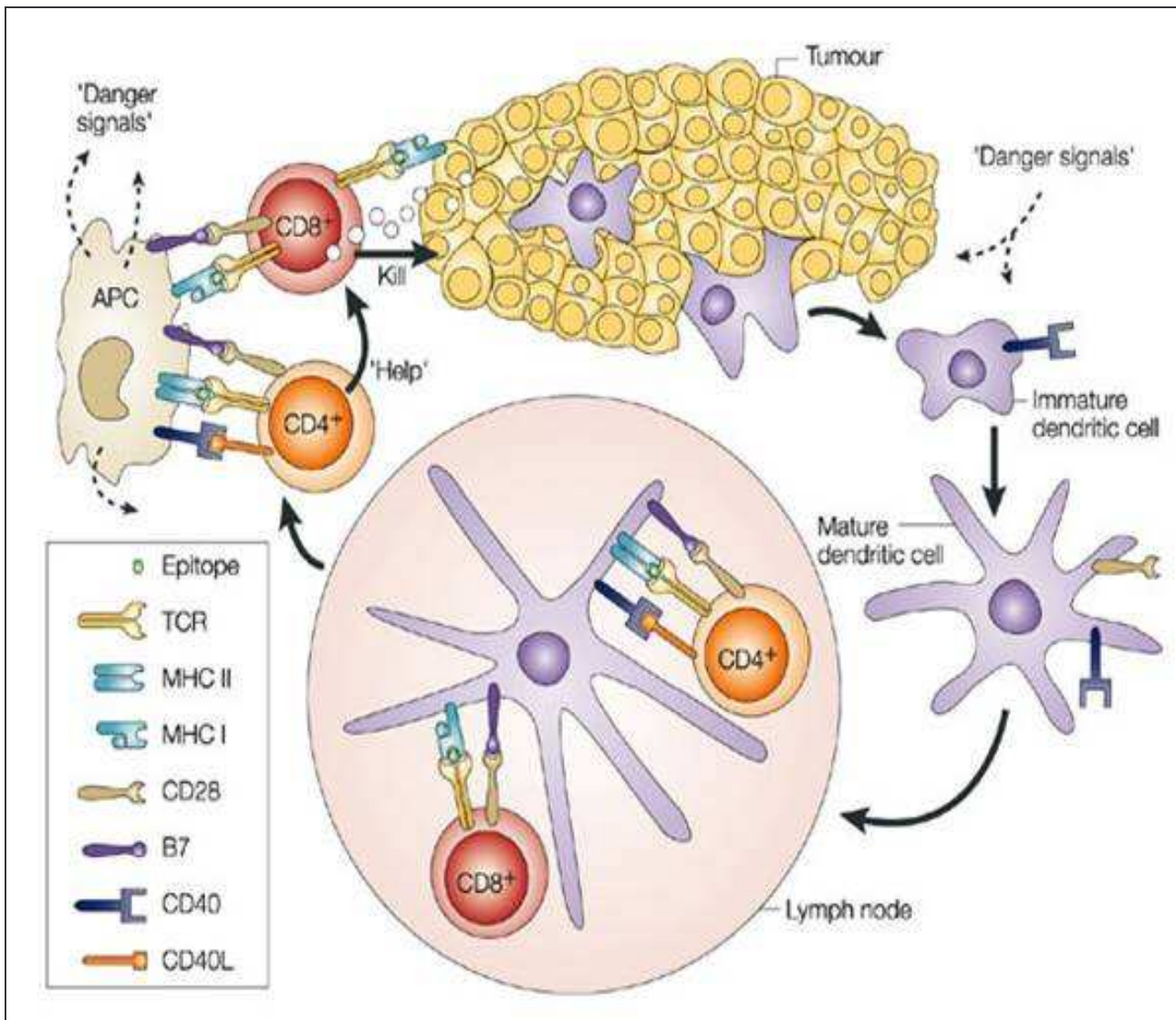
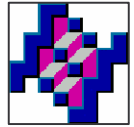
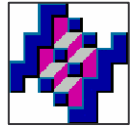


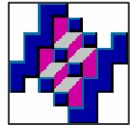
FIGURA 5. Respuesta inmune adaptativa contra las células tumorales. Las células dendríticas (DC) procesan las proteínas en péptidos. En presencia de señales inflamatorias producto de la necrosis tumoral, las células DC expresan moléculas co-estimuladoras de la superfamilia de B7 (CD80/CD86). Las células DC presentan los péptidos antigénicos a los linfocitos T CD8+ o CD4+ en el contexto de las moléculas de MHC clase I o clase II respectivamente. Las señales de co-estimulación inducen la activación de los linfocitos T efectoras en CD8+ citotóxicos y CD4+ cooperadores. Los linfocitos efectoras pueden migrar a los tejidos y responderes contra las células que expresan los antígenos tumorales. Los linfocitos T CD8+ lisan a las células blanco, y los linfocitos T CD4+ inducen un aumento en la secreción de citocinas como IL-2. La generación de linfocitos de memoria reaccionan con subsecuentes encuentros con los antígenos tumorales (Tindle et al. Nature 2002.).



V.4. TGF- β 1 Y LA RESPUESTA INMUNE ANTI-TUMORAL

TGF- β 1 es una citocina Th3 que regula en gran medida las señales de arresto y de progresión del ciclo celular de muchos tipos de células [67-69]. Esta citocina está presente en órganos linfoides y se expresa de manera constitutiva en el suero. Además, tiene efectos sobre la respuesta inmune celular por inhibición de la proliferación y diferenciación de linfocitos T pre-inmunes en linfocitos T CD4+ cooperadores y en linfocitos T CD8+ citotóxicos, y es capaz de inhibir las funciones estimuladoras de los linfocitos T inducidas por las células presentadoras de antígenos [70, 71]. Aunque los efectos de inmunosupresión inducidos por TGF- β 1 pueden compartir respuestas inmunes, la producción temprana de TGF- β 1 promueve una respuesta protectora por parte de los linfocitos T. Se ha demostrado que TGF- β 1 facilita la diferenciación de los linfocitos T CD8+ [72] e inducen el desarrollo de las células que secretan IL-2 [73]. Además, regula las respuestas inmunes inducidas por las infecciones virales por aumento de la activación y proliferación de linfocitos T CD8+ en las infecciones agudas. Debido al hecho de que la actividad de los linfocitos T CD8+ y la producción de citocinas Th1 son componentes importantes de la respuesta inmune anti-tumoral para la eficiente erradicación de los tumores, la supresión de estas funciones por los efectos de TGF- β 1 podría ser un importante mecanismo para inhibir las funciones de la respuesta inmune anti-tumoral. Por lo tanto, la biosíntesis de TGF- β 1 y sus efectos biológicos en el contexto del desarrollo de los tumores, así como en la respuesta inmune anti-tumoral, tienen implicaciones importantes que permiten entender mejor la evolución del proceso neoplásico.

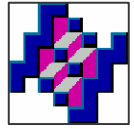
No está totalmente claro como las funciones de inhibición o proliferación celular inducidas por TGF- β 1 pueden ser reguladas durante las infecciones virales. Una explicación es que los efectos biológicos son dependientes de la concentración de TGF- β 1. Por lo tanto, a concentraciones bajas esta citocina puede aumentar la respuesta de los linfocitos T pre-inmunes con la inhibición de la respuesta de las células NK [74, 75]. Sin embargo, altas concentraciones de TGF- β 1 inhiben todas las respuestas proliferativas de los linfocitos T. Aunque la mayoría de los diferentes tipos celulares pueden ser inducidos para expresar TGF- β 1, los monocitos y macrófagos expresan constitutivamente transcritos de esta citocina, lo que parece ser un evento crucial para la síntesis de TGF- β 1 [76]. Una hipótesis alternativa para explicar las funciones de TGF- β 1 consiste en que la cinética de producción puede controlar los efectos funcionales. Por lo tanto, la cinética de expresión de TGF- β 1 puede ser una



consecuencia de la relación entre monocitos-macrófagos y las infecciones virales. Por otra parte, la producción de TGF- β 1 por las infecciones virales tempranas puede promover respuestas protectoras de los linfocitos T CD8+. Por lo tanto, las infecciones tempranas de monocitos-macrófagos pueden producir niveles inmunopotenciadores de la producción de TGF- β 1, pero la producción continua o elevada de esta citocina en infecciones virales crónicas como es el caso de la infección por HPV, puede tener efectos inmunosupresores.

Adicionalmente, TGF- β 1 tiene importantes funciones indirectas en la respuesta inmune anti-tumoral, ya que regula la expresión de otras citocinas. Puede inducir aumento en la síntesis de IL-10 por parte de los macrófagos, y se ha demostrado que las actividades anti-tumorales de los macrófagos son inhibidas por la sobre expresión de IL-10. Además, se ha relacionado la expresión de IL-10 con la inhibición de la expresión de moléculas MHC clase I en las células tumorales. La disminución de la expresión de estas moléculas protege a las células tumorales de la activación de los linfocitos T CD8+ por una deficiente presentación antigénica [78]. Por otra parte, también se ha demostrado que TGF- β 1 puede modular la expresión de moléculas MHC clase II (HLA-DR) que están involucradas en el reconocimiento de antígenos tumorales por las células linfoides [79]. Estas evidencias sugieren que TGF- β 1 puede regular la expresión de los complejos moleculares antígenos-MHC durante el proceso neoplásico y puede tener un efecto indirecto sobre las funciones de las células presentadoras de antígenos.

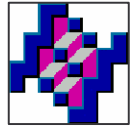
Los estudios realizados para comprender las funciones biológicas de TGF- β 1 permiten afirmar que esta citocina media una gran variedad de efectos sobre el sistema inmune, principalmente regula la activación de los linfocitos B y T, así como la citotoxicidad de células NK [71]. En el proceso inflamatorio, los macrófagos activados tienen la capacidad de secretar grandes cantidades de TGF- β 1, lo cual induce un efecto quimiotáctico de macrófagos, monocitos y fibroblastos [76]. Además, TGF- β 1 inhibe la proliferación y diferenciación de células hematopoiéticas, altera la síntesis de inmunoglobulinas, modula la expresión de moléculas MHC, regula la producción de otras citocinas, y es un importante regulador de la proliferación de células epiteliales [68, 80, 81]. Por otra parte, hay evidencias de que las células tumorales son responsables de la biosíntesis primaria de TGF- β 1, lo que condiciona a las células neoplásicas en una ventaja selectiva para evadir la vigilancia inmune, inducir



angiogénesis y/o facilitar la invasión metastásica [13, 82]. En cualquiera de los escenarios el resultado final es que la presencia de TGF- β 1 selectivamente favorece la expansión clonal de la población de células tumorales que originalmente eran sensibles a TGF- β 1. Por lo tanto, la célula tumoral puede tener un ambiente favorable, como es el desarrollo de un estado de inmunosupresión local, alteración de las funciones del sistema inmune y expresión diferencial de genes celulares; todos ellos asociados a los efectos biológicos de TGF- β 1, que eventualmente le pueden permitir escapar del control de regulación del ciclo celular.

En relación a la progresión de las células tumorales, la activación de la respuesta inmune y los efectos de TGF- β 1; se sabe que muchos tumores son capaces de evadir la respuesta inmune, lo cual se explica en parte por la habilidad intrínseca del sistema inmune para reconocer más eficientemente a los antígenos exógenos provenientes de patógenos, que a los antígenos propios o provenientes de tumores que son poco inmunogénicos. Este concepto inicialmente sugirió la posibilidad de que los tumores no son capaces de activar una respuesta inmune adaptativa y en consecuencia no pueden inducir señales de co-estimulación apropiadas para propiciar una respuesta anti-tumoral eficiente. No obstante, se ha demostrado que en algunos tumores la eliminación de una subpoblación de linfocitos T (por ejemplo CD4+) [83], o el bloqueo de una vía de transducción de señal (por ejemplo CTLA-4) [84]; pueden inducir una respuesta anti-tumoral. Estas evidencias sugieren que la incapacidad del sistema inmune para desarrollar una respuesta efectiva podría ser resultado del desarrollo de un estado de inmunosupresión local mediada por el propio tumor, y no por la ausencia de la inducción de señales co-estimuladoras apropiadas como originalmente se había propuesto.

Muchas moléculas son biosintetizadas por las células tumorales o por las células circunvecinas como resultado del desarrollo tumoral, las cuales tienen efectos inmunosupresores, y el más prominente de estos factores es TGF- β 1. Aunque la fuente de biosíntesis de TGF- β 1 no ha sido establecida para todos y cada uno de los tumores analizados en particular, se conoce una gran variedad de tumores que producen directamente TGF- β 1 [13]. Adicionalmente, TGF- β 1 puede ser producido por diferentes células no cancerosas asociadas al tumor como linfocitos T, células NK, macrófagos, células epiteliales y las células del estroma; por lo que se ha reportado una estrecha asociación entre las fuentes de biosíntesis de TGF- β 1 y el desarrollo de los tumores [13, 82, 85]. Sin embargo, las células neoplásicas

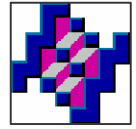


tienen la capacidad de superar los efectos inhibidores de TGF- β 1 sobre la proliferación celular y pueden progresar hacia un estado más avanzado de la transformación neoplásica. Por lo tanto, los efectos de TGF- β 1 en el micro ambiente de las células transformadas pueden representar un mecanismo para contra restar la expansión clonal de las células tumorales, por lo que en este sentido TGF- β 1 es considerado como un gen supresor de tumores.

V.5. ESTRUCTURA Y MECANISMOS DE ACCION DE TGF- β 1

La proteína de TGF- β 1 es una citocina Th3 que pertenece a una familia de moléculas multifuncionales y es un importante regulador de la expresión de genes durante los procesos de embriogénesis, proliferación y diferenciación celular, desarrollo y saneamiento de heridas [68, 80, 81]. TGF- β 1 se identificó inicialmente como un producto de secreción por parte de fibroblastos transformados por el virus de sarcoma murino [86]. Sin embargo, se ha identificado que puede ser sintetizado por diversos tipos celulares, incluyendo miocitos, condrocitos, astrocitos, plaquetas, células epiteliales, glioblastomas y células de la médula ósea [87-89]. Hay varias isoformas de TGF- β 1 constituidas por homodímeros unidos por puentes disulfuro y designados como TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 y TGF- β 5. Las isoformas 1 y 2 son sintetizadas por muchos tipos celulares, mientras que TGF- β 3 es expresado principalmente por células mesenquimatosas [80]. Los queratinocitos humanos expresan las tres isoformas más abundantes de TGF- β (1, 2, y 3) las cuales comparten un alto nivel de homología y usan el mismo complejo de receptores para ejercer un conjunto redundante de funciones biológicas similares [90]. Los genes que codifican para las isoformas de TGF- β 1, 2 y 3 se encuentran localizados en los cromosomas humanos 19q13, 1q41 y 14q24 respectivamente [80]. Existe una homología de aminoácidos del 70% entre TGF- β 1 y TGF- β 2, y del 79% entre TGF- β 2 con TGF- β 3; mientras que la homología de TGF- β 1 entre las diferentes especies de organismos es del 98% [80].

TGF- β 1 es sintetizado como una proteína precursora inactiva que contiene 390 aminoácidos, y que es procesada proteolíticamente en aminoácidos básicos para generar un monómero maduro que consiste de una región COOH-terminal de 112 a 114 aminoácidos. Un complejo latente inactivo se forma de la asociación no covalente entre el dímero de TGF- β 1 maduro con un segundo dímero conocido como proteína asociada a latencia (LAP Latent Associated Protein) [69]. Después de la



secreción de la citocina, ocurre la maduración para la liberación de las formas biológicamente activas de TGF- β 1 que consisten de un homodímero de 25 kDa, que en condiciones de reducción generan monómeros de 11.5 a 12.5 kDa. Los precursores de TGF- β 1 contienen 3 a 4 sitios de N-glicosilación, y 9 cisteínas que participan en la formación de los puentes disulfuro [69]. La estructura tridimensional de la proteína de TGF- β 1 ha sido reportada, la cual comienza en el extremo NH-terminal con una cadena α -hélice (α 1) seguida por una cadena β -plegada (β 1) y una cadena β -plegada antiparalela irregular. A continuación sigue una segunda cadena α -hélice (α 2) y un asa larga con numerosos contactos hidrofóbicos. Se continúa con una segunda cadena β -plegada (β 2), otra asa larga y una tercera cadena α -hélice (α 3), la cual termina con un giro β tipo II y un asa larga. El extremo COOH-terminal de la molécula forma una estructura β antiparalela extensa con un giro β tipo II. Las cadenas β 3, β 4, β 5, β 6 y β 7 plegadas se forman por apareamiento de los residuos intercatenarios del extremo COOH-terminal de la proteína [91] (**Figura 6**).

TGF- β 1 induce sus efectos biológicos a través de la interacción con sus receptores en la superficie celular. Se han identificado 5 diferentes tipos de receptores serina-treonina cinasa transmembranales que incluye el tipo I (T β RI de 53-65 kDa), el tipo II (T β RII de 83-110 kDa), el tipo III (T β RIII de 250-310 kDa), el tipo IV (T β RIV de 60 kDa) y el tipo V (T β RV de 400 kDa) [92]. Los receptores I, II, III, y V son co-expresados en la mayoría de las células con la excepción de unas pocas líneas tumorales, mientras que el receptor tipo IV se ha identificado en células pituitarias [92]. Las señales inducidas por TGF- β 1 son transducidas intracelularmente por un mecanismo único que involucra el acoplamiento específico de los receptores con las proteínas de la familia Smad [93]. El proceso comienza con la unión del ligando libre (TGF- β 1) al receptor tipo II, entonces dos moléculas del receptor tipo I son reclutadas en un complejo con dos moléculas del receptor tipo II y un solo ligando dimérico. La formación de este complejo permite a la cinasa del receptor tipo II fosforilar residuos serina específicos del receptor tipo I, que se encuentran por arriba del dominio serina-treonina cinasa. Esta activación de los dominios de cinasa del receptor tipo I es necesaria como primer evento en la cascada de transducción de señal inducida por TGF- β 1 [93] (**Figura 7**).

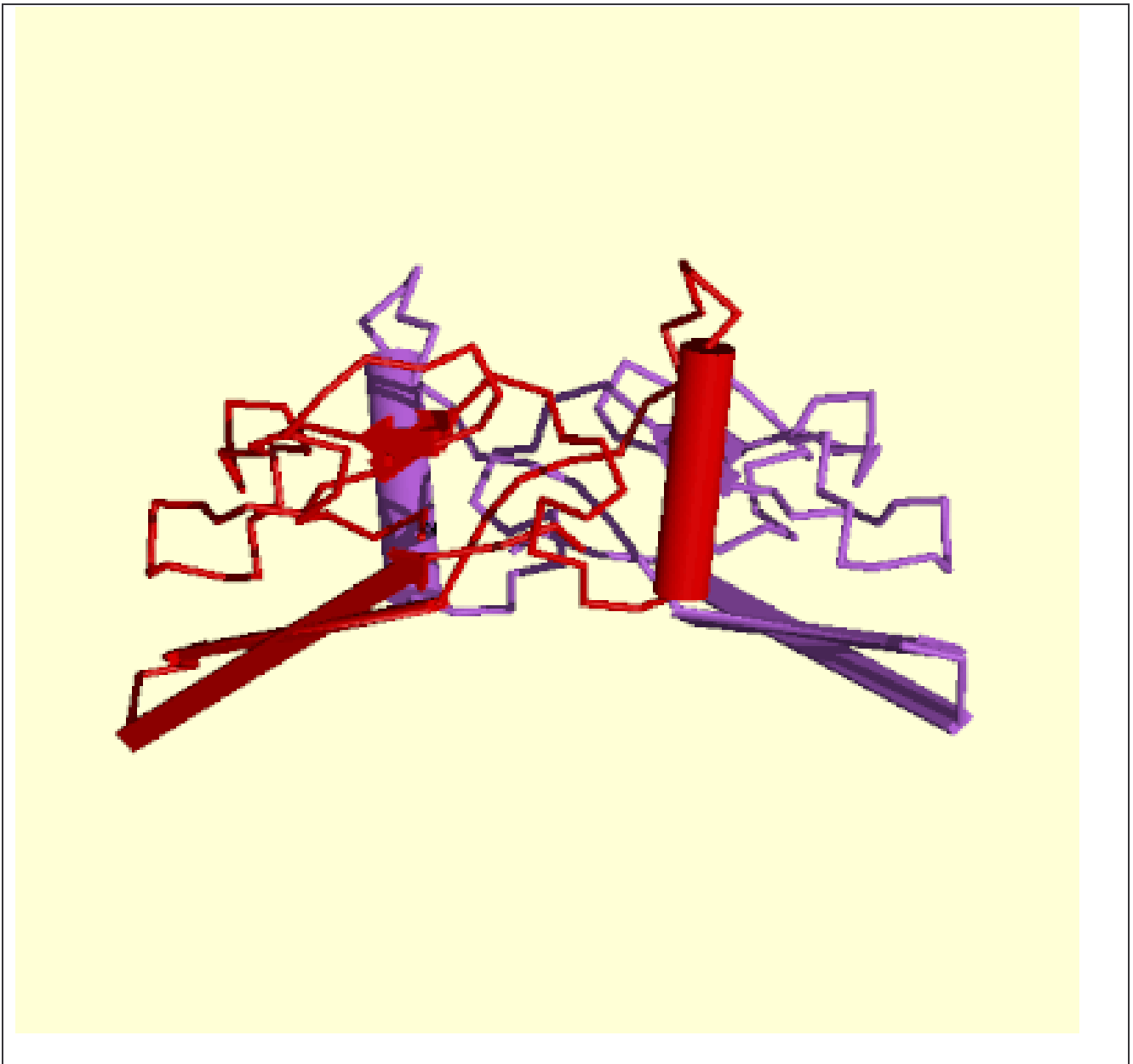
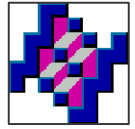
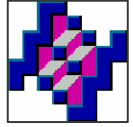


FIGURA 6. Estructura de segunda dimensión de la citocina TGF- β 1. El análisis de la estructura secundaria sugiere una extensa cadena beta-plegada con pocas estructuras alfa-hélices



TGF- β Receptors I & II

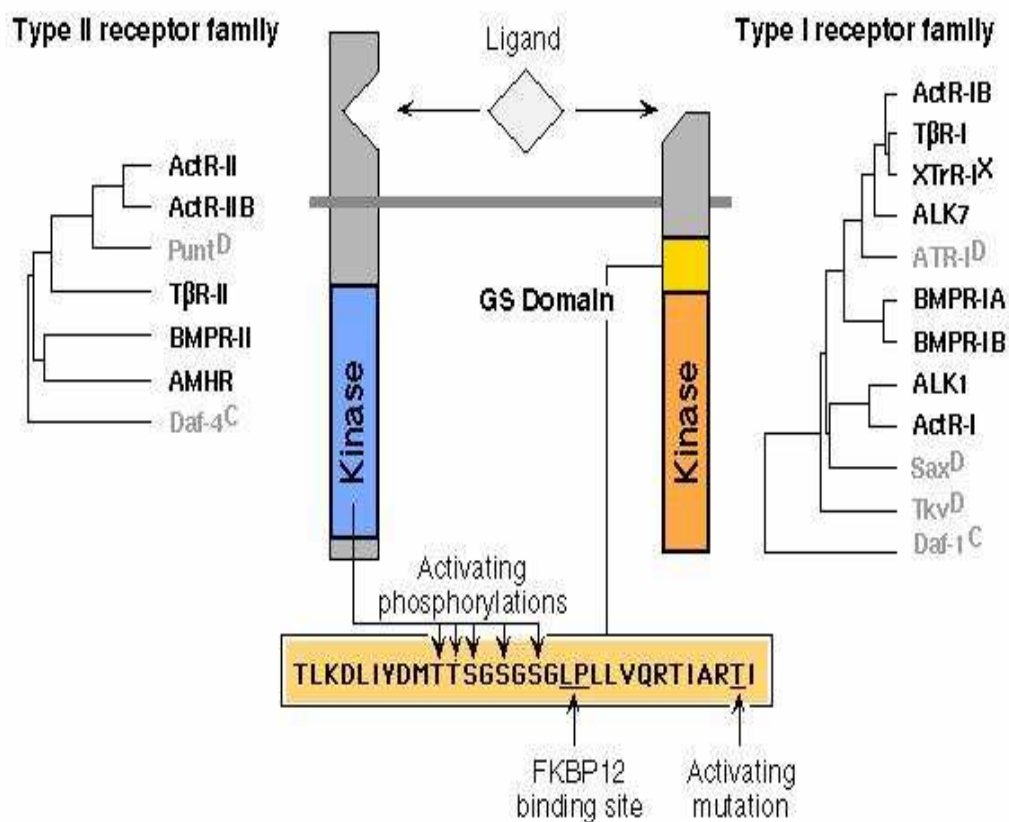
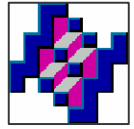


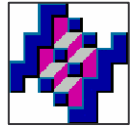
FIGURA 7. Sistema de receptores para TGF- β 1. Los receptores de TGF- β 1 transducen la se \tilde{n} al al interior celular a trav \acute{e} s de la fosforilaci \acute{o} n serina-treonina cinasa. TGF- β 1 interact \acute{u} a inicialmente con el receptor tipo II e induce la transfosforilaci \acute{o} n del receptor I. Se han identificado los diferentes miembros de la familia de los receptores tipo I y II en diferentes c \acute{e} lulas analizadas. En los dominios de cinasa y GS intracelulares de los receptores se han identificado los amino \acute{a} cidos sustratos de la fosforilaci \acute{o} n.



Los eventos post-receptor en la señalización son realizados por los miembros de la familia de proteínas Smad [94]. Se han identificado 8 tipos diferentes de proteínas Smads las cuales se clasifican en tres grupos: Smad reguladas por receptor (RSmad-1, RSmad-2, RSmad-3, RSmad-5 y RSmad-8); Smad comunes de acoplamiento (CoSmad-4), y Smad inhibidoras (ISmad-6 e ISmad-7) [93, 94]. En respuesta a la unión de TGF- β 1, RSmad-2 y RSmad-3 se encuentran transitoriamente asociadas con el receptor tipo I activado y son fosforiladas por la actividad cinasa del receptor. Después de su activación, RSmad-2 y RSmad-3 son translocadas al núcleo y se acumulan en complejos heteroméricos acoplados a CoSmad-4. Los dominios NH-terminal de RSmad-3 y CoSmad-4 están involucrados en la dimerización, mientras que los dominios COOH-terminal participan en la regulación de la transcripción de genes de respuesta a TGF- β 1 [93, 94]. Las proteínas ISmad-6 e ISmad-7 interactúan con el receptor tipo I posiblemente en una manera más estable que RSmad-2 y RSmad-3. Esto puede ser debido a que ISmad-6 e ISmad-7 carecen del sitio de fosforilación en el extremo COOH-terminal. La sobre expresión de ISmad-6 o ISmad-7 inhibe la fosforilación de RSmad-2 y RSmad-3 estimulada por el ligando, lo que sugiere que ISmad-6 e ISmad-7 tienen propiedades inhibitorias, ya que pueden bloquear la señalización en puntos tempranos de la vía de transducción de señal inducida por TGF- β 1 [94] (**Figura 8**).

Los complejos RSmad/CoSmad pueden regular la transcripción de genes blanco a través de tres mecanismos principales: 1) Por unión directa al DNA, 2) por interacción con otras proteínas de unión al DNA y 3) por reclutamiento con co-activadores o co-represores transcripcionales. Cuando ocurre la estimulación por TGF- β 1, los complejos de RSmad/CoSmad son translocados al núcleo y regulan la transcripción de genes de respuesta a TGF- β 1. Los dominios COOH-terminal y NH-terminal de las proteínas Smads son denominados como MH1 y MH2 por su homología con las proteínas Mad de *Drosophyla* (MH Mad Homology). Se ha demostrado que el dominio MH1 participa en la unión de RSmad-3 a secuencias específicas en el DNA, y puede asociarse con factores de transcripción como c-Jun [99, 100].

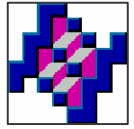
Por análisis de la estructura tridimensional del dominio MH2 de CoSmad-4 se ha demostrado que forma un homotrímero y participa en la interacción con los receptores de TGF- β 1. Además, se ha demostrado que RSmad-3 y RSmad-4 se unen a las secuencias consenso GTCT o CAGA las cuales



representan los elementos de unión a Smad (SBE Smad-Binding Element) [103, 104]. Estos oligómeros se asocian con varias proteínas de unión al DNA e inducen la activación transcripcional de muchos genes de respuesta a TGF- β 1 [101- 104]. Adicionalmente, se ha evidenciado que otros factores de transcripción como Fast-1 se asocian a RSmad-2 y RSmad-3 como un componente primario de unión al DNA en la activación transcripcional de algunos genes. Otra asociación que se ha reportado de Smads con factores transcripcionales es con los miembros de la familia Runx, que son proteínas de unión al enhancer de poliomavirus y que participan en la hematopoyesis y osteogénesis [105]. Por lo tanto, las evidencias reportadas indican que la unión directa de Smads al DNA es requerida para la activación transcripcional de algunas familias de genes que responden a TGF- β 1, mientras que para regular la expresión de otros grupos de genes la interacción con el DNA es de manera indirecta.

El reclutamiento de proteínas de remodelaje de la cromatina como co-activadores y co-represores transcripcionales, por parte de las proteínas Smads es otro mecanismo para regular la expresión de genes de respuesta a TGF- β 1. El co-activador p300/CBP, una proteína con dominios de acetilación de histonas (HAT Histone Acetyl Transferase), permite el acceso de factores transcripcionales a la maquinaria general de transcripción. Se ha demostrado que las RSmads se unen a p300/CBP y esta interacción ocurre a través del dominio MH2 de RSmads con el dominio COOH-terminal de p300/CBP, lo que permite el aumento de la transcripción de genes blanco a través de RSmad-3 [106].

Mutaciones, lesiones y/o rearrreglos génicos de los receptores tipo I o II de TGF- β 1, así como en RSmad-2, RSmad-3 y CoSmad-4 han sido descritos en muchas líneas celulares de cánceres humanos o en especímenes de tumores primarios [95-98]. Estas evidencias sugieren que la alteración de alguno de los componentes de la vía de transducción de señal inducida por TGF- β 1 puede contribuir a la progresión del proceso tumoral. Por lo tanto, se propone que uno de los mecanismos de escape de las células tumorales al control de la proliferación regulada por TGF- β 1, es en parte causado por la alteración en los componentes de la vía de transducción de señal inducida por TGF- β 1, lo cual representa un evento exitoso en la evolución de la transformación maligna [13, 82, 85]. Sin embargo, no es el único mecanismo de escape de la respuesta inmune mediado por TGF- β 1.



TRANSDUCCION DE SEÑAL INDUCIDO POR TGF- β 1

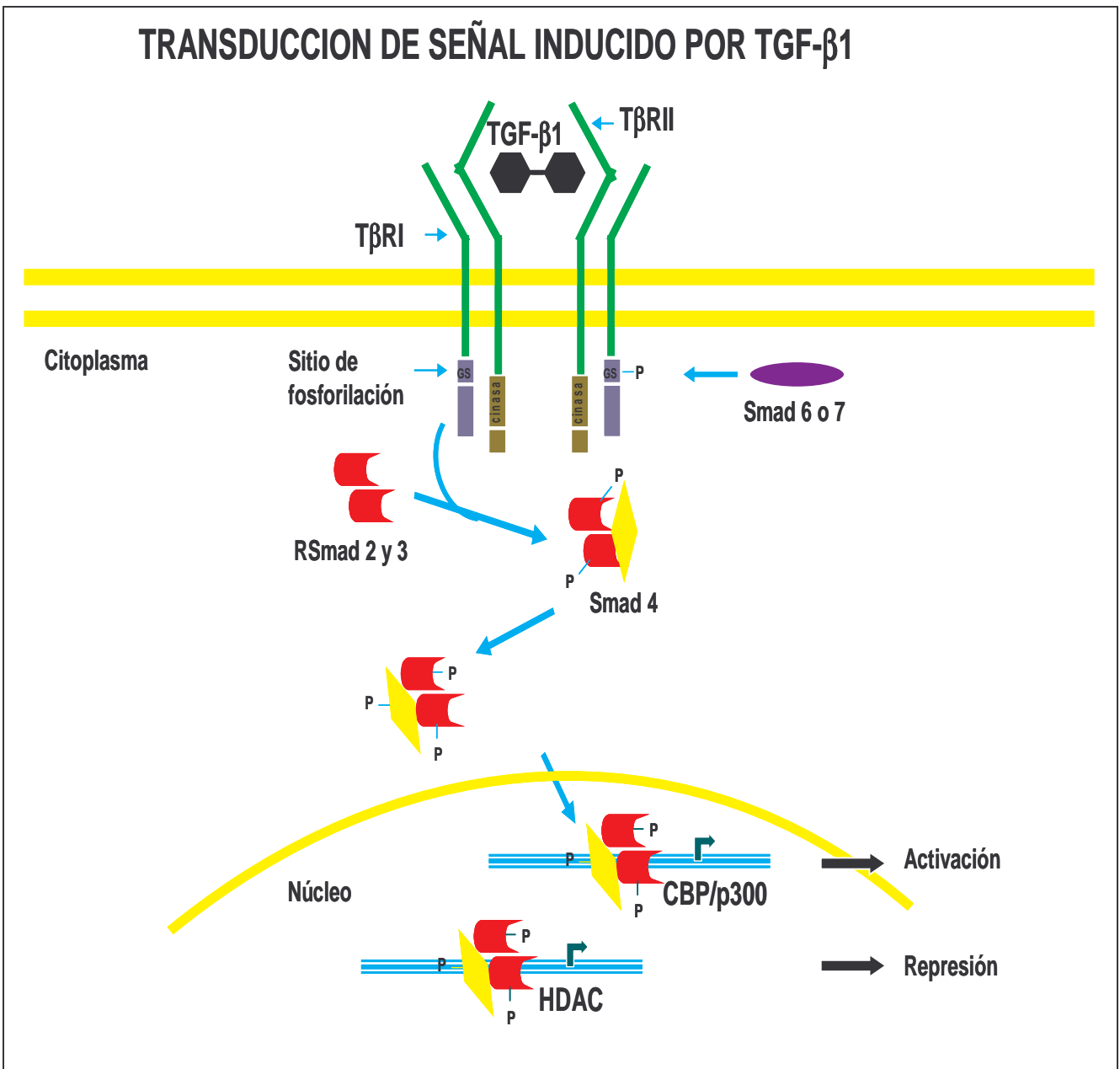
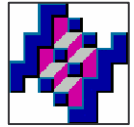


FIGURA 8. Modelo de la vía de transducción de señal inducida por TGF- β 1. TGF- β 1 se une al receptor T β RII y después al T β RI. Este complejo tetramérico fosforila a las proteínas de la familia RSmad 2 y RSmad 3, las cuales se asocian con la proteína CoSmad 4. El complejo de Smad 2-3-4 activo es translocado al núcleo donde funciona como un acoplador transcripcional para regular la expresión de genes de respuesta a TGF- β 1. El reclutamiento de co-activadores (p300/CBP) o co-represores (HDAC) inducen la activación o represión de genes. Las proteínas ISmad 6 y ISmad 7 pueden interactuar con T β RI y T β RII e impedir que se fosforile RSmad 2 y RSmad 3.

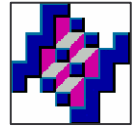


En relación a la interacción de Smads con co-represores, se ha demostrado que se asocian con TGIF, c-Ski y SnoN; los cuales al interactuar con las proteínas Smads inducen represión de la transcripción por reclutamiento de proteínas con actividad de histonas deacetilasas (HDACs Histone Deacetylases) [107]. Se ha reportado que Ski puede asociarse con RSmad-3 y competir por su unión con p300/CBP. El resultado de esta competencia produce la deacetilación del motivo central de histonas y reprime la activación transcripcional inducida originalmente por RSmad-3 y p300/CBP [107]. Por lo tanto, la función de las Smads y su asociación con las diferentes proteínas de la maquinaria de transcripción y de remodelaje de la arquitectura de la cromatina, pueden explicar la expresión o represión de los genes que responden a los efectos biológicos inducidos por TGF- β 1 (**Figura 8**).

V.6. CONTROL DEL CICLO CELULAR POR TGF- β 1

Una de las funciones más importantes y mejor caracterizadas de TGF- β 1 es la habilidad para inducir el arresto en la fase G1 del ciclo celular en algunos tipos de células. Este efecto inhibitorio de la proliferación puede ser un evento central para muchos de los efectos de TGF- β 1 en una amplia variedad de células [108]. Por lo tanto, la desregulación de la habilidad de TGF- β 1 para inducir este arresto celular puede contribuir a la patogénesis de muchas enfermedades y al desarrollo del proceso de carcinogénesis. Se han estudiado los eventos intracelulares que propagan las señales de arresto de la proliferación inducidos por TGF- β 1 hacia el núcleo. Las evidencias sugieren que los eventos nucleares comienzan con la unión de TGF- β 1 a pRb [109, 110] (**Figura 9**). Las células solo son sensibles a TGF- β 1 cuando se encuentran en la fase G1 antes del punto de control, una vez que avanzan en el ciclo, las células se comprometen a terminarlo. La fosforilación de pRb es iniciada por los complejos ciclina D-cdk4 y ciclina D-cdk6 (cdk Ciclyn-Dependent Kinases) inducidos en respuesta a factores de crecimiento [111]. Este estado es mantenido por los complejos ciclina E-cdk2 y por ciclina A-cdk2, los cuales fosforilan también a otros sustratos importantes para la replicación del DNA y la proliferación celular.

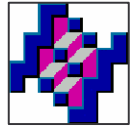
Un mecanismo central por el cual TGF- β 1 arresta el ciclo celular es a través del bloqueo de la actividad de los complejos ciclínas-cdks. Se ha demostrado que TGF- β 1 es capaz de aumentar la



cantidad de moléculas cdKis (cdKis cdk inhibitor proteins) las cuales son los principales inhibidores de los complejos ciclínas-cdks [112]. Los cdKis se han clasificado en dos grupos basados en su homología y función. El primer grupo incluye a p21 (WAF1/Cip1), p27 (Kip1) y p57 (Kip2); los cuales se unen a los complejos ciclína-cdks e inhiben su actividad. El segundo grupo comprende a p15 (INK4B/MTS2), p16 (INK4A/MTS1), p18 y p19; los cuales se unen solo a cdks e inhiben su actividad.

Se ha demostrado una asociación entre la actividad de TGF- β 1 y de p27 durante el arresto del ciclo celular [113]. Se conoce que p27 se asocia a los complejos ciclína E-cdk2 e inhibe su actividad, lo que sugiere que la acción de p27 inducida por TGF- β 1 tiene una función reguladora negativa en el control del ciclo celular [113]. Sin embargo, no se ha demostrado que TGF- β 1 afecte la transcripción o traducción de p27. En relación a p15 y p21, se ha demostrado que pueden ser inducidos por la acción de TGF- β 1 [114, 115]. Por análisis de los promotores de p15 y p21, así como por ensayos funcionales de acoplamiento de estos promotores con genes reporteros, se ha demostrado que ambos promotores contienen elementos de respuesta SBE regulables por TGF- β 1, y se ha confirmado que miembros de la familia de proteínas del factor de transcripción Sp1 pueden unirse a los elementos SBE [114-116]. Además, la activación de cdk2 involucra la re-localización de p27 de los complejos ciclína A/E-cdk2 a los complejos ciclína D-cdk4 y ciclína D-cdk6, y estos eventos son regulados por las acción de TGF- β 1 [113]. Por lo tanto, este proceso de regulación del ciclo celular por TGF- β 1 evidencia la participación del factor de transcripción Sp1 no solamente como una molécula acopladora que regula la expresión del propio gen de TGF- β 1, sino como un componente central para regular la expresión de moléculas que controlan el ciclo celular.

Los mecanismos de acción de los complejos ciclínas-cdks y de los cdKis, así como de los efectos de regulación que tiene TGF- β 1 sobre estas moléculas, varía en función del tipo celular en donde se han estudiado. En diferentes sistemas de células epiteliales se ha demostrado que TGF- β 1 inhibe la actividad de cdk4 e incrementa la asociación de p27 con los complejos ciclína E-cdk2 [113], pero el mecanismo primario puede variar considerablemente dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, TGF- β 1 inhibe la síntesis de cdk4 en células epiteliales sin alteración de la expresión de ciclína D [117], mientras que en células intestinales de rata TGF- β 1 inhibe la síntesis de ciclína D1 [111]. En queratinocitos TGF- β 1 induce a p15 sin modificar la expresión de cdk4 y ciclína D [116]. En células de



glándula mamaria, TGF- β 1 evita la asociación del complejo ciclina D-cdk4 por la inducción de la sobre expresión de p15 [118]. La inducción de p21 y p27 por TGF- β 1 es también específica del tipo celular [113, 116]. Las células que carecen de p15 no son resistentes a la inhibición por TGF- β 1, lo cual puede ser explicado por la acción de la fosfatasa cdc25A que defosforila los sustratos de ciclínas-cdks; o por inducción de p21. En células HaCaT, TGF- β 1 causa una rápida inducción de p15 y p21, los cuales inhiben la actividad enzimática de los complejos responsables para la fosforilación de pRb [113, 116] (**Figura 9**).

El control selectivo de la expresión de genes por TGF- β 1 puede ser indicativo de un mecanismo de inhibición de la proliferación celular por TGF- β 1. En la mayoría de las líneas celulares que responden a los efectos anti-proliferativos de TGF- β 1, también se ha identificado la desregulación de la expresión de c-myc que induce el secuestro de p27, a través de mecanismos que pueden ser dependientes o independientes de la actividad de los complejos ciclina D-cdk4 en diferentes tipos celulares [119, 120]. Además, se ha propuesto que la inhibición de la proliferación de queratinocitos inducida por TGF- β 1 es una consecuencia de la inhibición de la transcripción del gen c-myc regulado por pRb [120]. Las oncoproteínas virales con propiedades de transformación celular como E6 y E7 de HPV-16, E1A de adenovirus y antígeno T de SV40; son capaces de unirse al gen de Rb e inhibir su expresión. Por lo tanto, la participación de pRb en la supresión de la transcripción de c-myc por TGF- β 1 sugiere que TGF- β 1 puede regular negativamente la transcripción de c-myc y por consiguiente la proliferación celular [116, 121]. Esta hipótesis predice que mutaciones o deleciones en el gen de Rb podrían ser un mecanismo por el cual las células cancerosas resisten los efectos de inhibición producidos por TGF- β 1. Estas evidencias ponen de manifiesto el hecho de que el arresto del ciclo celular inducido por TGF- β 1 correlaciona perfectamente con la acumulación de pRb hipofosforilado, y es dependiente de la naturaleza del tipo celular.

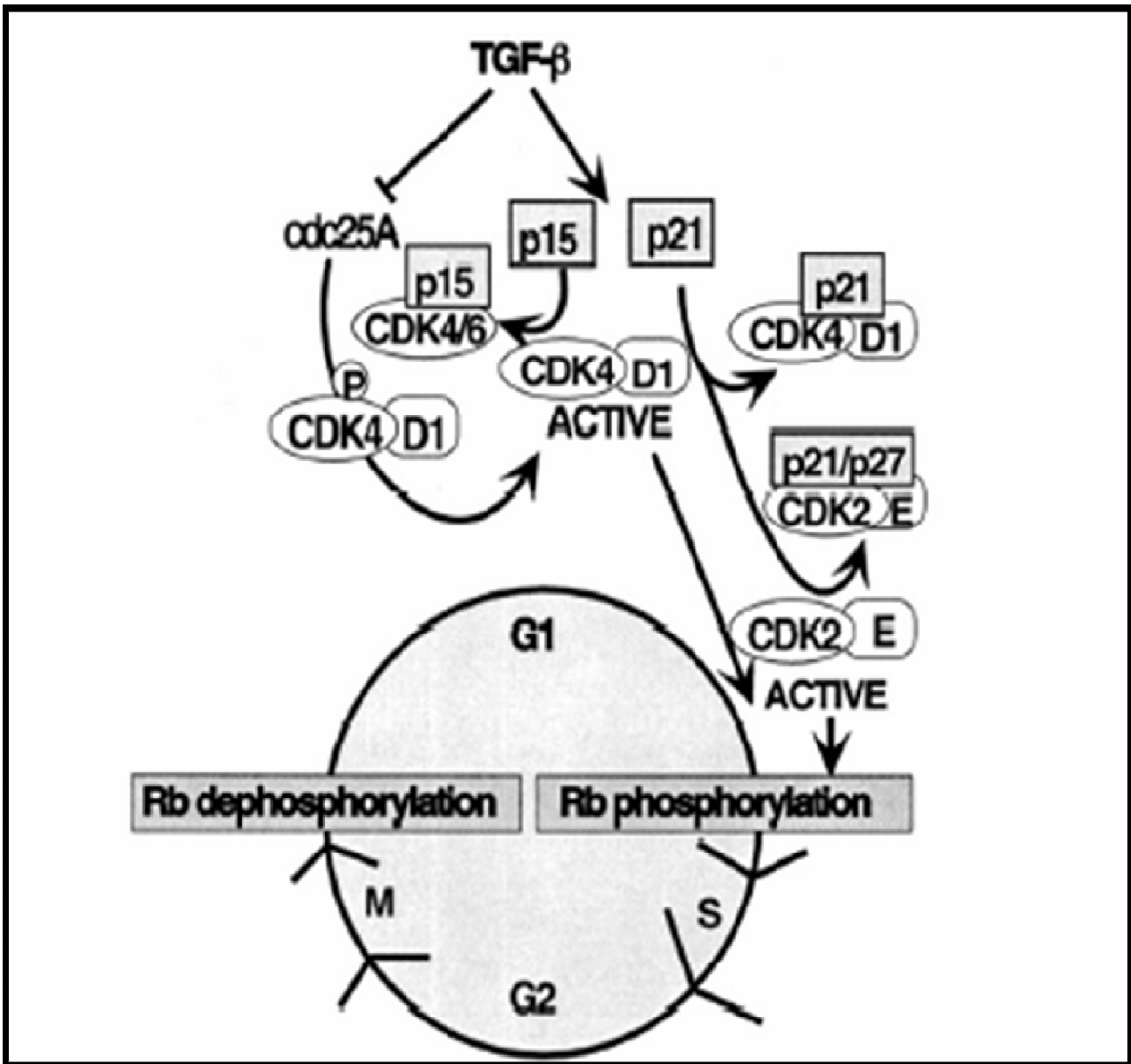


FIGURA 9. Regulación del ciclo celular por TGF-β1. TGF-β1 produce arresto del ciclo celular a través de la inducción de las proteínas de la familia de Kips (p15, p16, p21, p27). Las Kips inhiben la formación de los complejos ciclinas-cdks las cuales tienen un efecto final sobre el estado de fosforilación de la proteína supresora de tumores pRb. Este efecto que tiene TGF-β1 en la regulación del ciclo celular tiene variaciones en algunos de sus intermediarios dependiendo del tipo celular.



V.7. CARACTERIZACION DEL PROMOTOR DEL GEN HUMANO DE TGF- β 1

Todos los genes de TGF- β tienen una longitud de más de 100 Kb y contiene 7 exones en el marco abierto de lectura. El gen humano que codifica para TGF- β 1 se encuentra localizado en el cromosoma 19q13 y se ha identificado y caracterizado la región promotora de este gen [122] (**Figura 10**). En el promotor de TGF- β 1 se ha identificado la presencia de 4 sitios independientes de inicio de la transcripción, de los cuales los dos primeros son usados de manera preferencial y se encuentran ubicados en las posiciones de +1 y +271. Los otros dos sitios son utilizados con menor frecuencia y están ubicados en las posiciones de +470 y +525 en relación al primer sitio de inicio de la transcripción. El promotor no contiene las secuencias consenso TATA ni CAAT, y el porcentaje de secuencias CG es del 60%. Además, contiene 11 secuencias repetidas CCGCCCC, de las cuales 7 de ellas corresponden a verdaderos sitios funcionales de unión para el factor de transcripción Sp1. Se han identificado también 3 secuencias homologas para unión al factor transcripcional FSE2, una secuencia GRE, cuatro secuencias AP-1, una secuencia NF-1, una secuencia Egr-1, varias secuencias para la proteína E2 de HPV y una secuencia para E1A de adenovirus [122].

Por estudios de expresión funcional de genes reporteros se han identificado 5 regiones reguladoras distintas, las cuales se describen a continuación [123]. Una región con actividad parecida a un enhancer ubicada entre los nucleótidos de -1132 a -731; dos regiones con actividad reguladora negativa localizadas entre los nucleótidos de -1362 a -1132 y de -731 a -453; y dos regiones promotoras centrales localizadas inmediatamente antes de los dos primeros sitios de inicio de la transcripción. Se ha demostrado que deleciones en las secuencias de los promotores centrales y del enhancer distal inhiben la actividad promotora [122, 123]. En relación al segundo sitio de inicio de la transcripción (+271), se ha reportado que es muy activo, lo cual sugiere que existen secuencias de reconocimiento para la maquinaria de transcripción, localizadas después del primer sitio de inicio de la transcripción (+1), y que son requeridas para la regulación diferencial de la expresión del gen humano de TGF- β 1 [123]. Además, durante la transcripción de TGF- β 1, uno de los principales RNAm es transcrito a partir del segundo sitio de inicio de la transcripción y parece ser regulado de manera independiente del primer sitio de inicio de la transcripción [124].

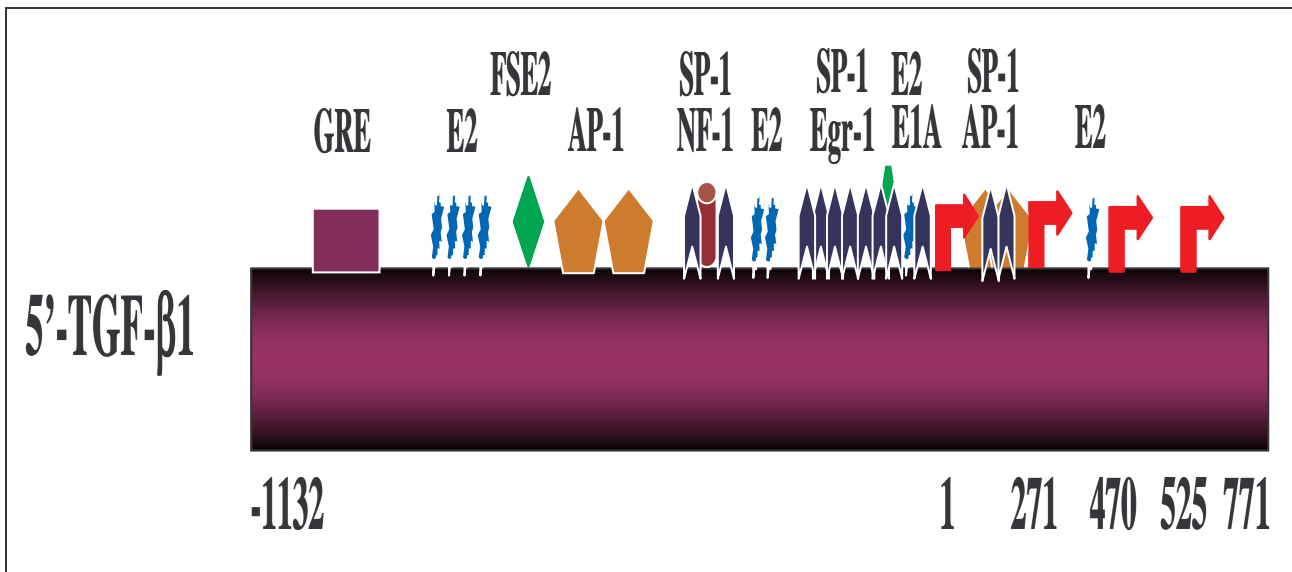
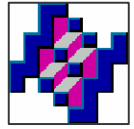
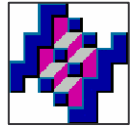


FIGURA 10. Esquema del promotor del gen humano de TGF- β 1. La secuencia del promotor de TGF- β 1 ha sido reportada y tiene el número de acceso del gene bank: J04431 [122]. En el esquema se indica la posición de los 4 sitios de inicio de la transcripción (+1, +271, +470 y +525). Además se indica la localización de los diferentes elementos reguladores que se han identificados (GRE, E2, FSE2, AP-1, NF-1, Sp1, Egr-1, E1A). Secuencia enhancer (Eh), Región reguladora negativa (RN), Promotor central (PC).

Dos regiones del promotor han sido identificadas como regiones de respuesta específica, una a la auto-inducción y otra a la inducción por ésteres de forbol TRE (TRE TPA Response Element) [123-125]. La primera región corresponde a las secuencias localizadas entre los nucleótidos de -454 a -323, y la segunda región se encuentra entre los dos principales sitios de inicio de la transcripción de +1 a +271. Esta disposición tan particular del promotor del gen humano de TGF- β 1 sugiere un patrón complejo de regulación de su expresión. Las dos regiones contienen secuencias homólogas a elementos de respuesta TRE, lo que sugiere que pueden actuar como un elemento enhancer que inducen la transcripción por el tratamiento de las células con ésteres de forbol como el TPA. Se ha demostrado que los elementos TRE funcionan como sitios de unión para el factor de transcripción AP-1, el cual media la inducción de la transcripción por ésteres de forbol [126]. En ambas regiones de respuesta específica del promotor de TGF- β 1, la auto-inducción es mediada por la unión del complejo AP-1 [126]. La inducción de la expresión del gen *c-jun* por TGF- β 1, así como la auto-inducción de *c-jun*,

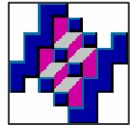


puede aumentar la transcripción de TGF- β 1 durante el desarrollo normal y el proceso de oncogénesis [127]. El control de la regulación transcripcional de TGF- β 1 también puede ser mediada por otros elementos reguladores. Una secuencia similar a la secuencia consenso del elemento NF-1 se ha identificado en la posición de -260 a -240 en el promotor de TGF- β 1, sin embargo no parece tener una función importante en el mecanismo de auto-inducción de TGF- β 1 [124]. Es de llamar la atención la presencia de 11 secuencias consenso para el factor de transcripción Sp1, de las cuales se ha demostrado que 7 son funcionales. Estas 7 secuencias se encuentran localizadas en el promotor central de TGF- β 1 antes del primer sitio de inicio de la transcripción.

V.8. REGULACION GENICA DE TGF- β 1

Como se ha mencionado anteriormente, las funciones de TGF- β 1 son múltiples y variadas, y los mecanismos de regulación de expresión de esta citocina ocurren a nivel transcripcional, a nivel post-transcripcional y a nivel post-traduccional. La desregulación de la expresión de TGF- β 1 está implicada en la patogénesis de muchas enfermedades incluyendo enfermedades autoinmunes, procesos de fibrosis, y procesos de carcinogénesis. Con respecto a las cinco diferentes isoformas de TGF- β , la regulación de la transcripción de cada una de ellas es diferente e independiente, ya que cada gen contiene sus propias regiones reguladoras las cuales son selectivamente activadas por señales específicas durante la activación, proliferación y diferenciación celular [124].

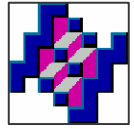
En relación a los mecanismos de regulación transcripcional de TGF- β 1, se han realizado avances importantes y uno de ellos consiste en la identificación del RNAm de TGF- β 1 [128, 129]. Se ha realizado el análisis del tamaño de los transcritos del RNAm del gen humano de TGF- β 1 y se ha demostrado que el transcrito principal tiene una longitud de 2136 pb, aunque originalmente se reportó un transcrito de tamaño más corto [129]. En este sentido, varios estudios han documentado la presencia de transcritos de TGF- β 1 de menor tamaño en células humanas. Uno de los eventos que puede explicar la reducción en el tamaño del RNAm es por el proceso de poliadenilación que puede ocurrir en diferentes sitios en el extremo 3' del gen. Por ejemplo, en la secuencia ATTAAA de la posición +2136 y no en la secuencia AATAAA de la posición +2517 [129]. Adicionalmente, el hecho de que el promotor del gen de TGF- β 1 contenga varios sitios de inicio de la transcripción, los cuales son usados



de manera diferencial en la expresión de TGF- β 1, también puede explicar la variación en la longitud de los diferentes transcritos [128, 129].

Otro aspecto de regulación a nivel transcripcional de la expresión génica de TGF- β 1 consiste en las interacciones de los factores de transcripción con los diferentes elementos reguladores descritos en el promotor de este gen. Se ha reportado la inducción de la actividad promotora de TGF- β 1 por los oncogenes *jun*, *fos*, *ras* y *tax*; por el gen E1A de adenovirus, así como por pRb de manera positiva o negativa dependiendo del tipo celular [122-126]. Adicionalmente, uno de los mecanismos más estudiados de la regulación del promotor de TGF- β 1, es por el factor de transcripción Sp1 [132]. Como se comentó anteriormente, los transductores de señales Smads translocan al núcleo e interaccionan con el promotor de TGF- β 1 por asociación con el factor de transcripción Sp1. Por ensayos de doble híbrido de la proteína Sp1 fusionada al dominio de unión al DNA de Gal4, se ha demostrado la interacción del factor de transcripción Sp1 con el promotor del gen humano de TGF- β 1 [132]. Esta interacción se ha observado que ocurre de manera específica con las secuencias consenso CCGCCCC presentes en el promotor central y que corresponden a los elementos de respuesta para el factor de transcripción Sp1. La familia de los factores de transcripción Sp1 no funciona como factores para transcribir a genes constitutivos. En lugar de ello funcionan en asociación con proteínas de unión a enhancers como factores específicos de promotores. En este contexto, la especificidad del promotor de TGF- β 1 puede ser activada por la interacción de Sp1 con otras proteínas de unión a enhancers, con co-activadores, o con co-represores transcripcionales con Smads. Por lo tanto, estas evidencias sugieren que Sp1 además de ser un componente de la maquinaria de transcripción de muchos genes, también representa un factor acoplador importante para regular la expresión del gen de TGF- β 1 por interacción con co-activadores o corepresores (**Figura 10**) [132].

La regulación post-transcripcional representa otro nivel importante de control de la regulación de la expresión de TGF- β 1 [127]. Se ha identificado que la región 5'-UTR (UTR Untranslation) de TGF- β 1 tiene una función importante en la regulación post-transcripcional. El RNAm correspondiente al 5'-UTR tiene un tamaño de 840 nucleótidos y es rico en secuencias GC. Evidencias experimentales han demostrado que al insertar la secuencia de +11 a +147 del 5'-UTR del gen de TGF- β 1 en el 5'-UTR del gen de la hormona de crecimiento, se inhibe la expresión del gen heterólogo de manera célula-



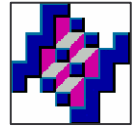
específica [127]. Además, el análisis del extremo 5'-UTR del gen de TGF- β 1 ha permitido identificar estructuras secundarias del tipo tallo-asa estables que comprenden del nucleótido de +49 a +76. Se ha demostrado que estas estructuras son suficientes para inhibir tanto la expresión de TGF- β 1 como la expresión de genes heterólogos. Adicionalmente, esta estructura tallo-asa puede servir como un sitio de unión para factores de transcripción específicos para cada tipo celular [127]. Sin embargo, se requieren de futuros estudios para entender los mecanismos moleculares a través de los cuales, las proteínas de unión al DNA pueden modular la expresión post-transcripcional de TGF- β 1 en las estructuras secundarias de sus transcritos. El control de la síntesis de TGF- β 1, particularmente por esteroides y moléculas relacionadas, es frecuente también a nivel post-transcripcional [130, 131].

Por lo tanto, estas evidencias ponen de manifiesto que los mecanismos y niveles de regulación de la expresión génica de TGF- β 1 pueden explicar las múltiples funciones de esta citocina durante las diversas respuestas celulares. Por lo que las respuestas celulares a la inducción por TGF- β 1 comprende la integración de los mecanismos moleculares de regulación génica y los procesos celulares involucrados.

V.9. TRANS-REGULACION DE GENES CELULARES POR LAS ONCOPROTEINAS DE HPV

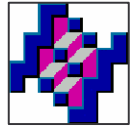
Como se mencionó anteriormente, las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 y HPV-18 tienen actividades de transformación e inmortalización celular, principalmente por su interacción con las proteínas celulares supresoras de tumores p53 y pRb. Por lo tanto, E6 y E7 juntas ejercen sus efectos sobre el control del ciclo celular y en consecuencia inmortalizan y transforman eficientemente a queratinocitos humanos normales [133]. Estas propiedades tumorigénicas son en gran medida responsables del potencial oncogénico y anti-apoptótico de E6 y E7. Sin embargo, se ha reportado que E6 y E7 tienen actividades adicionales independientes de su interacción con p53 y pRb, que contribuyen al avance del proceso neoplásico.

Recientemente se ha demostrado que E6 y E7 tienen propiedades de transformación celular a través de un mecanismo de trans-regulación de genes heterólogos [9-12]. Este mecanismo se ha



documentado por la influencia que tienen las oncoproteínas E6 y E7 de HPV en la activación de diferentes promotores de genes celulares. Esta condición tiene como resultado la desregulación de la expresión de diferentes familias de genes como los genes de respuesta a interferón, genes estimulados por el factor transcripcional NF- κ B, y genes que participan en la progresión del ciclo celular y síntesis de DNA [133]. En este sentido se ha documentado que E6 y E7 de HPV disminuyen la expresión de IFN- α e IFN- β , reprimen la expresión del factor nuclear STAT-1 y disminuyen la unión de STAT-1 al elemento de respuesta estimulado por IFN. Además, inducen la expresión de genes que codifican para componentes funcionales de la vía de transducción de señales inducida por NF- κ B como p50, NIK; y de proteínas que interaccionan con TRAF (TRAF TNF Response Association Factors) [133]. Por lo tanto, este evento de transregulación de genes celulares por parte de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV sugiere que estas oncoproteínas pueden contribuir a la evolución del proceso de carcinogénesis de una manera independiente de su interacción con p53 o pRb.

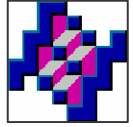
Adicionalmente, se ha descrito que la oncoproteína E6 de HPV-16 puede inducir la actividad del promotor del gen humano de TGF- β 1 a través de una secuencia rica en GC en fibroblastos humanos [134]. Los resultados de este estudio sugieren que E6 puede inducir la actividad promotora de TGF- β 1, mientras que no se ha demostrado que E7 pudiera tener efectos significativos de trans-regulación de este mismo gen. En este mismo estudio se reportó que una secuencia rica en GC podría ser una secuencia blanco en el DNA para inducir la actividad promotora de TGF- β 1 por influencia de E6. Además, se demostró por mutaciones de la oncoproteína de E6 que la región NH-terminal es crítica para la inducción del promotor de TGF- β 1, específicamente entre los aminoácidos de 123 a 136 de E6 de HPV-16. Por lo tanto, estas evidencias apoyan la hipótesis de que existe un mecanismo molecular de regulación de la expresión génica de TGF- β 1 por influencia del oncogen E6 de HPV-16; pero no demuestra si E6 de HPV-16 regula de manera directa o indirecta el promotor del gen humano de TGF- β 1. Además, hasta este momento no se ha demostrado que E7 de HPV-16 tenga algún efecto sobre la regulación transcripcional del gen de TGF- β 1. Por lo tanto, estos aspectos requieren ser estudiados con mayor detalle y profundidad.



VI. JUSTIFICACION

El cáncer cérvico uterino representa un problema de salud en México, no solo por la alta tasa de incidencia de esta enfermedad en la población femenina, sino también por los altos índices de mortalidad. La infección por HPV es el principal factor etiológico de esta neoplasia. Sin embargo, aunque es un evento necesario, no es una condición suficiente para la evolución exitosa del cáncer cérvico uterino. Las propiedades de transformación e inmortalización celular inducidas por los oncogenes E6 y E7 de HPV permiten proponer que estas oncoproteínas son las responsables directas del desarrollo del cáncer cérvico uterino. Además, son un buen modelo de análisis para el estudio de la carcinogénesis viral, y representan un blanco idóneo para el diseño de estrategias terapéuticas contra el cáncer cérvico uterino. Por otra parte, el desarrollo de una eficiente respuesta inmune anti-tumoral constituye un elemento de gran importancia para contrarrestar el avance del cáncer cérvico uterino; lo cual es evidente por el alto porcentaje de regresiones espontáneas de lesiones inducidas por HPV, y la alta incidencia de estas lesiones en pacientes inmunosuprimidos.

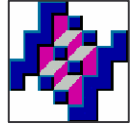
Uno de los aspectos importantes en el contexto de la regulación del ciclo celular, en la expresión diferencial de genes, y en la inducción de la respuesta inmune anti-tumoral durante el cáncer cérvico uterino; consiste en el conocimiento de las funciones que tiene TGF- β 1, así como de los mecanismos moleculares que regulan la expresión génica de esta citocina. La acción de TGF- β 1 en la respuesta inmune durante el cáncer cérvico uterino puede tener efectos inmunopotenciadores o bien inmunorrepresores, los cuales dependen del tipo de infección por HPV, del grado de avance del tumor, y del blanco celular sobre el que actúa. Alteraciones en la expresión de algunos de los componentes de la vía de transducción de señal inducidos por TGF- β 1, o en los mecanismos de regulación de la expresión del gen de esta citocina se asocian con el avance de los tumores. Por otra parte, recientemente se ha evidenciado que las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 tienen actividades tumorogénicas adicionales e independientes de su asociación con p53 y pRb. Estas propiedades adicionales se han demostrado por la capacidad que tienen E6 y E7 de trans-regular la expresión de genes celulares. No obstante, hasta este momento no se ha identificado con precisión cual es el mecanismo por el cual se lleva a cabo el proceso de trans-regulación de genes celulares por parte de E6 y E7 de HPV. Por lo tanto, este escenario pone de manifiesto que para comprender mejor la inducción



de una eficiente respuesta inmune anti-tumoral durante el desarrollo del cáncer cérvico uterino, la expresión diferencial de genes, y la regulación del ciclo celular; es necesario analizar los eventos moleculares que están involucrados en la regulación de la expresión génica de una de las citocinas que tiene funciones inmunorreguladoras relevantes en estos procesos celulares, y que se encuentra estrechamente asociada con la evolución del cáncer cérvico uterino, como es la citosina de TGF- β 1.

VII. HIPOTESIS

El HPV se ha identificado como el agente etiológico del cáncer cérvico uterino y las oncoproteínas E6 y E7 de HPV son las que tienen las principales propiedades de transformación e inmortalización celular. Además, E6 y E7 tiene la capacidad de trans-regular la expresión de genes celulares. Por otra parte, hay una correlación entre el desarrollo del cáncer cérvico uterino y la expresión de TGF- β 1, lo cual puede contribuir a la inducción de un estado de inmunosupresión local. Por lo tanto, se propone que durante el desarrollo del cáncer cérvico uterino parte de los mecanismos moleculares que participan en la regulación de la expresión génica de TGF- β 1 pueden ser a nivel transcripcional, por interacción de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 con el promotor del gen humano de TGF- β 1.



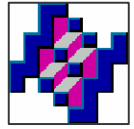
VIII. OBJETIVOS

VIII.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente estudio es identificar los mecanismos moleculares que regulan la expresión génica de TGF- β 1, por la acción de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV-16, a través del análisis del promotor del gen que codifica para esta citocina, en células cervicales tumorales humanas transformadas con HPV.

VIII.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1). Clonar la región reguladora 5' no codificante del gen humano de TGF- β 1.
- 2). Hacer el análisis de los elementos reguladores presentes en la región reguladora del gen de TGF- β 1.
- 3). Evaluar la funcionalidad del promotor de TGF- β 1 por deleciones progresivas del promotor acopladas a genes reporteros.
- 4). Identificar las secuencias de DNA y los complejos de interacción DNA-proteína en el promotor de TGF- β 1 inducidos por la presencia de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16.
- 5). Correlacionar los efectos funcionales y las interacciones DNA-proteína para identificar los eventos moleculares, como factores transcripcionales celulares y/o virales, que participan en la regulación de la expresión génica de TGF- β 1 en células cervicales tumorales humanas.



IX. METODOLOGIA

IX.1. CELULAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

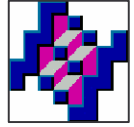
Se utilizaron células cervicales tumorales humanas transformadas con HPV-16 (CaSki y SiHa), con HPV-18 (HeLa), y células no infectadas con HPV (C33A); las cuales fueron adquiridas del ATCC (ATCC American Type Culture Cells). Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA.) suplementado con 10% de suero bovino fetal, antibiótico-antimicótico, en una atmósfera de 5% de CO₂, a 37°C, a una densidad celular de 2.5 a 5 x 10⁶ células. Las células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) se obtuvieron de individuos sanos y fueron separadas por centrifugación por gradiente con Ficoll-Hypaque, y cultivadas en medio RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA.) suplementado con 10% de suero bovino fetal. Se realizaron las preparaciones de los extractos nucleares a partir de los cultivos de las líneas celulares, como se indica más adelante.

IX.2. ENSAYO DE ELISA

La producción de TGF-β1 soluble fue evaluada por un kit de ELISA en el medio de cultivo de todos los tipos celulares y normalizada a una cantidad de 1 x 10⁶ células, de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Quantikine RD System). La concentración de proteína fue determinada por el kit BCA protein (Pierce, Rockford, IL.) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

IX.3. AMPLIFICACION POR PCR DE LA REGION REGULADORA 5' DEL GEN HUMANO DE TGF-β1

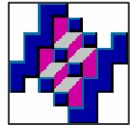
La amplificación por PCR se realizó de acuerdo al método descrito previamente [135]. Brevemente, a partir de 1 µg de DNA de CMNSP se adicionó a una mezcla de reacción de 50 µl que contiene 10 mM de dNTPs, 30 pMol de los primers que delimitan la región reguladora 5' de TGF-β1, 2 µl de DMSO concentrado y 2 µl de BSA (10 mg/ml). La mezcla de reacción se incubó a 94 °C por 10 min antes de adicionar 5 U de la enzima Taq DNA polimerasa. Para amplificar la secuencia de DNA de interés se normalizó el número de ciclos de amplificación en el rango de 30 a 40 ciclos en el



termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf. Se diseñaron y sintetizaron los oligonucleótidos sentido y anti-sentido que delimitan la región reguladora 5' del gen de TGF- β 1. El oligonucleótido sentido fue 5'- T T T G G A T C C T T A G C A G G G G A G T A A C A T G G A T T T -3' que corresponde de la región de -1362 a -1338, y el oligonucleótido anti-sentido fue 5'- T T T G G A T C C A C T G C C G A G A G C G C G A A C A G G G C T -3' que corresponde de la región de +795 a +819. Las condiciones del programa de amplificación por PCR fueron las siguientes: 94°C por 1 min, 50°C por 45 seg y 72°C por 2 min durante 30 ciclos, seguido por 72°C por 10 min. El producto de amplificación obtenido fue un fragmento de DNA de 2181 pb que se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La identidad de la secuencia del producto de amplificación fue verificada por el patrón de fragmentos de restricción y por secuenciación de DNA.

IX.4. ANALISIS POR RT-PCR SEMICUANTITATIVO

Las células fueron cosechadas y procesadas para el aislamiento de RNA total usando el reactivo de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA.). Brevemente, 1×10^6 células se homogenizaron en 1 ml de Trizol. El RNA total se precipitó de la fase acuosa por adición de isopropanol, se lavó y disolvió en agua-DEPC (DEPC Dietil PiroCarbonato) para su posterior uso. Se obtuvo el RNAm con el uso del primer dT₁₂₋₁₈ y la síntesis de cDNA fue realizada por la incubación con la reverso transcriptasa RT-MMLV (Invitrogen, Carlsbad, CA.) por 1 h a 37°C. La expresión del RNAm de TGF- β 1 fue medida por RT-PCR semicuantitativo usando los oligonucleótidos sentido 5'- G C C C T G G A C A C C A A C T A T T G C T -3' y anti-sentido 5'- A G G C T C C A A A T G T A G G G G C A G G -3'. Las condiciones del programa de amplificación por PCR fueron las siguientes: 94°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min durante 27 ciclos seguido de 72°C por 10 min. Se obtuvo un fragmento de DNA de 160 pb. El gen constitutivo de β -actina fue usado como control interno y los oligonucleótidos utilizados fueron el sentido 5'-G T G G G G C G C C C C A G G C A C C A -3' y el anti-sentido 5'- C T C C T T A A T G T C A C G C A C G A T T T C -3'. Las condiciones del programa de amplificación por PCR fueron las siguientes: 94°C por 1 min, 58°C por 1 min y 72°C por 1 min durante 25 ciclos seguido por 72°C por 10 min. Se obtuvo un fragmento de DNA de 540 pb. Para cada amplificación por PCR se utilizaron 1 μ g de cDNA, 2.5 mM de dNTPs, 30 pMol de los primers y 5 U de la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA.) en un volumen de reacción de 50 μ l. Para asegurarse que la reacción de

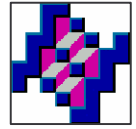


amplificación permaneció en el rango lineal, se realizaron diluciones seriadas 1:5 del cDNA. Se realizó el análisis por densitometría de los niveles de expresión de TGF- β 1 normalizado con los niveles de expresión de β -actina. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

IX.5. ESTRATEGIA DE CLONACION Y CONSTRUCCIONES DE PLASMIDOS

La región reguladora del gen humano de TGF- β 1 fue obtenida por amplificación por PCR a partir de DNA genómico de CMSP de individuos sanos como previamente se describió. El fragmento de 2181 pb de DNA amplificado fue digerido con *Pst I* para obtener un fragmento de DNA de 1903 pb, el cual contiene 1132 pb antes y 771 pb después del primer sitio de inicio de la transcripción. El fragmento de DNA de 1903 pb fue clonado en el vector reportero pBLCAT3 el cual carece de una secuencia promotora y está acoplado el gene reportero de CAT (CAT cloranfenicol acetil transferasa). Se generaron diferentes construcciones de plásmidos (pTGFs) por deleciones progresivas del promotor de TGF- β 1 (**Figura 11**). El diseño de las construcciones fue realizado en base a las ubicaciones de los elementos reguladores y a la posición de los diferentes sitios de restricción. La construcción pTGF1 (de -1132 a +771) fue generada por clonación del fragmento completo de 1903 pb en el sitio *Pst I*. La construcción pTGF2 incluye un inserto de DNA de 1089 pb (de -319 a +771) el cual fue clonado en los sitios *Bst EII* y *Pst I*. La construcción pTGF3 contiene un fragmento de DNA de 813 pb (de +42 a +771) y fue generada por clonación en los sitios *Eag I* y *Pst I*, y no contiene el promotor central de TGF- β 1 ni el primer sitio de inicio de la transcripción. La construcción pTGF4 fue producida por clonación de un fragmento de DNA de 1543 pb (de -1132 a -318 y de +11 a +771) en los sitios *Pst I* y *Bst EII* y en los sitios *Eag I* y *Pst I* con deleción del promotor central de TGF- β 1 y del primer sitio de inicio de la transcripción. La construcción pTGF5 contiene solo el promotor central de TGF- β 1 (de -650 a +36) el cual fue clonado en el sitio *Apa I*. La construcción pTGF6 contiene dos copias en tandem del promotor central de TGF- β 1 (de -650 a +36) clonadas en el sitio *Apa I*. La construcción pTGF7 contiene dos copias en tandem del promotor central de TGF- β 1 pero en orientación invertida (de +36 a -650) (**Figura 11**). La integridad de las construcciones fue verificada por el análisis del patrón de restricción.

Adicionalmente, fueron generadas varias construcciones de plásmidos por mutagénesis dirigida con el promotor central de TGF- β 1 (de -650 a +36) en las cuales fueron generadas mutaciones puntuales

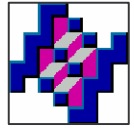


en las secuencias de reconocimiento para el factor de transcripción Sp1 (pSp1-wt, pSp1a-mt, pSp1b-mt, pSp1c-mt, pSp1d-mt y pSp1e-mt) (**Figura 12**). La integridad de las construcciones mutantes fue verificada por secuenciación del DNA. A partir de las construcciones obtenidas se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α y las bacterias transformadas se seleccionaron por crecimiento de colonias blancas en medio de cultivo sólido LB que contiene IPTG y X-gal. Se realizó la extracción de plásmidos a gran escala por el método de lisis alcalina [135] y los plásmidos purificados se almacenaron hasta su utilización en los ensayos funcionales de transfección.

IX.6. TRANSFECCION DE DNA Y EXPERIMENTOS DE CAT

Las células cervicales tumorales C33A (HPV-) fueron transfectadas transitoriamente con las construcciones que contienen el promotor de TGF- β 1 (pTGFs) generadas previamente. Las transfecciones fueron realizadas con el reactivo Lipofectamina-Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA.) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Todas las transfecciones fueron hechas con 20 μ g de DNA plasmídico total. En cada transfección 1 μ g del plásmido que expresa β -galactosidasa (lacZ), que está regulada por el promotor de β -actina, fue incluido como plásmido de normalización. Las células fueron incubadas con medio DMEM libre de suero y con Lipofectamina por 8 h, lavadas y resuspendidas en DMEM que contiene 10% de suero bovino fetal. Las células fueron cosechadas a las 48 h después de la transfección y los extractos nucleares fueron realizados en 100 μ l de buffer Tris-HCl pH 8.0, 0.25 M. En general 5 μ g de los extractos nucleares fueron usados para los ensayos de la actividad de β -galactosidasa. El nivel de la actividad de β -galactosidasa no fue afectado por la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV-16 cuando las células C33A fueron co-transfectadas con los plásmidos de expresión pSV2E6 y pSV2E7; por lo que la actividad del gen reportero CAT en todos los ensayos fue normalizada en relación a la actividad de β -galactosidasa.

Los ensayos de co-transfección fueron realizados con los plásmidos de expresión pSV2E6 y pSV2E7 los cuales fueron donados por el Dr. Yoshiike (Instituto Nacional de Salud, Tokio, Japón), y contienen el marco abierto de lectura de los oncogenes E6 y E7 de HPV-16 [136]. Todos los ensayos de transfecciones y co-transfecciones fueron repetidos tres veces de manera independiente y el promedio del porcentaje de acetilación fue calculado y es presentado como la actividad relativa de

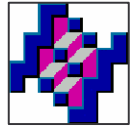


CAT. La actividad de CAT fue evaluada por el método de Nordeen como se reportó previamente [137].

IX.7. ENSAYOS DE DNasa I Y DE FOOTPRINTING

Los extractos nucleares de las células C33A fueron preparados de acuerdo al método de Dignam [145]. Brevemente, 1×10^7 células fueron resuspendidas en buffer A (20 mM de HEPES pH 8.0, 10 mM de KCl, 0.5 mM de DTT, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.5 mM de PMSF, 0.25 mM de EDTA y 0.25 mM de EGTA) y lisadas con 20 golpes en un homogenizador de cristal. Los núcleos fueron centrifugados a 2,000 rpm y resuspendidos en 2 ml de buffer C (20 mM de HEPES pH 8.0, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.5 mM de DTT, 0.25 mM de PMSF, 0.25 mM de EDTA, 0.25 mM de EGTA, 420 mM de NaCl y 50% de glicerol) y lisados con el homogenizador de cristal como se mencionó anteriormente. La suspensión fue centrifugada a 12,000 rpm por 2 min y el sobrenadante fue dividido en alícuotas y almacenadas a $-70^\circ C$. La concentración de proteínas fue determinada por el kit BCA protein (Pierce, Rockford. IL.).

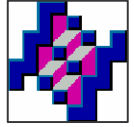
Los ensayos de Footprinting fueron realizados como se describió previamente [135, 139] y la sonda de DNA que se utilizó corresponde al promotor central de TGF- β 1 (de -650 a +36). Este fragmento de DNA fue clonado en el plásmido pGEM11Z (Promega, Madison, WI.) y digerido con *Bam HI* y *Hind III*. La sonda fue incubada con la DNA polimerasa I fragmento Klenow y con 30 μCi de dGTP- $[\alpha\text{-}^{32}P]$. Las secuencias A+G y G fueron determinadas con el método de secuenciación de modificación de bases de Maxam y Gilbert [135] usando DMS y piperidina (Sigma). Las muestras fueron tratadas con buffer DMS-stop (1.5 mM de acetato de sodio pH 7.0, 1 M de β -mercaptoetanol, y 250 $\mu g/ml$ de glicógeno) y precipitadas con etanol a $-70^\circ C$. Los precipitados de DNA fueron lavados y resuspendidos en 200 μl de piperidina 1 M fresca y calentados a $90^\circ C$ por 30 min. Las muestras fueron liofilizadas tres veces y resuspendidas en 10 μl de buffer Dye (0.1% de azul de bromofenol, 80% de formamida y 1X de TBE (0.089 M de Tris base, 0.089 M de ácido bórico y 0.02 M de EDTA pH 8.0)). Se realizaron los ensayos de interacción DNA-proteína y de digestión con DNasa I en presencia de concentraciones crecientes de extractos nucleares de células C33A no transfectadas o transfectadas con los cDNA de los oncogenes E6 y E7 de HPV-16 en buffer de unión (10 mM de HEPES pH 7.4, 25 mM de $CaCl_2$, 2% de BSA, 25 mM de KCl, 0.25 mM de EDTA, 4 mM de EGTA y 1 $\mu g/\mu l$ de poly dI-dC) y digeridas con 0.015 U de DNasa I (Whorstrington). Después de 2 min de digestión a temperatura ambiente, las muestras fueron tratadas con



solución DNasa-stop (50 mM de EDTA pH 8.0, 0.2% de SDS, 100 µg/ml de glicógeno y 100 µg/ml de proteinasa K) e incubadas a 45°C por 45 min. Posteriormente, a las muestras se les realizó tres extracciones de proteínas con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se precipitaron con etanol absoluto y se resuspendieron en 10 µl de buffer Dye. Las muestras fueron calentadas por 5 min a 98°C y fueron separadas por electroforesis por 4 h a 1800 volts en un gel de secuenciación al 6% de poliacrilamida y 6 M de urea. Los geles fueron secados a 80°C por 1 h y expuestos a películas de autorradiografía a -70°C con pantallas intensificadoras por 24 h. El análisis de Footprinting fue realizado por comparación de los carriles de A+G y G producidos por el rompimiento químico de la reacción de secuenciación, comparados con la misma sonda incubada con los extractos nucleares y por digestión con DNase I, para determinar las secuencias de nucleótidos correspondientes.

IX.8. ANALISIS DE ELECTROFORESIS CON MOBILIDAD RETARDADA (EMSA)

Los extractos nucleares fueron preparados a partir de las células C33A no transfectadas o transfectadas con los vectores pSV2E6 y pSV2E7 como se describió anteriormente. El ensayo de electroforesis con movilidad retardada EMSA (Electrophoresis Mobility Shifting Assays) fue realizado como se reportó previamente [139]. Brevemente, se sintetizó un oligonucleótido de DNA de doble cadena que contiene el sitio de unión para el factor de transcripción Sp1e. Este oligonucleótido se usó como sonda y fue marcado radioactivamente en sus extremos 5' con la enzima T4 DNA polinucleótido cinasa usando 30 µCi de APT-[γ -³²P]. La sonda fue purificada por PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) en un gel al 15%. Se realizó la incubación de la sonda marcada ($1-2 \times 10^5$ cpm) con 5 µg de extractos nucleares por 20 min a temperatura ambiente en buffer de unión (10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 50 mM de NaCl, 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA, 5% de glicerol y 1 µg de poly dI-dC). Los complejos DNA-proteína fueron identificados por electroforesis en condiciones no desnaturizantes en PAGE al 6% con bajas concentraciones isotónicas de buffer TBE al 0.5X (0.089 M de Tris base, 0.089 M de ácido bórico y 0.02 M de EDTA pH 8.0). Los geles fueron pre-corridos por 30 min a 200 volts y posteriormente las muestras fueron aplicadas y separadas en las mismas condiciones de voltaje durante 3 h. Los geles fueron secados a 80°C por 1 h y expuestos a películas de autorradiografía a -70°C con pantallas intensificadoras por 24 h. Los experimentos de competencia fueron realizados con un exceso de 100 veces la concentración molar de las sondas AP-1 y Sp1e no marcadas radioactivamente, las cuales fueron adicionadas antes de la



incorporación de la sonda Sp1e marcada. Para los experimentos de súper-retardamiento, los complejos DNA-proteína fueron formados antes de adicionar 5 μ g de los anticuerpo policlonales IgG anti-E6 y anti-E7 de HPV-16. Como control se utilizó el anticuerpo monoclonal IgG anti-IL6 irrelevante (Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA). Las muestras fueron incubadas con los anticuerpos por 4 h a 4°C y posteriormente toda la noche a temperatura ambiente antes de analizar los complejos DNA-proteína por PAGE al 6%. En la **Figura 13** se resume la estrategia experimental del estudio.

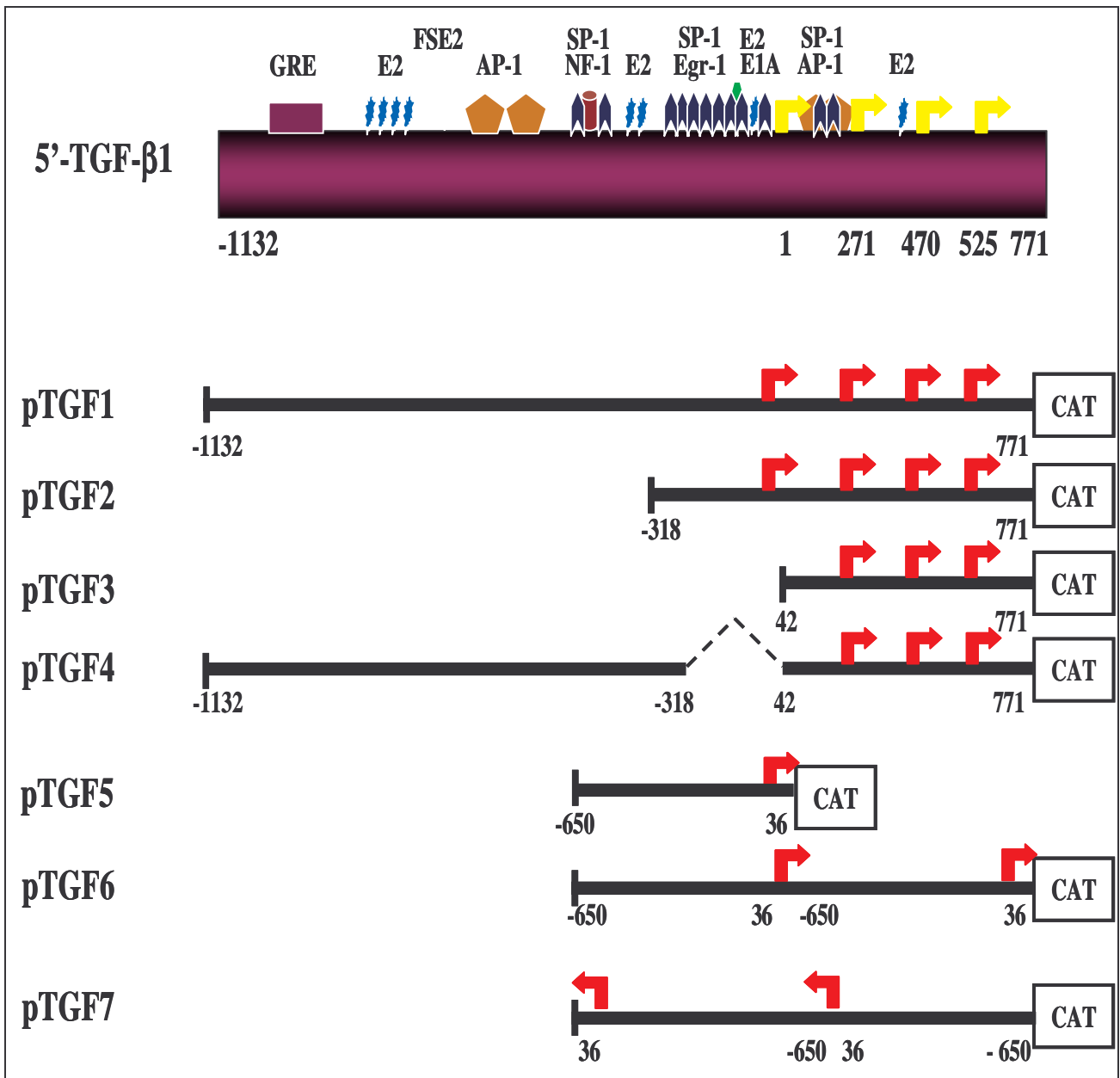
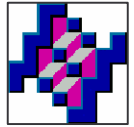


FIGURA 11. Construcciones de plásmidos pTGFs con el promotor de TGF-β1 en el vector pBLCAT3. Se generaron 7 construcciones (pTGF1, pTGF2, pTGF3, pTGF4, pTGF5, pTGF6 y pTGF7) con diferentes regiones del promotor de TGF-β1. En pTGF1 se incluyó el promotor completo. En pTGF2 se deletó parcialmente el extremo 5' y se respetaron los cuatro sitios de inicio de la transcripción. En pTGF3 se eliminó toda la región 5' incluyendo al primer sitio de inicio de la transcripción. En pTGF4 se incluyó la región 5' y se deletó parte del promotor central. En pTGF5 se incluyó únicamente el promotor central con el primer sitio de inicio de la transcripción. En pTGF6 se clonó por duplicado el promotor central. En pTGF7 se incorporó el promotor central por duplicado pero en orientación opuesta.

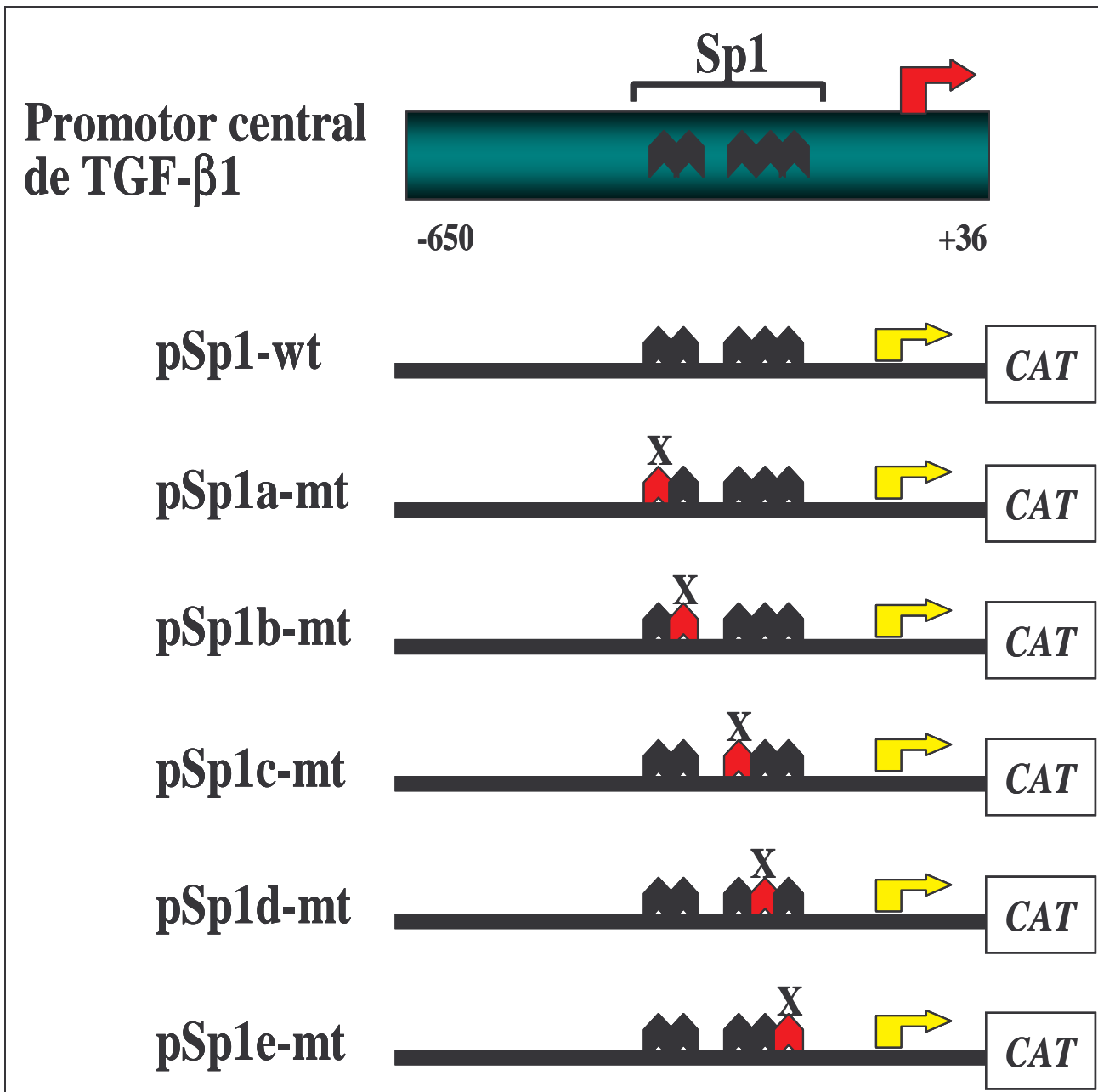
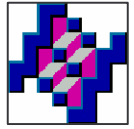


FIGURA 12. Construcciones de plásmidos pSp1-mts con el promotor central de TGF- β 1 con mutaciones en las secuencias de unión para Sp1, en el vector pBLCAT3. Se generaron 6 construcciones (pSp1-wt, pSp1a-mt, pSp1b-mt, pSp1c-mt, pSp1d-mt y pSp1e-mt) con el promotor central de TGF- β 1 (-650 a +36). En el promotor central se localizan 5 secuencias de reconocimiento para el factor de transcripción Sp1. Se generaron mutaciones no funcionales para cada una de las secuencias para Sp1 indicadas en rojo y con una "X".

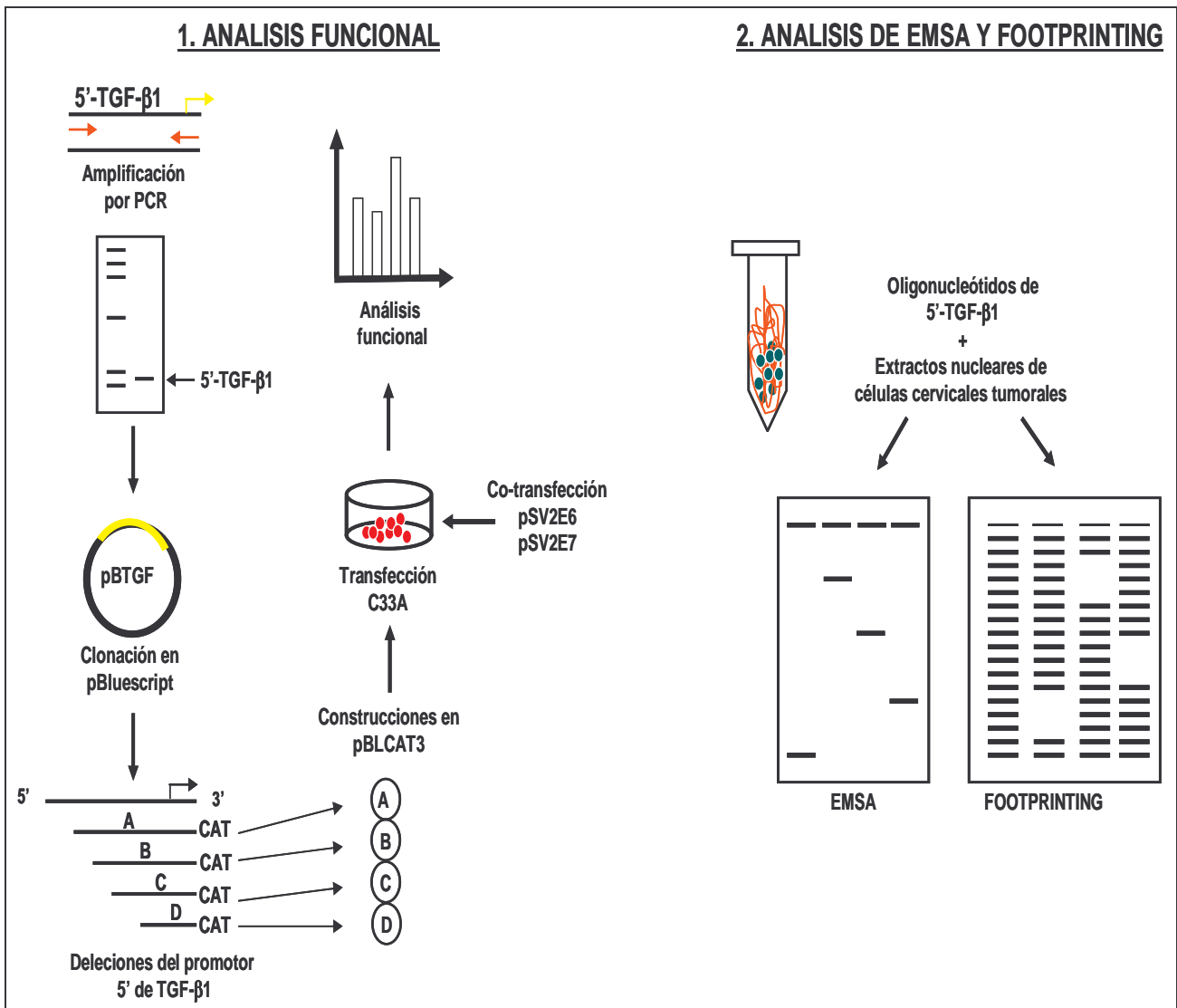
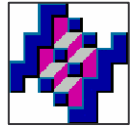
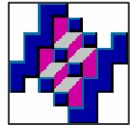


FIGURA 13. Diseño de la estrategia experimental. En el proyecto se planteó realizar dos tipos de análisis: Un análisis funcional y un análisis de interacción DNA-proteína. En el análisis funcional se propuso obtener el promotor del gene humano de TGF- β 1 y generar diferentes construcciones en el vector de expresión pBLCAT3 por deleciones progresivas del promotor. Estas construcciones se usaron para transfectar células C33A (HPV-) y evaluar el efecto de E6 y E7 de HPV-16 sobre la actividad promotora de TGF- β 1 por co-transfección con los plásmidos de expresión pSV2E6 y pSV2E7. En el análisis de interacción DNA-proteína se evaluó la formación de complejos DNA-proteínas por EMSA y por Footprinting para hacer una correlación con los datos obtenidos del análisis funcional.



X. RESULTADOS

X.1. EXPRESION DE TGF- β 1 HUMANO EN CELULAS TRANSFORMADAS CON HPV

Evidencias anteriores obtenidas por otros grupos sugieren que TGF- β 1 suprime la activación y proliferación de los linfocitos T, y probablemente está involucrado en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del huésped durante el desarrollo del cáncer cérvico uterino [140-145]. Tales hallazgos permiten proponer que existe una estrecha asociación entre la alteración de la expresión génica de TGF- β 1 y el desarrollo de lesiones ginecológicas. Con la intención de analizar el patrón de expresión de TGF- β 1 en células de cáncer cervical, en primera instancia se evaluó el nivel de expresión del RNAm de TGF- β 1 en líneas celulares humanas de cáncer cérvico uterino (HeLa, CaSKi, SiHa y C33A) por RT-PCR semicuantitativo (**Figura 14A**). Consistente con las observaciones previas realizadas por otros grupos, los niveles de expresión del RNAm de TGF- β 1 aumentaron considerablemente en las células HeLa, CaSKi y SiHa que están transformadas con HPV, en comparación con las células C33A que también son células tumorales cervicales pero que no están transformadas con HPV. No obstante, aunque la expresión del RNAm de TGF- β 1 fue observada en todas las líneas celulares, el porcentaje de expresión del RNAm se incrementó en aproximadamente dos veces en las células infectadas con HPV en comparación con las células HPV negativas (**Figura 14B**). La expresión del RNAm no tuvo cambios significativos entre las células transformadas con HPV-16 (CaSKi y SiHa) y las células transformadas con HPV-18 (HeLa).

En un intento por hacer una correlación entre los niveles de expresión del RNAm de TGF- β 1 y la síntesis de la proteína, se determinó la expresión de la proteína de TGF- β 1 soluble en todas las líneas celulares estudiadas. El análisis fue normalizado por la concentración de proteína (50 μ g) y por el número de células (1×10^6 células) (**Figura 15**). Los resultados mostraron que la síntesis de la proteína de TGF- β 1 aumentó por arriba de 1,000 pg/ml en las células transformadas con HPV, mientras que en las células no transformadas con HPV el nivel de expresión fue menor a 600 pg/ml. Estos datos fueron consistentes con los niveles de expresión del RNAm de TGF- β 1. Por lo tanto, este resultado sugiere que las células transformadas con HPV son específicamente capaces de mediar la activación transcripcional de TGF- β 1 en respuesta a la expresión de las oncoproteínas de HPV16 y HPV-18.

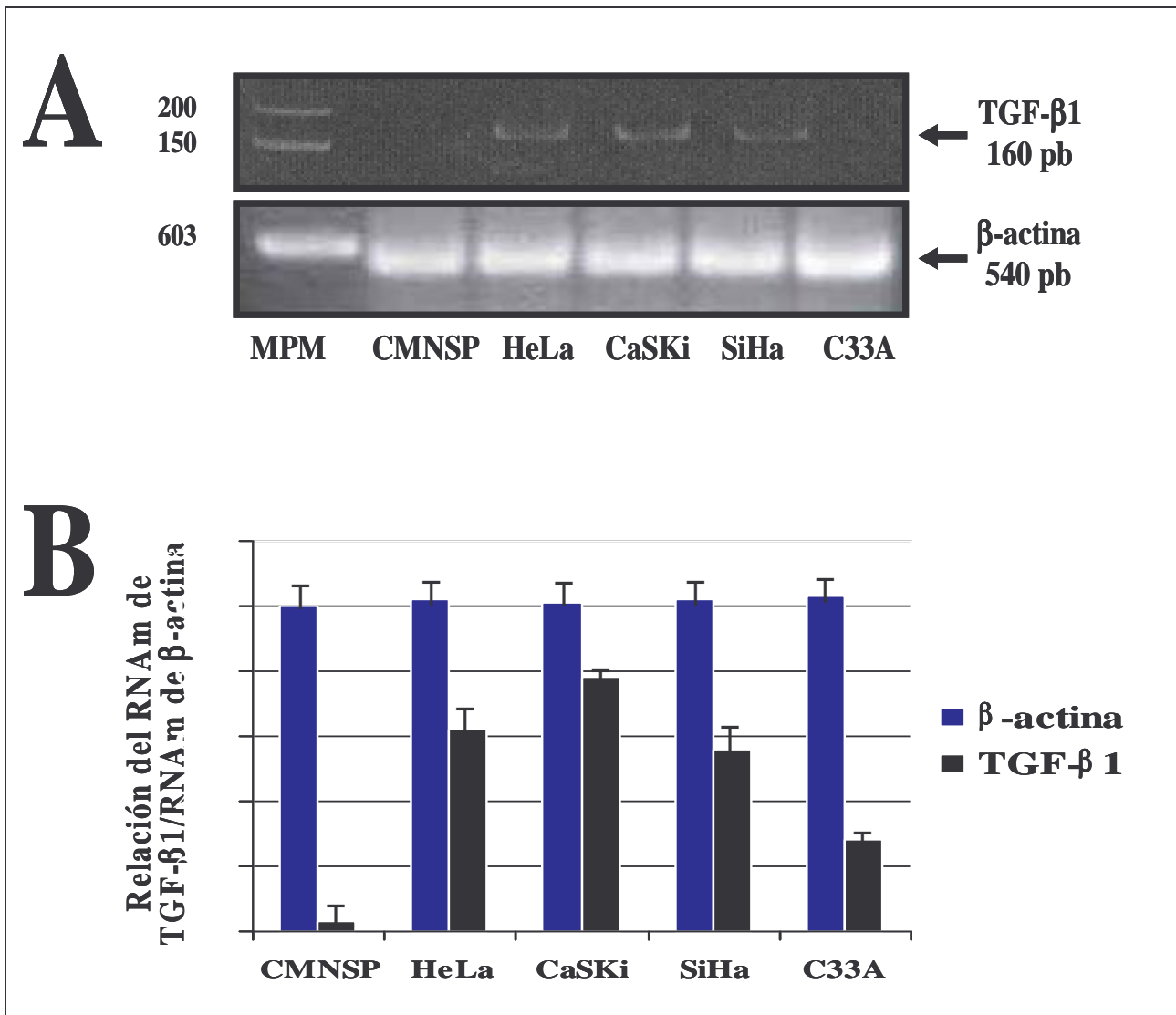
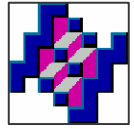


FIGURA 14. Expresión del gen humano de TGF- β 1 en células cervicales tumorales humanas. A. Análisis de expresión del gen de TGF- β 1 por RT-PCR semicuantitativo en líneas celulares de cáncer cérvico uterino transformadas por HPV-18 (HeLa), HPV-16 (CaSKi, y SiHa) y en células C33A que no están transformadas con HPV. El DNA de CMNSP de donadores sanos se uso como control interno. Las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Como marcadores de peso molecular (MPM) se utilizaron el DNA de escalera de 50 pb y el DNA de ϕ X174/*Hae III*. **B.** Las bandas del panel A fueron digitalizadas y analizadas por densitometría y los datos fueron analizados por la relación de expresión del RNAm de TGF- β 1/RNAm de β -actina. Los ensayos fueron realizados por triplicado y se muestra un experimento representativo reproducible.

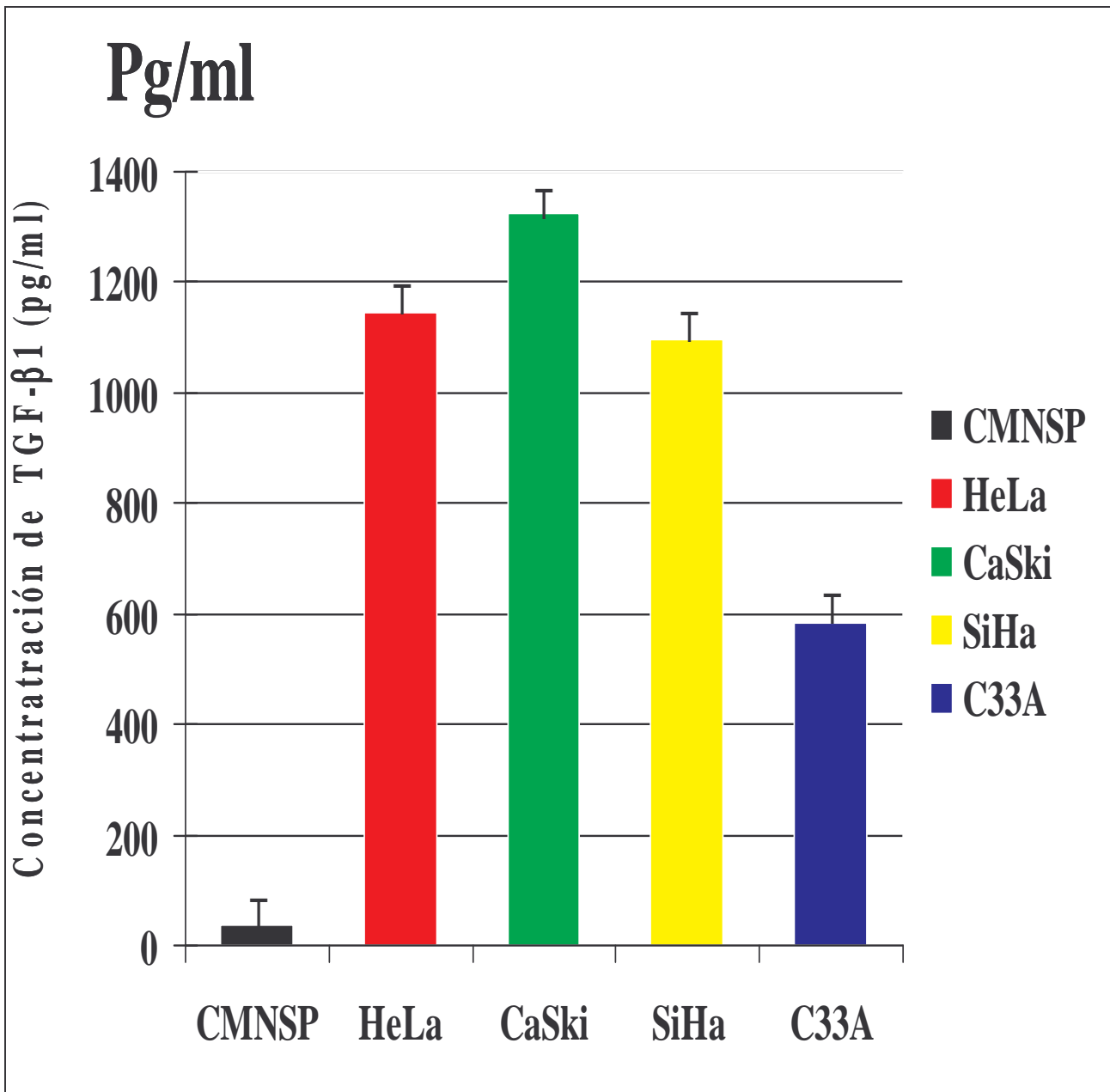
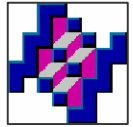
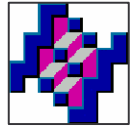


FIGURA 15. Análisis de la síntesis de la proteína de TGF-β1 humana por ELISA. Se realizó la cuantificación de la síntesis de la proteína de TGF-β1 en los sobrenadantes de los cultivos de las líneas celulares analizadas en la Figura 14. Se normalizó el ensayo de ELISA por la cantidad de células en cultivo (1×10^6) y por la concentración de proteína (50 mg). Las CMNSP de donadores sanos se usaron como control interno. Los ensayos fueron realizados por triplicado y se muestra un experimento representativo reproducible.



X.2. OBTENCION DE LA REGION PROMOTORA DEL GEN HUMANO DE TGF- β 1

Con la intención de analizar si la regulación de la expresión del gen de TGF- β 1 ocurre a nivel transcripcional, y si es inducida por la expresión de los oncogenes del HPV en las células tumorales cervicales; se realizó la obtención de la región promotora del gen humano de TGF- β 1. La secuencia del promotor de TGF- β 1 ya fue previamente reportada por Kim et al [122] y se encuentra disponible en la base de datos del GenBankTM/EMBL con número de acceso: J04431. A partir de la secuencia del promotor de TGF- β 1, se realizó el diseño de los oligonucleótidos sentido (de -1362 a -1338) y anti-sentido (de +795 a +819) que delimitan un fragmento de DNA de 2181 pb. Con estos oligonucleótidos se estandarizaron las condiciones de amplificación por PCR y se obtuvo un producto de DNA de 2181 pb (**Figura 16**). Se realizó el análisis en sílico del patrón de restricción del fragmento de DNA de 2181 pb usando las enzimas *Apa I*, *Hinc II* y *Xba I*; para predecir el patrón de restricción esperado. En el análisis del patrón de restricción se obtuvieron los siguientes fragmentos de DNA: Para *Apa I* se obtuvieron 3 fragmentos de DNA de 783, 713, 685 pb, para *Hinc II* se obtuvieron 2 fragmentos de DNA de 1271 y 910 pb, y para *Xba I* se obtuvieron 2 fragmentos de DNA de 1549 y 632 pb (**Figura 17**). En relación al análisis de secuenciación de DNA, no se identificaron mutaciones, deleciones o inserciones de secuencias en el DNA que fueran distintas a la secuencia originalmente reportada (**Figura 18**). Por lo tanto, los datos obtenidos demuestran que el producto de amplificación de DNA corresponde a la región promotora del gen humano de TGF- β 1. A partir de la obtención del promotor de TGF- β 1, se realizó la digestión de este fragmento con la enzima *Pst I* para obtener un fragmento de 1903 pb con extremos *Pst I*, el cual se clonó en el vector pBluescript SK para obtener la construcción pBTGF (**Figura 19**). Los datos muestran que al hacer el análisis del patrón de restricción de la construcción pBTGF por digestión con *Pst I*, se produjo la liberación del inserto que corresponde al fragmento de DNA de 1903 pb, y la linearización del vector pBluescript SK de 2961 pb. El análisis del patrón de restricción de la construcción pBTGF con las enzimas *Apa I*, *Hinc II* y *Xba I* permitió obtener los fragmentos de restricción que corresponden a los tamaños esperados analizados previamente por sílico; así como determinar la orientación del inserto que corresponde al promotor de TGF- β 1 en la construcción pBTGF. Estos resultados permiten confirmar la identidad e integridad del fragmento de DNA amplificado que corresponde efectivamente a la secuencia de la región promotora del gen humano de TGF- β 1 originalmente reportada [122].

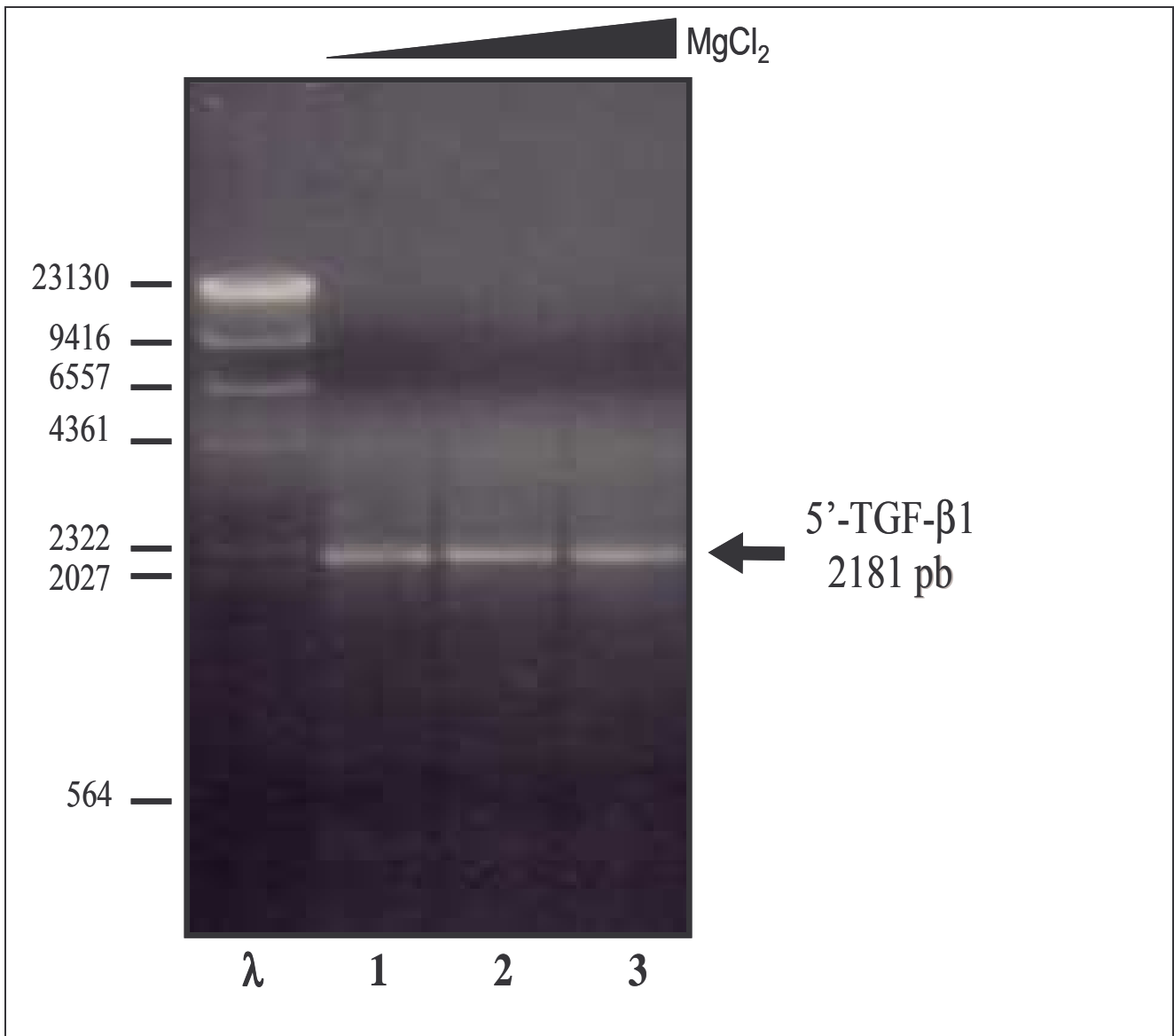
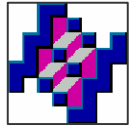


FIGURA 16. Amplificación por PCR de la región promotora del gen humano de TGF-β1. Se realizó el diseño de los oligonucleótidos sentido y antisentido en base a la secuencia reportada del banco de datos GenBankTM/EMBL con número de acceso J04431. A partir de estos oligonucleótidos se estandarizó el protocolo de amplificación por PCR y se realizó una curva de concentración de MgCl₂ de 1, 1.5 y 2 mM (carriles 1 a 3). Como marcador de peso molecular se utilizó el DNA de λ Hind III. La flecha indica el producto de amplificación de DNA de 2181 pb.

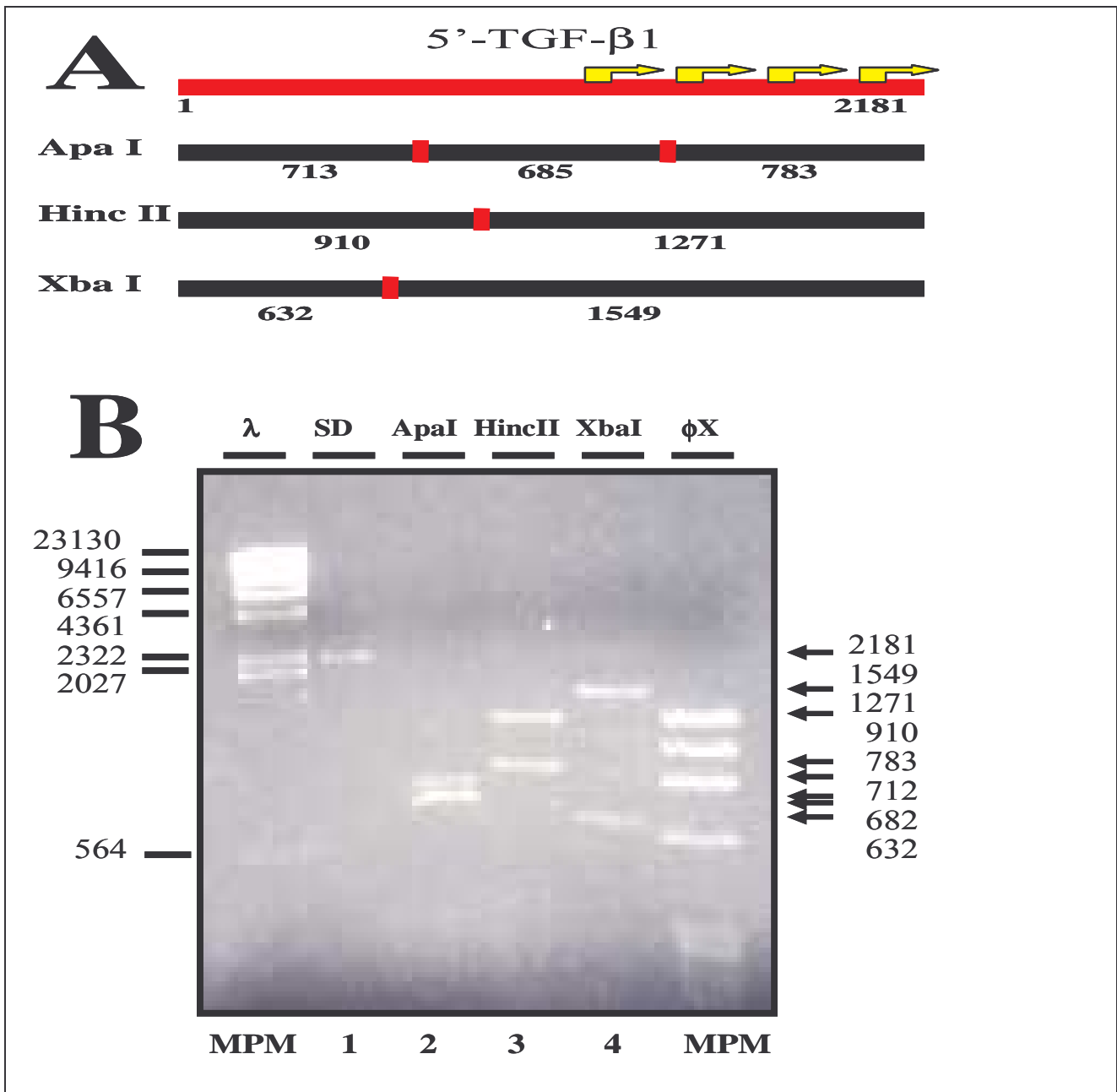
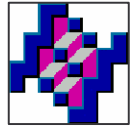
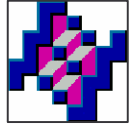


FIGURA 17. Análisis del patrón de fragmentos de restricción del promotor del gen humano de TGF- β 1. **A.** Análisis *in silico* del patrón de digestión del promotor de TGF- β 1 con las enzimas *Apa I*, *Hinc II* y *Xba I*. Se indica el tamaño de los productos esperados. **B.** Análisis por electroforesis del patrón de digestión del promotor de TGF- β 1. Los productos fueron digeridos con las enzimas *Apa I*, *Hinc II* y *Xba I* (carriles 1 al 4), y separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. SD corresponde sin digestión. Como marcadores de peso molecular (MPM) se utilizaron el DNA de λ /*Hind III* y el DNA de ϕ X174/*Hae III*. Los productos sugeridos por *in silico* correspondieron a los fragmentos de DNA esperados.



Secuencia del promotor del gen humano de TGF-β1.

gi|340526|gb|J04431.1|HUMTGFB1PR Homo sapiens transforming growth factor-beta 1 (TGFB1) gene, promoter region and 5' end Length = 2205

Score = 2411 bits (1216), Expect = 0.0
Identities = 1211/1216 (99%)
Strand = Plus / Plus

```

Query: 1      ggatccttagcaggggagtaacatggatttggaaagatcactttggctgctgtgtgggga 60
            |||
Sbjct: 1      ggatccttagcaggggagtaacatggatttggaaagatcactttggctgctgtgtgggga 60

Query: 61     tagataagacggtgggagcctagaaaggaggctgggttggaaactctgggacagaaacc 120
            |||
Sbjct: 61     tagataagacggtgggagcctagaaaggaggctgggttggaaactctgggacagaaacc 120

Query: 121    agagagggaaaagactgggcctggggtctccagtgagtatcagggagtggggaatcagcag 180
            |||
Sbjct: 121    agagagggaaaagactgggcctggggtctccagtgagtatcagggagtggggaatcagcag 180

Query: 181    gagtctggtccccacccatccctcctttccctctctctcctttcctgcaggctggcccc 240
            |||
Sbjct: 181    gagtctggtccccacccatccctcctttccctctctctcctttcctgcaggctggcccc 240

Query: 241    ggctccatttccaggtgtggtcccaggacagctttggccgctgccagcttgcaggctatg 300
            |||
Sbjct: 241    ggctccatttccaggtgtggtcccaggacagctttggccgctgccagcttgcaggctatg 300

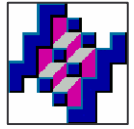
Query: 301    gattttgccatgtgccagtagcccgggacccaccagctggcctgccccacgtggcggc 360
            |||
Sbjct: 301    gattttgccatgtgccagtagcccgggacccaccagctggcctgccccacgtggcggc 360

Query: 361    ccctgggcagttggcgagaacagttggcacgggctttcgtgggtggtgggcccagctgc 420
            |||
Sbjct: 361    ccctgggcagttggcgagaacagttggcacgggctttcgtgggtggtgggcccagctgc 420

Query: 421    tgcattggggacaccatctacagtggggccgaccgctatcgctgcacacagctgctggtg 480
            |||
Sbjct: 421    tgcattggggacaccatctacagtggggccgaccgctatcgctgcacacagctgctggtg 480

Query: 481    gcaccgtgcacctggagatcggcctgctgctccgcaacttcgaccgctacggcgtggagt 540
            |||
Sbjct: 481    gcaccgtgcacctggagatcggcctgctgctccgcaacttcgaccgctacggcgtggagt 540

```



```

Query: 541 gctgagggactctgcctccaacgtcaccaccatccacacccccggacacccagtgatgggg 600
          |||
Sbjct: 541 gctgagggactctgcctccaacgtcaccaccatccacacccccggacacccagtgatgggg 600

Query: 601 gaggatggcacagtgggtcaagagcacagactctagagactgtcagagctgaccccagcta 660
          |||
Sbjct: 601 gaggatggcacagtgggtcaagagcacagactctagagactgtcagagctgaccccagcta 660

Query: 661 aggcattggcaccgcttctgtcctttctaggacctcggggtcctctctgggcccagtttccc 720
          |||
Sbjct: 661 aggcattggcaccgcttctgtcctttctaggacctcggggtcctctctgggcccagtttccc 720

Query: 721 tatctgtaaattggggacagtaaattgatgggggtcgcaggggtgtgagtgacaggaggct 780
          |||
Sbjct: 721 tatctgtaaattggggacagtaaattgatgggggtcgcaggggtgtgagtgacaggaggct 780

Query: 781 gcttagccacatgggaggtgctcagtaaaggagagcaattcttacaggtgtctgcctcct 840
          |||
Sbjct: 781 gcttagccacatgggaggtgctcagtaaaggagagcaattcttacaggtgtctgcctcct 840

Query: 841 gacccttccatccctcaggtgtcctgttgccccctcctcccactgacaccctccggaggc 900
          |||
Sbjct: 841 gacccttccatccctcaggtgtcctgttgccccctcctcccactgacaccctccggaggc 900

Query: 901 ccccatggtgacagaccctccttctcctacctgtttcccagcctgactctccttccggt 960
          |||
Sbjct: 901 ccccatggtgacagaccctccttctcctacctgtttcccagcctgactctccttccggt 960

Query: 961 ctgggtccccctcctctggtcggctcccctgtgtctcatccccggattaagccttctcc 1020
          |||
Sbjct: 961 ctgggtccccctcctctggtcggctcccctgtgtctcatccccggattaagccttctcc 1020

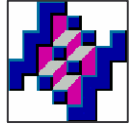
Query: 1021 gcctggctcctctttctctggtgaccacaccgcccgcaaagccacagcgcacatctggatca 1080
          |||
Sbjct: 1021 gcctggctcctctttctctggtgaccacaccgcccgcaaagccacagcgcacatctggatca 1080

Query: 1081 cccgctttggtggcgcttggccgcccaggaggcagcaccctgtttgcgggggcggagccggg 1140
          |||
Sbjct: 1081 cccgctttggtggcgcttggccgcccaggaggcagcaccctgtttgcgggggcggagccggg 1140

Query: 1141 gagcccgccccctttccccagggctgaagggacccccctcggagcccgcacgcgaga 1200
          |||
Sbjct: 1141 gagcccgccccctttccccagggctgaagggacccccctcggagcccgcacgcgaga 1200

Query: 1201 tgaggacggtggcccagccccccatgcctccccctggggggcgcggcccgcctcccggcc 1261

```

```
Sbjct: 1826 acttttccccagacctcgggcgacccccctgcacgcgccttcatccccggcctgtctcc 1885

Query: 1886 tgagcccccgcgcatcctagaccctttctcctccaggagacggatctctctccgacctgc 1945
      |||
Sbjct: 1886 tgagcccccgcgcatcctagaccctttctcctccaggagacggatctctctccgacctgc 1945

Query: 1946 cacagatcccctattcaagaccaccaccttctggtaccagatcgcgcccctctagggtta 2005
      |||
Sbjct: 1946 cacagatcccctattcaagaccaccaccttctggtaccagatcgcgcccctctagggtta 2005

Query: 2006 tttccgtgggatactgagacacccccggtccaagcctcccctccaccactgcgccttct 2065
      |||
Sbjct: 2006 tttccgtgggatactgagacacccccggtccaagcctcccctccaccactgcgccttct 2065

Query: 2066 ccctgaggagcctcagctttccctcgaggccctcctacctttgcccgggagacccccagc 2125
      |||
Sbjct: 2066 ccctgaggagcctcagctttccctcgaggccctcctacctttgcccgggagacccccagc 2125

Query: 2126 ccctgcaggggcggggcctccccaccacaccagccctgttcgcgctctcggcagtgccgg 2185
      |||
Sbjct: 2126 ccctgcaggggcggggcctccccaccacaccagccctgttcgcgctctcggcagtgccgg 2185

Query: 2186 ggggcgcccgcctccccatg 2205
      |||
Sbjct: 2186 ggggcgcccgcctccccatg 2205
```

FIGURA 18. Análisis de la secuencia de DNA del promotor del gen humano de TGF- β 1. Se realizó el análisis de secuenciación del DNA del producto de amplificación por PCR por análisis de homología de secuencias por Blast. En el análisis el resultado de blast se obtuvo una identidad del 100%. Número de acceso del GenBankTM/EMBL: J04431.

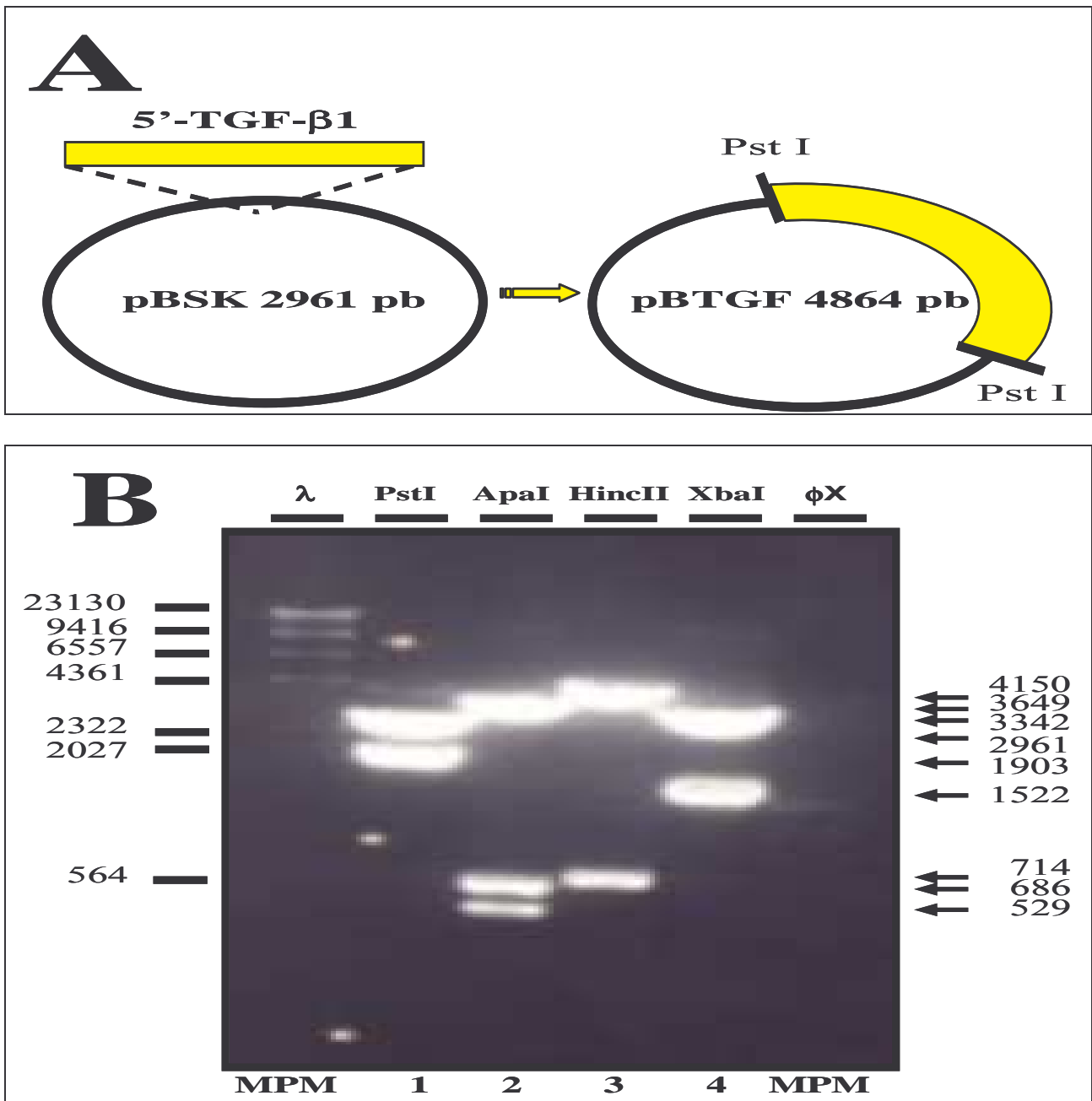
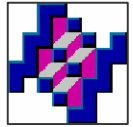
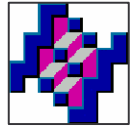


FIGURA 19. Clonación del promotor del gen humano de TGF- β 1 en el vector pBluescript. A. Se muestra el diseño en sílico de la construcción pBTGF. **B.** El fragmento de DNA de 2181 pb fue digerido con *Pst I* y clonado en el vector pBluescript para generar la construcción pBTGF. Se purifico el plásmido a gran escala de esta construcción y se analizó el patrón de digestión con las enzimas *Pst I*, *Apa I*, *Hinc II*, y *Xba I* (carriles 1 al 4). Como marcadores de peso molecular (MPM) se utilizaron el DNA de λ *Hind III* y el DNA de ϕ X174/*Hae III*. Los productos sugeridos por sílico correspondieron a los productos esperados. Las flechas indican los fragmentos de DNA obtenidos.



X.3. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DEL GEN HUMANO DE TGF- β 1 POR LOS PRODUCTOS DE LOS ONCOGENES E6 Y E7 DE HPV-16

Para entender los mecanismos de regulación génica de TGF- β 1 por las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16, se analizó el efecto de estas oncoproteínas sobre la actividad promotora del gen de TGF- β 1, por acoplamiento del promotor con el gen reportero CAT. Para este propósito inicialmente se amplificó por PCR la región reguladora del gen humano de TGF- β 1 y fueron generadas varias construcciones de plásmidos (pTGFs) que contienen diferentes fragmentos del promotor. Se realizó el análisis *in silico* de las construcciones generadas y los fragmentos de restricción esperados correspondieron a los fragmentos de restricción de DNA obtenidos por electroforesis (**Figuras 20 a 26**).

Las células C33A fueron transfectadas con las construcciones que contienen el promotor de TGF- β 1 y co-transfectadas con los plásmidos de expresión pSV2E6 y pSV2E7 que contienen los cDNA de los oncogenes E6 y E7 de HPV-16 respectivamente (**Figura 27**). Los resultados de la actividad funcional del promotor están presentados en las **Figuras 28 y 29**. La construcción pTGF1 que contiene el promotor completo de TGF- β 1 fue usada como la actividad de referencia. Los resultados mostraron que cuando el extremo 5' distal del promotor de TGF- β 1 fue eliminado, la actividad promotora disminuyó hasta un 25% (construcción pTGF2). La actividad promotora fue abolida hasta un 5% cuando el promotor central de TGF- β 1 que incluye el primer sitio de inicio de la transcripción (+1) fue deletado (construcciones pTGF3 y pTGF4). Sin embargo, la actividad promotora fue parcialmente recuperada en un 38% en presencia del promotor central de TGF- β 1 (construcción pTGF5) y fue restaurada hasta en un 75% cuando el promotor central de TGF- β 1 se encontraba presente por duplicado (construcción pTGF6). La actividad del promotor central de TGF- β 1 fue abolida cuando el promotor fue evaluado en orientación opuesta (construcción pTGF7) (**Figuras 28 y 29**).

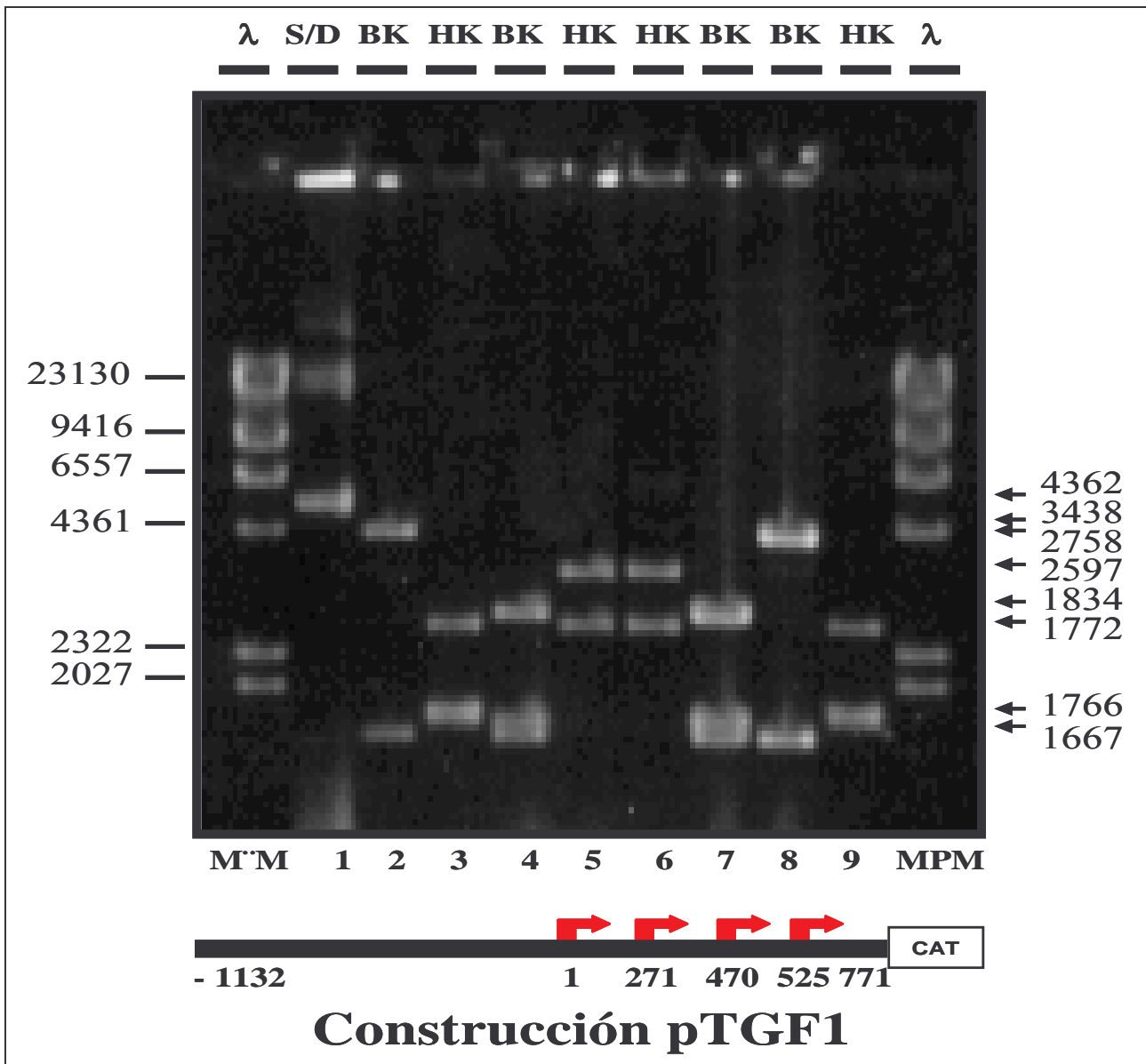
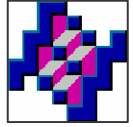


FIGURA 20. Construcción del plásmido pTGF1 en el vector pBLCAT3. Se incluyó todo el promotor completo del gen humano de TGF- β 1. Se realizó el análisis del patrón de digestión con las enzimas *Bam HI* (B) y *Kpn I* (K). S/D corresponde al producto sin digestión (carriles 1 al 9). Como marcador de peso molecular (MPM) se utilizó el DNA de λ /*Hind III*. Los productos sugeridos por el análisis in silico correspondieron a los productos esperados. Las flechas indican los fragmentos de DNA obtenidos.

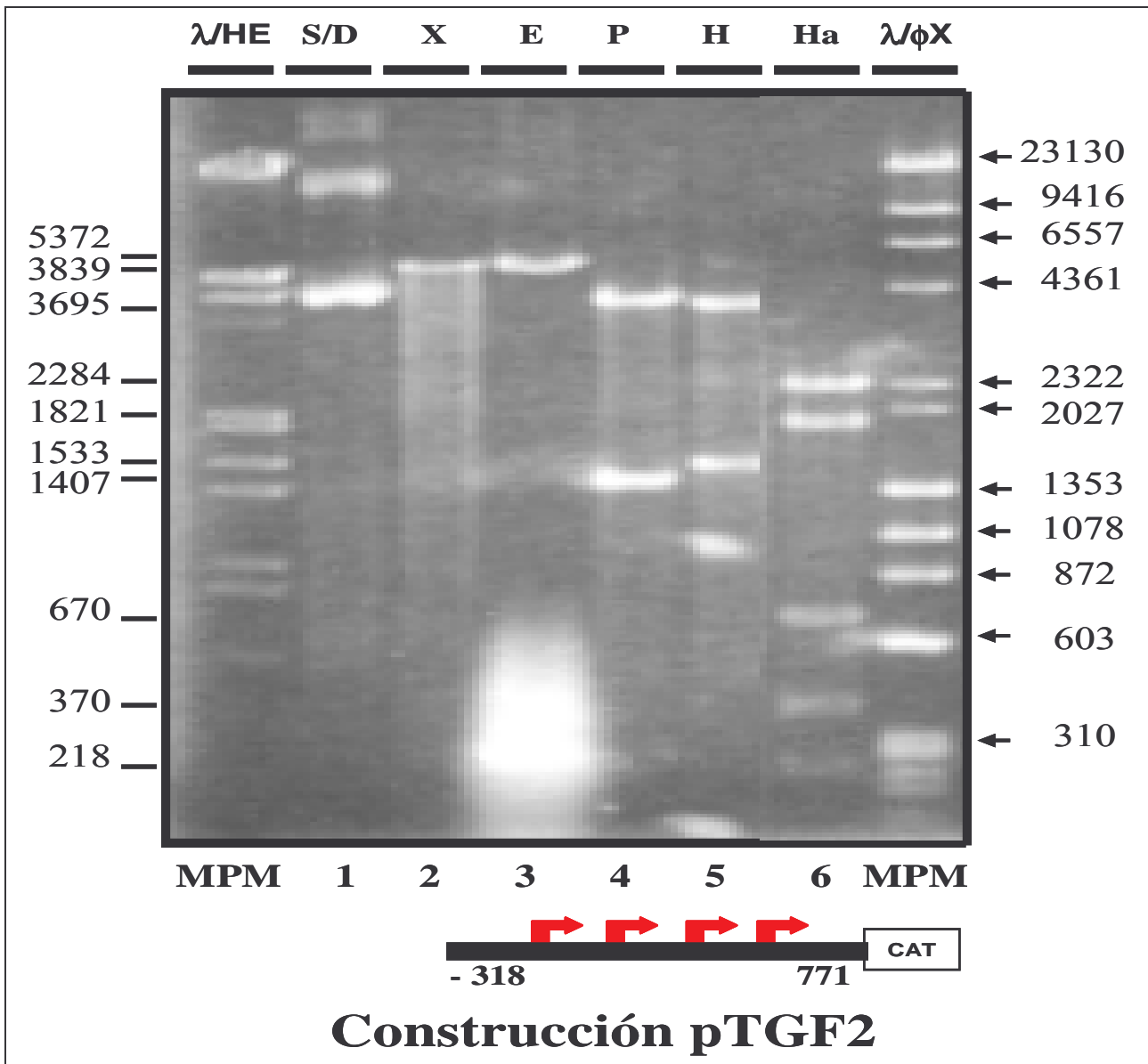
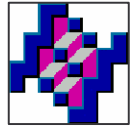


FIGURA 21. Construcción del plásmido pTGF2 en el vector pBLCAT3. Se clonó parte del promotor central del gen humano de TGF- β 1 con los cuatro sitios de inicio de la transcripción. Se realizó el análisis del patrón de digestión con las enzimas *Xba I* (X), *Eag I* (E), *PstI* (P), *Hind III* (H) y *Hae II* (Ha). S/D corresponde al producto sin digestión (carriles 1 al 6). Como marcadores de peso molecular (MPM) se utilizaron el DNA de λ /*Hind III* y el DNA de ϕ X174/*Hae II*. Los productos sugeridos por el análisis in silico correspondieron a los productos esperados. Las flechas indican los fragmentos de DNA obtenidos.

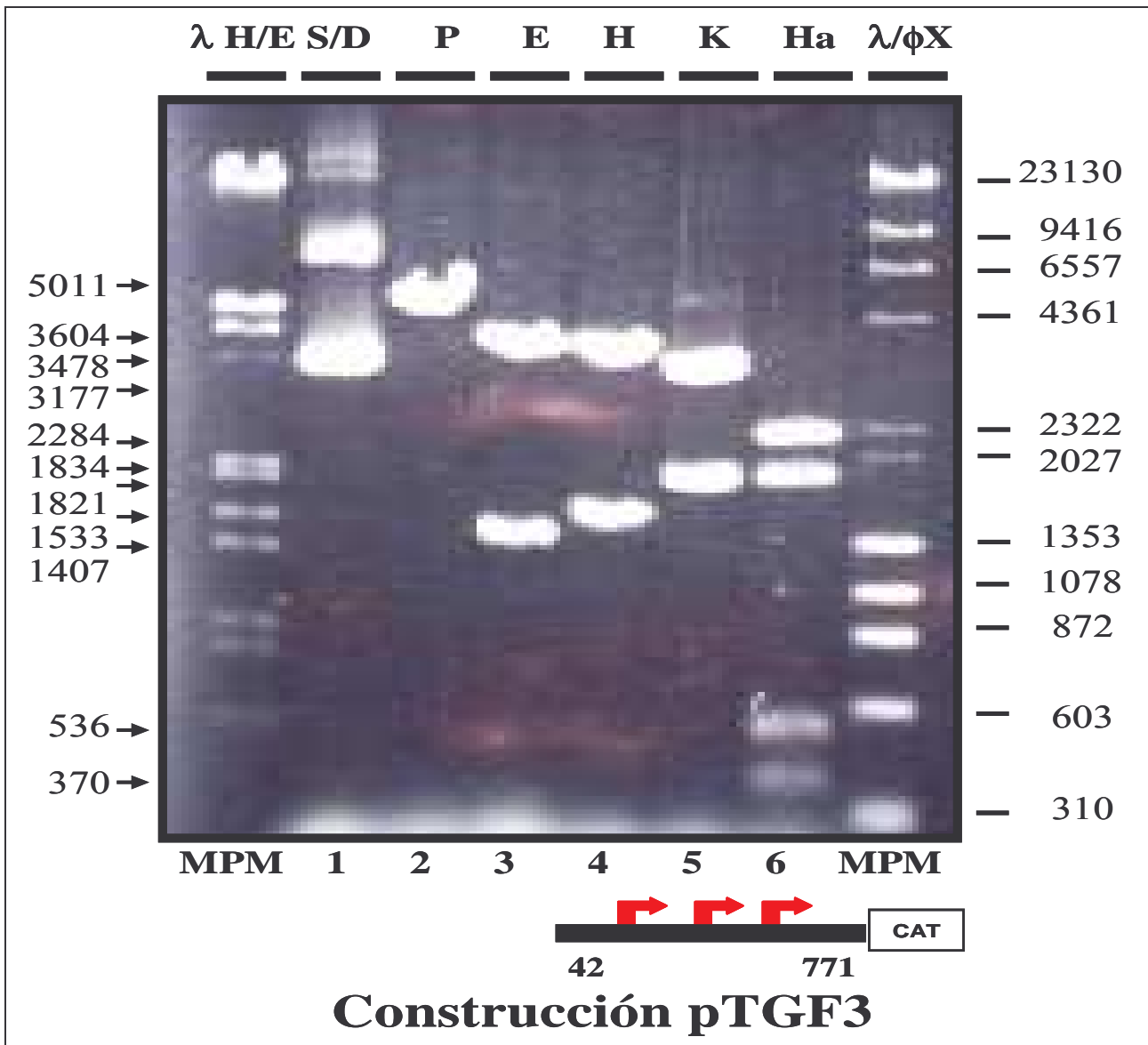
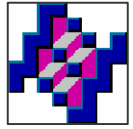


FIGURA 22. Construcción del plásmido pTGF3 en el vector pBLCAT3. Se deletó el extremo 5' distal y el promotor central del gen humano de TGF- β 1 con el primer sitio de inicio de la transcripción. Se realizó el análisis del patrón de digestión con las enzimas *PstI* (P), *Eag I* (E), *Hind III* (H), *Kpn I* (K) y *Hae II* (Ha). S/D corresponde al producto sin digestión (carriles 1 al 6). Como marcadores de peso molecular (MPM se utilizaron el DNA de λ /*Hind III* y el DNA de ϕ X174/*Hae II*. Los productos sugeridos por el análisis in silico correspondieron a los productos esperados. Las flechas indican los fragmentos de DNA obtenidos.

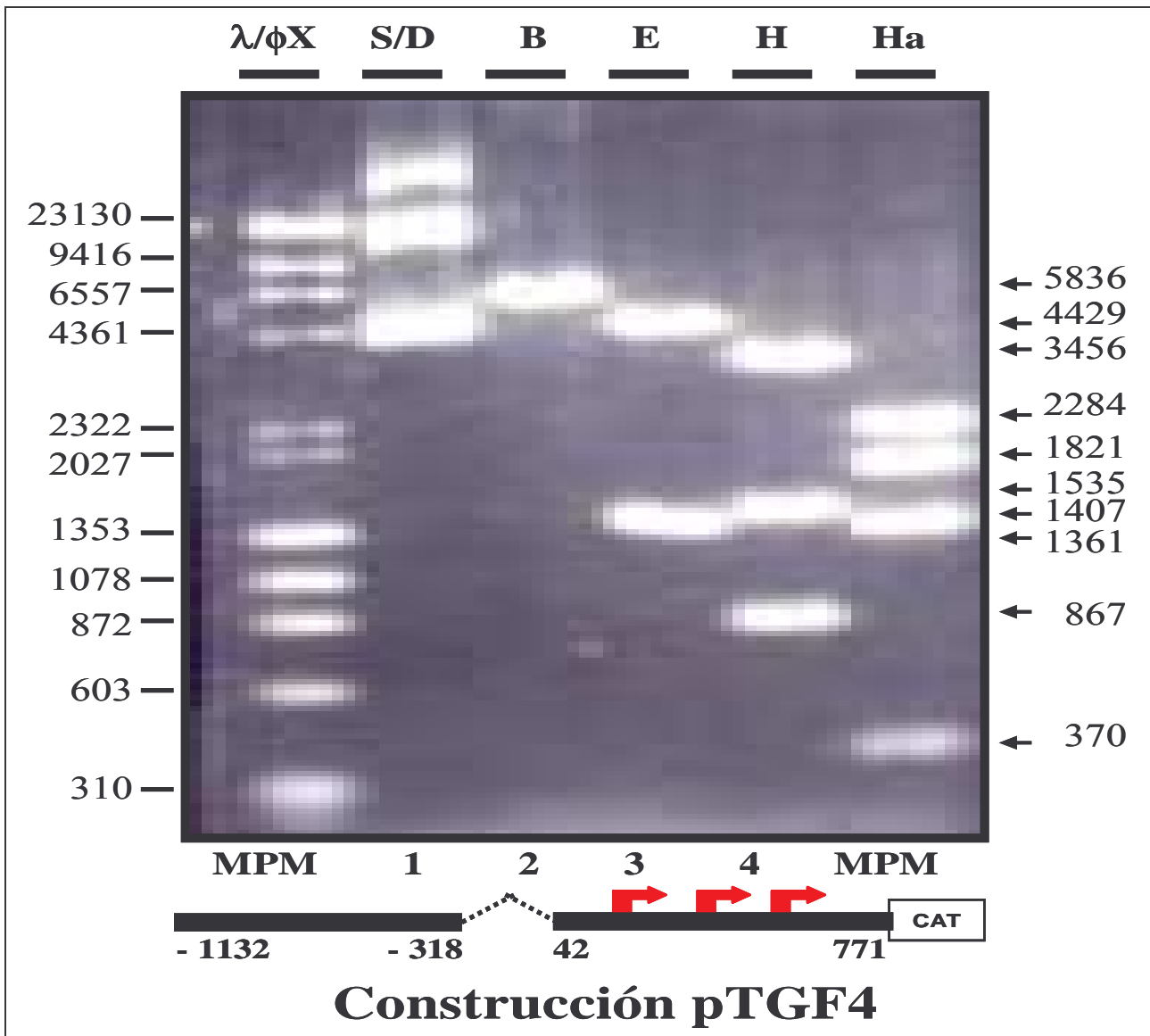
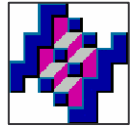


FIGURA 23. Construcción del plásmido pTGF4 en el vector pBLCAT3. Se deletó parte del promotor central del gen humano de TGF- β 1 con el primer sitio de inicio de la transcripción y se incluyó el extremo 5' distal. Se realizó el análisis del patrón de digestión con las enzimas *Bam HI* (B), *Eag I* (E), *Hind III* (H), y *Hae II* (Ha). S/D corresponde al producto sin digestión (carriles 1 al 4). Como marcadores de peso molecular (MPM) se utilizaron el DNA de λ *Hind III* y el DNA de ϕ X174/*Hae II*. Los productos sugeridos por el análisis in silico correspondieron a los productos esperados. Las flechas indican los fragmentos de DNA obtenidos.

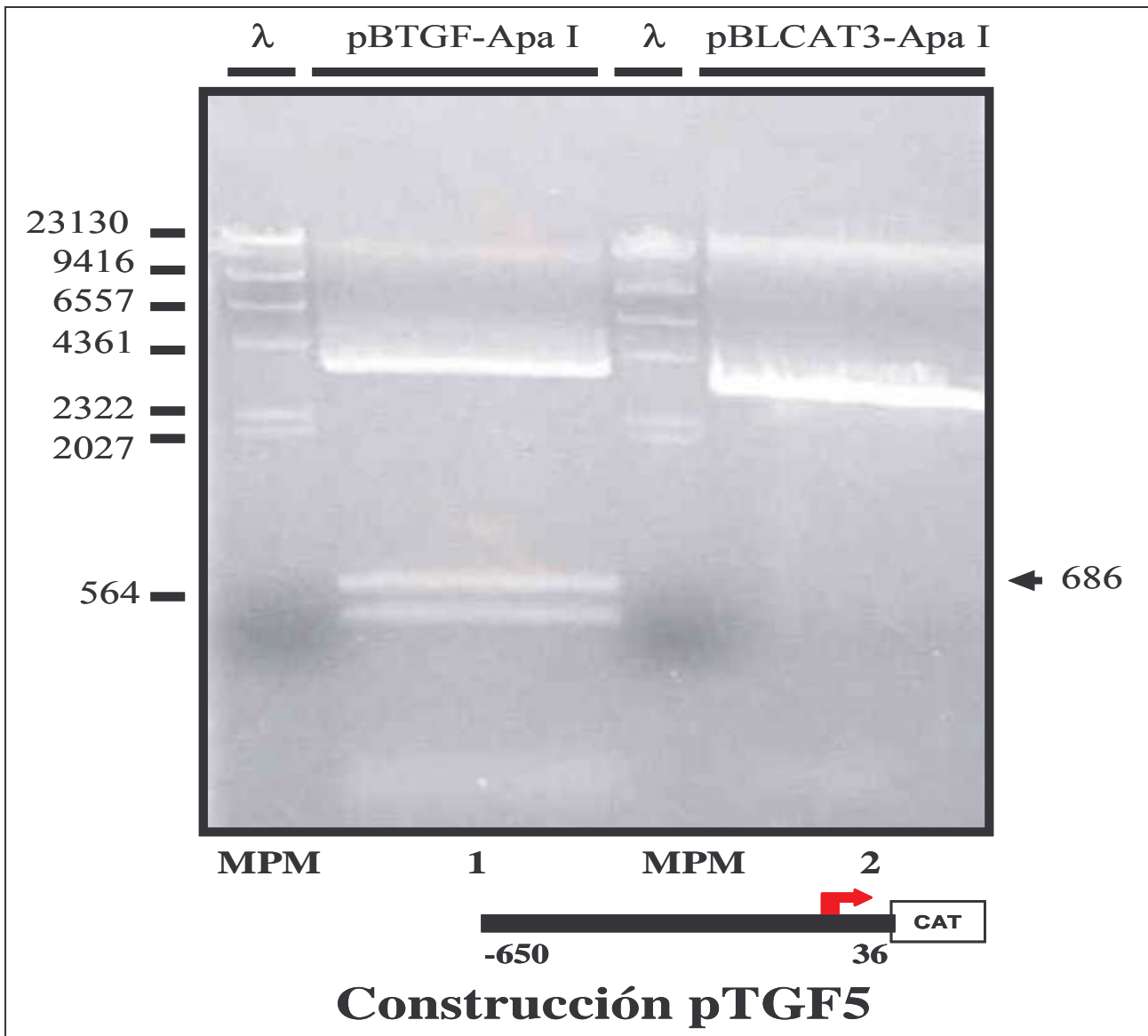
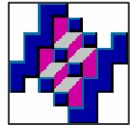


FIGURA 24. Construcción del plásmido pTGF5 en el vector pBLCAT3. Se incluyó el promotor central del gene humano de TGF- β 1 con el primer sitio de inicio de la transcripción. Se realizó el análisis del patrón de digestión con la enzima *Apa I* (carril 1). Se linearizó el plásmido pBLCAT3 con la enzima *Apa I* (carril 2). Como marcador de peso molecular (MPN) se utilizó el DNA de λ /*Hind III*. Los productos sugeridos por el análisis in silico correspondieron a los productos esperados. La flecha indica el fragmento de DNA obtenido.

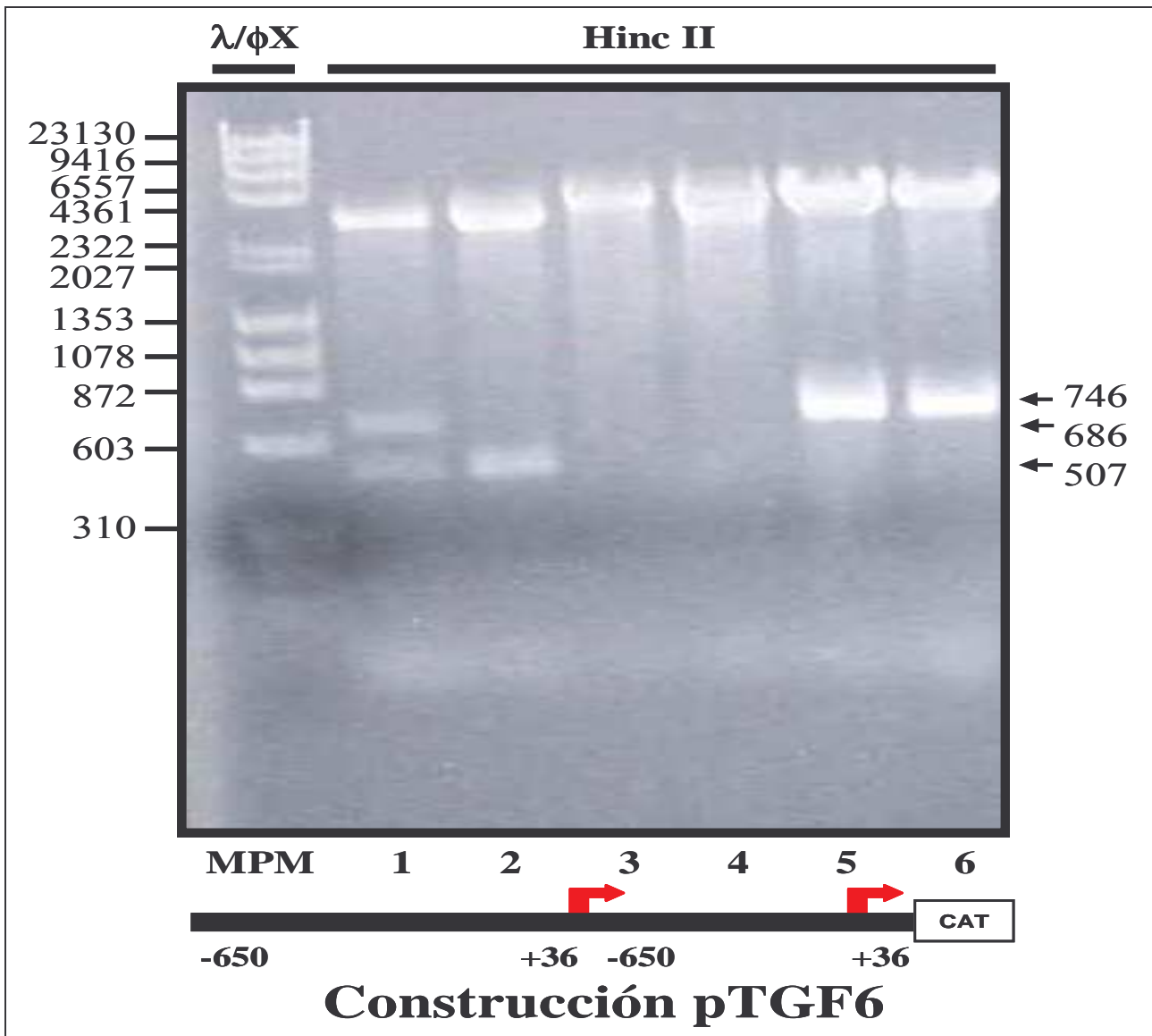
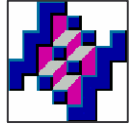


FIGURA 25. Construcción del plásmido pTGF6 en el vector pBLCAT3. Se clonó el promotor central del gen humano de TGF- β 1 con el primer sitio de inicio de la transcripción en tandem por duplicado. Se realizó el análisis del patrón de digestión con la enzima *Hinc II* (carriles 1 al 6). Como marcadores de peso molecular (MPM) se utilizaron el DNA de λ *Hind III III* y el DNA de ϕ X174/*Hae II*. Los productos sugeridos por el análisis in silico correspondieron a los productos esperados. La flecha indica el fragmento de DNA obtenido.

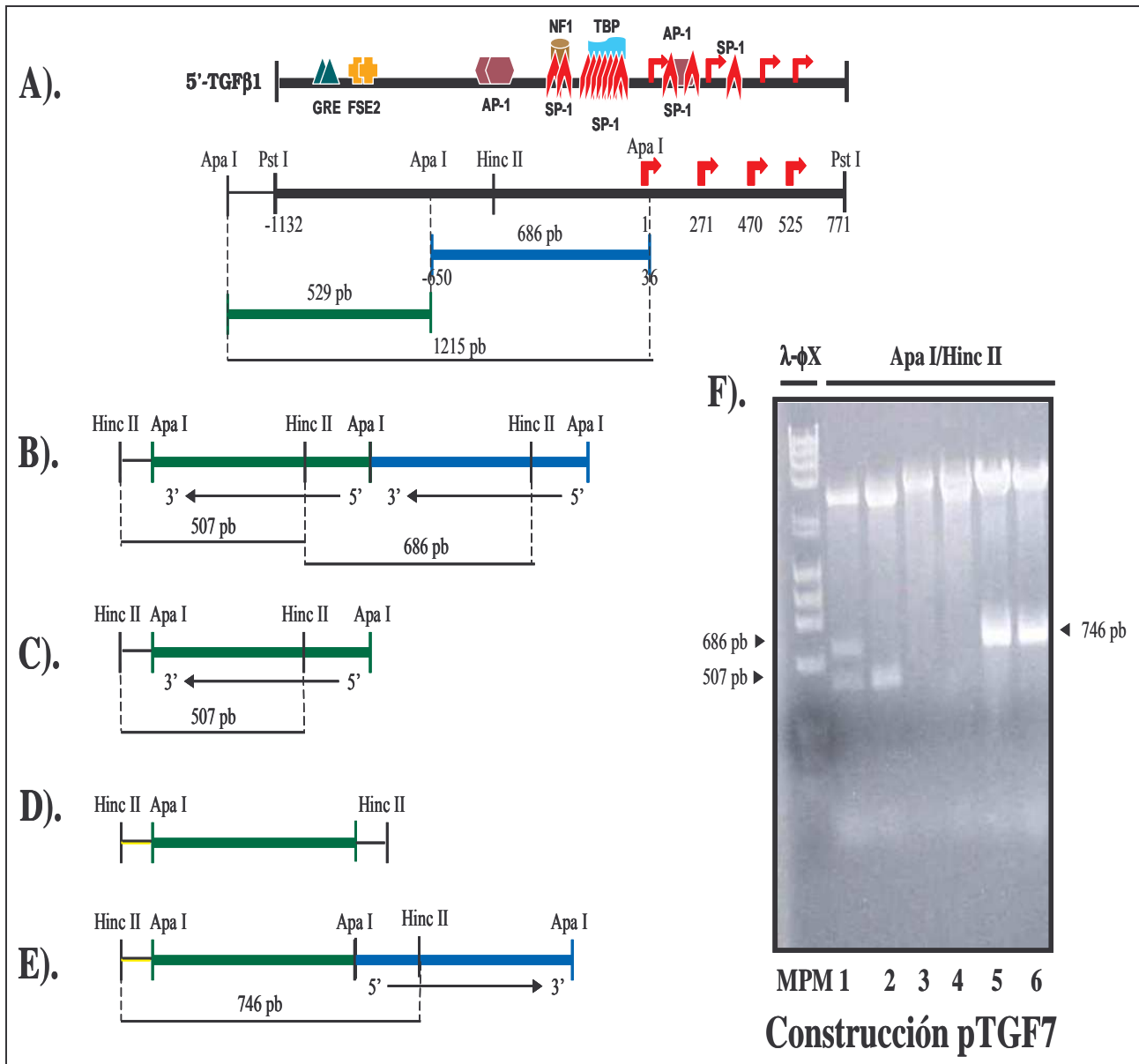


FIGURA 26. Construcción del plásmido pTGF7 en el vector pBLCAT3. Se clonó el promotor central del gen humano de TGF-β1 con el primer sitio de inicio de la transcripción en tandem por duplicado en orientación opuesta. Se realizó el análisis del patrón de digestión y de la orientación de los insertos en diferentes clonas con las enzimas *Apa I* y *Hinc II* (carriles 1 al 6). Como marcadores de peso molecular (MPM) se utilizaron el DNA de λ/*Hind III III* y el DNA de φX174/*Hae II*. Los productos sugeridos por el análisis in silico correspondieron a los productos esperados. En **A** se indica la posición del promotor central. En **B**, **C**, **D** y **E** se muestra el análisis para determinar el número de copias y la orientación del promotor. En **F** se muestra el análisis por electroforesis de las clonas.

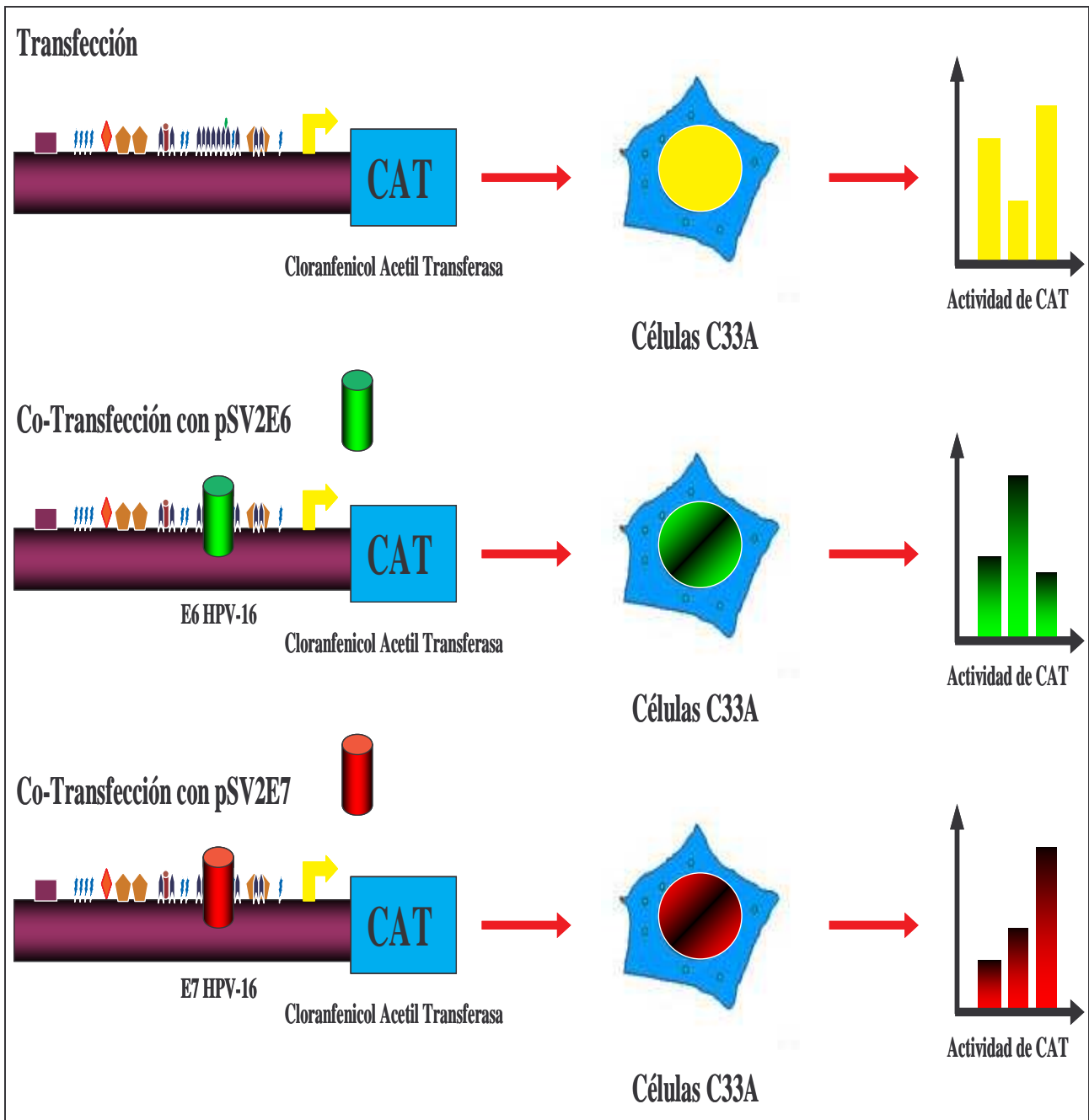


FIGURA 27. Estrategia de transfección transitoria. Las células C33A fueron transfectadas con las construcciones de plásmidos pTGF1, pTGF2, pTGF3, pTGF4, pTGF5, pTGF6 y pTGF7; y co-transfectadas con los plásmidos de expresión pSV2E6 y pSV2E7. Se analizó la actividad del promotor de TGF- β 1 por la inducción de la actividad de CAT.

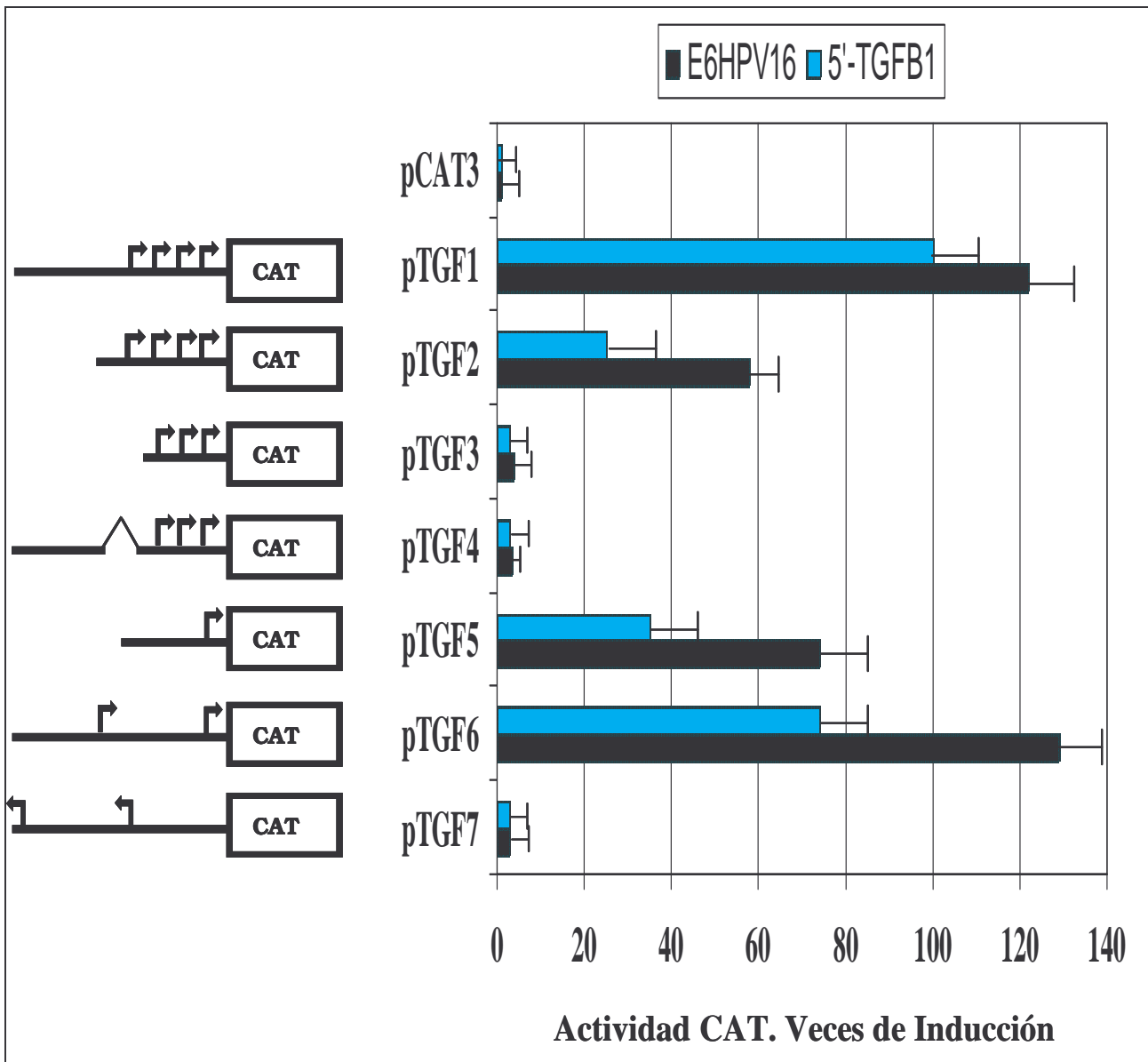


FIGURA 28. La activación transcripcional del promotor del gen humano de TGF- β 1 es inducida por la oncoproteína E6 de HPV-16. Las células C33A fueron transitoriamente transfectadas con las construcciones pTGFs y co-transfectadas con el plásmido pSV2E6. Se midieron los niveles de la actividad de CAT 48 h después de la co-transfección. El pCAT3 corresponde al vector vacío. Las barras azules corresponden a la actividad del promotor de TGF- β 1, mientras que las barras negras indican la actividad del promotor de TGF- β 1 inducida por la oncoproteína E6 de HPV-16. Los datos mostrados son el promedio de cuatro experimentos independientes reproducibles.

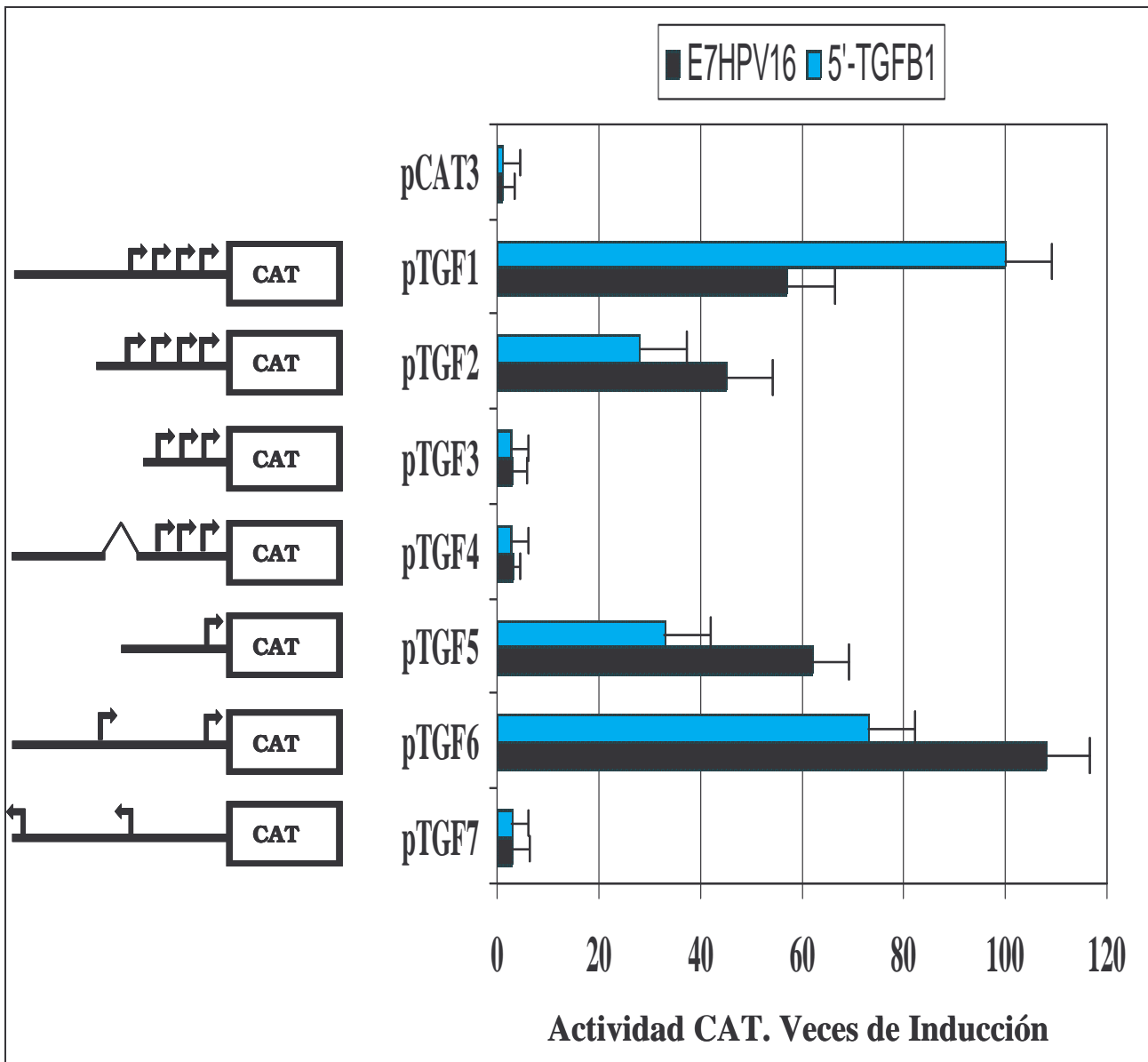
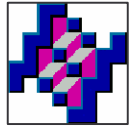
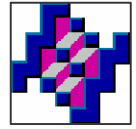


FIGURA 29. La activación transcripcional del promotor del gen humano de TGF- β 1es inducida por la oncoproteína E7 de HPV-16. Las células C33A fueron transitoriamente transfectadas con las construcciones pTGFs y co-transfectadas con el plásmido pSV2E7. Se midieron los niveles de la actividad de CAT 48 h después de la co-transfección. El pCAT3 corresponde al vector vacío. Las barras azules corresponden a la actividad del promotor de TGF- β 1, mientras que las barras negras indican la actividad del promotor de TGF- β 1 inducida por la oncoproteína E7 de HPV-16. Los datos mostrados son el promedio de cuatro experimentos independientes reproducibles.



Para evaluar la función específica de la oncoproteína E6 de HPV-16 sobre el mecanismo de trans-activación del promotor de TGF- β 1, las células C33A fueron co-transfectadas con el cDNA del oncogen E6 (**Figura 28**). Los resultados muestran un incremento de dos veces de la expresión del gen reportero CAT cuando está presente el promotor central de TGF- β 1 (construcciones pTGF2 y pTGF5) en las células que expresaron E6, en comparación con las células que no expresaron E6. Además, el efecto inducido por E6 fue mayor en las células que fueron transfectadas con el promotor central de TGF- β 1 por duplicado (construcción pTGF6). En un conjunto de experimentos en paralelo, las células C33A fueron co-transfectadas con el cDNA del oncogen E7 y los resultados mostraron efectos similares como los que se observaron para las células co-transfectadas con E6 (**Figura 29**). La oncoproteína E7 indujo la actividad transcripcional solo cuando se encontraba presente el promotor central de TGF- β 1 (construcciones pTGF2, pTGF5 y pTGF6). Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas cuando los oncogenes E6 y E7 de HPV-16 fueron transfectados de manera simultánea (datos no mostrados). Para confirmar el efecto específico de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 sobre la inducción de la actividad promotora de TGF- β 1, se analizó la expresión del RNAm de E6 y E7 por Northern blot en las células C33A transfectadas con estos oncogenes (**Figura 30**). Como se demostró, las células C33A transfectadas transitoriamente con pSV2E6 y pSV2E7 expresaron el RNAm de E6 y E7 de HPV-16, mientras que las células C33A no transfectadas no expresan el RNAm de E6 y E7, como era de esperarse. Las células CaSKi transformadas con HPV-16, fueron utilizadas como control interno. Las diferentes especies del RNAm de los oncogenes de E6 y E7 que se observaron corresponden a diferentes productos de splicing de estos oncogenes virales. Los resultados obtenidos de la actividad funcional del promotor de TGF- β 1 evaluada por la expresión del gen reportero CAT, muestran un efecto de trans-activación sobre el promotor inducido por las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16. Además, esta trans-activación es ligeramente superior cuando las células C33A expresaron E7 comparado con las células C33A que expresaron E6, lo cual podría sugerir un mecanismo de interacción diferencial con los factores de transcripción en el promotor central de TGF- β 1 inducido por cada una de las oncoproteínas virales. Por lo tanto, estos resultados soportan la noción de que las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 involucradas en el proceso de transformación e inmortalización de las células cervicales tumorales humanas, también son capaces de trans-activar la expresión del gen humano de TGF- β 1.

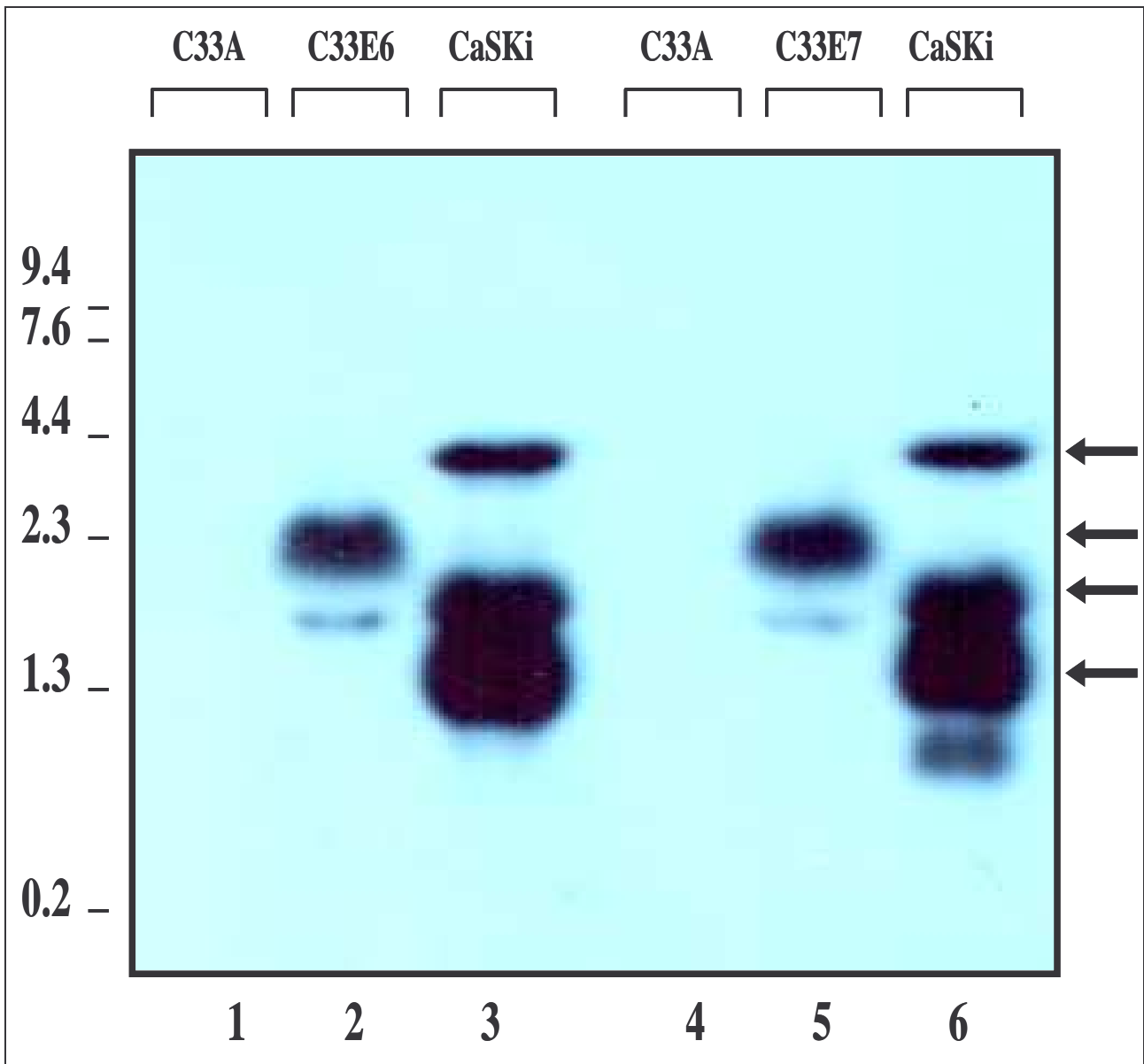
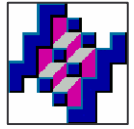
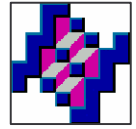


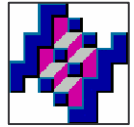
FIGURA 30. Análisis por Northern blot de la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV-16 en las células C33A. Las células C33A sin transfectar (carriles 1 y 4) o transfectadas con los plásmidos de expresión pSV2E6 (carril 2) o con pSV2E7 (carril 5) fueron cosechadas y se realizó la extracción del RNA total. Las células CaSKi (HPV-16+) fueron usadas como control positivo (carriles 3 y 6). Las flechas indican los diferentes productos de splicing de los oncogenes E6 y E7. Los ensayos fueron realizados por triplicado y se muestra un experimento representativo reproducibile.



X.4. IDENTIFICACION DE LOS ELEMENTOS REGULADORES EN EL PROMOTOR DEL GEN DE HUMANO TGF- β 1 RESPONSABLES DE LA TRANS-ACTIVACION POR E6 Y E7 DE HPV-16

La secuencia del promotor central de TGF- β 1 (de -650 a +36) contiene un grupo de cinco secuencias de unión al DNA de reconocimiento para el factor de transcripción Sp1 100% homólogos (Sp1a, Sp1b, Sp1c, Sp1d y Sp1e) (**Figura 31**). Un estudio previo ha demostrado que en fibroblastos, los sitios de unión para Sp1 pueden estar involucrados en la estimulación del promotor de TGF- β 1 a través de la oncoproteína E6 de HPV-16 (134). Sin embargo, esta evidencia no ha sido demostrada en las células blanco de infección para HPV que son las células epiteliales del cervix uterino. Además, tampoco se ha podido clarificar cual de los sitios de unión a Sp1 son sensibles a la infección por HPV-16.

Por lo tanto, en un esfuerzo para identificar las secuencias blanco responsables de la trans-activación del promotor del gen humano de TGF- β 1 por las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16, se examinaron los patrones de interacción con las secuencias de DNA y formación de complejos DNA-proteína en el promotor central de TGF- β 1 por la técnica de Footprinting. Para realizar este tipo de ensayo se diseñó la siguiente estrategia metodológica (**Figura 32**): El promotor central de TGF- β 1 fue clonado en el sitio *Apa I* en el vector pGEM11Z como vehículo de clonación para utilizar los sitios de restricción 5'-*Bam HI* y 3'-*Hind III* del sitio de clonación múltiple del vector. A partir de la generación de esta construcción (pGTGF) se liberó el inserto en los sitios *Bam HI* y *Hind III* para obtener un fragmento de DNA de 719 pb con extremos 5' salientes que permitieron la incorporación del nucleótido dGTP- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ en ambas hebras del DNA (**Figura 33**). Este fragmento de DNA fue digerido con *Hinc II* para producir dos fragmentos de DNA más pequeños, uno de 221 y el otro de 498 pb. Como en el fragmento de 498 pb están localizados los sitios de unión para Sp1, a este fragmento se consideró como la sonda de DNA, y se decidió realizar el análisis de interacción DNA-proteína y de digestión con DNasa I (ensayo de Footprinting). Se realizó el análisis del patrón de restricción de los fragmentos de DNA de 221 y 498 pb por electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Figura 34**). Posteriormente, esta sonda de DNA fue incubada con extractos nucleares de células C33A no transfectadas y transfectadas con los plásmidos pSV2E6 y pSV2E7.



Los ensayos de Footprinting *in vitro* revelaron que el fragmento de DNA de 498 pb que contiene al promotor central de TGF- β 1 al ser incubado con extractos nucleares de células C33A no transfectadas se identificaron la ubicación de las diferentes secuencias específicas que corresponden a los sitios de reconocimiento para el factor de transcripción Sp1 (**Figura 35A**, corchetes). Cuando las células C33A fueron transfectadas con el cDNA de los oncogenes E6 y E7 de HPV-16 se identificó un patrón de protección preferencial sobre las secuencias de reconocimiento para Sp1. La transfección con el oncogen E6 produjo un patrón de protección evidente sobre las secuencias Sp1c, Sp1d y Sp1e (**Figura 35B**). En contraste, con los extractos nucleares de células C33A transfectadas con el oncogen E7 se observó una mayor área de secuencias protegidas para los elementos de unión a Sp1, la cual correspondió a las secuencias Sp1a, Sp1b, Sp1c, Sp1d y Sp1e (**Figura 35C**). Este patrón de protección preferencial por las secuencias Sp1 en el promotor central de TGF- β 1 sugiere que las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 pueden inducir una variedad de interacciones en el DNA en las células C33A durante el proceso de transcripción de genes, y adicionalmente podrían favorecer el reclutamiento de otros factores de transcripción así como de co-activadores o co-represores. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 puede inducir la formación de nuevos complejos de transcripción en el promotor central de TGF- β 1, a través de las secuencias de reconocimiento para el factor de transcripción Sp1 en las células cervicales tumorales humanas transformadas con HPV, durante el desarrollo del cáncer cérvico uterino.

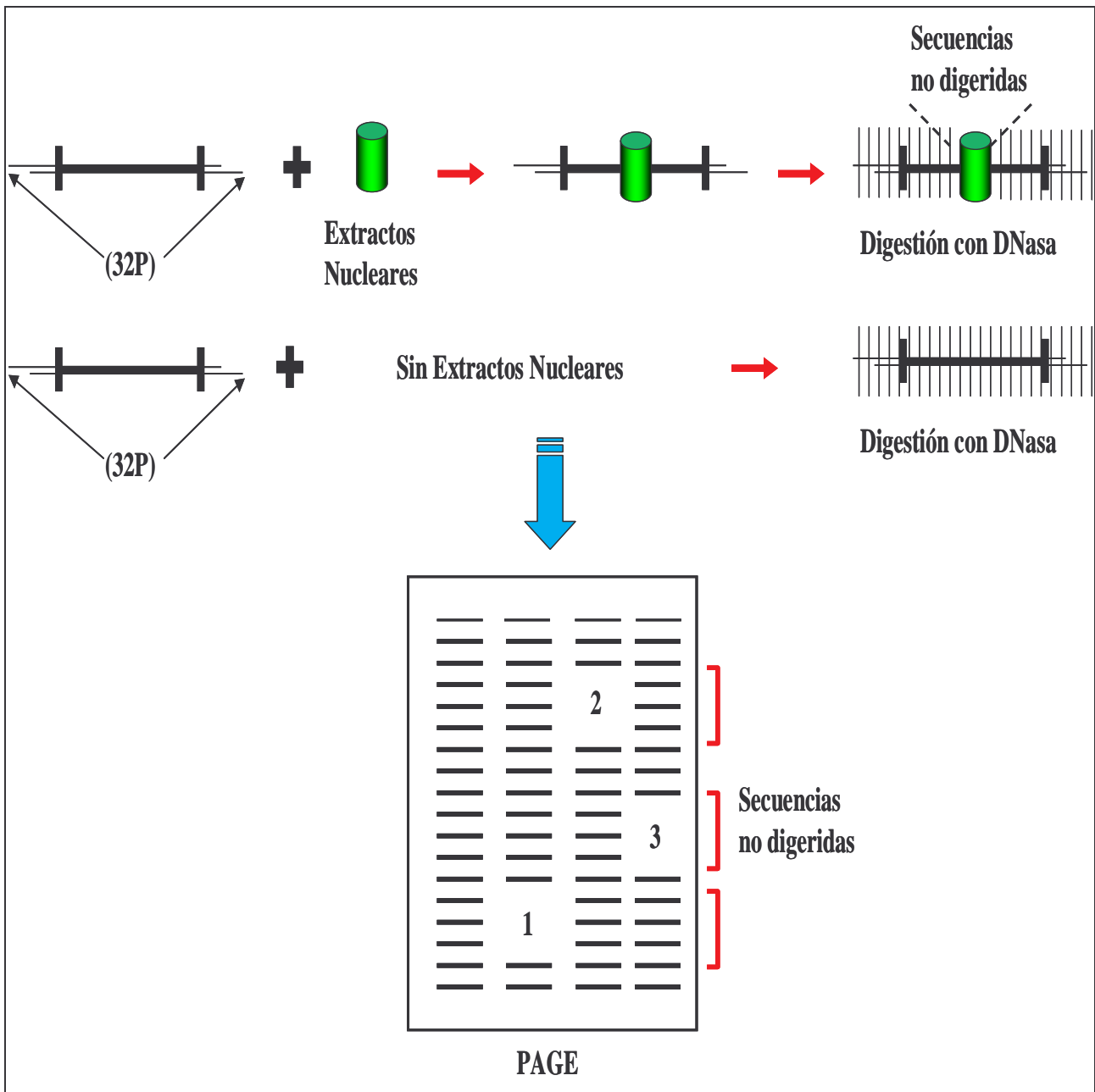
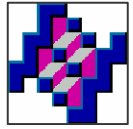


FIGURA 32. Diseño de la estrategia de interacción DNA-proteínas tipo Footprinting. La sonda utilizada corresponde al promotor central del gen humano de TGF- β 1 (de -650 a +36), la cual fue marcada radioactivamente con dGTP- $[\alpha$ - 32 P]. La sonda fue incubada en ausencia o presencia de extractos nucleares y posteriormente se realizó la digestión con DNasa I. Las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de secuenciación (PAGE) y se identificaron las posiciones y las secuencias de las regiones no digeridas por la DNasa I, que corresponde a las secuencias protegidas por la interacción con las proteínas de los extractos nucleares.

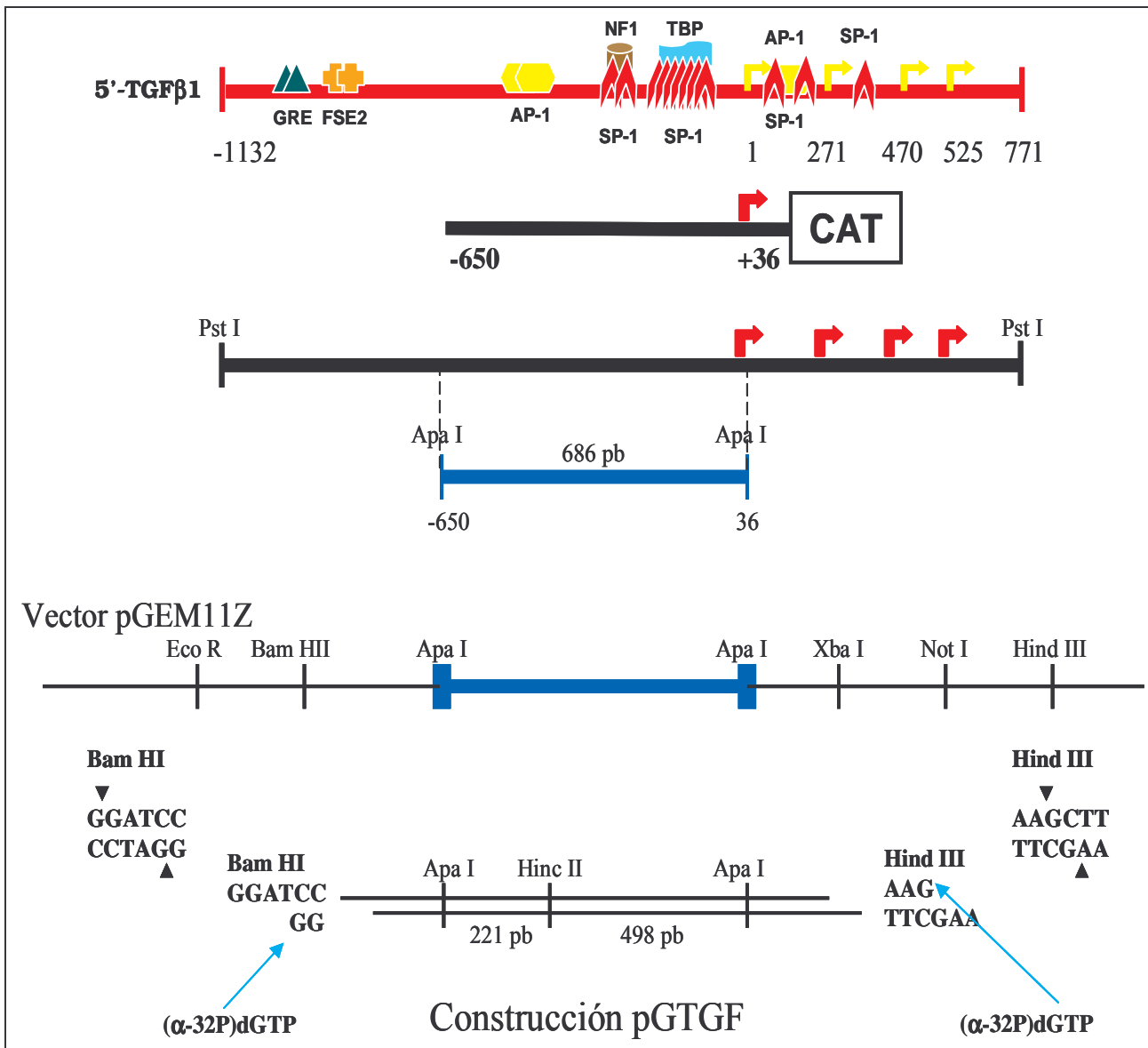


FIGURA 33. Diseño de la sonda de DNA para la estrategia de interacción DNA-proteína tipo Footprinting con el promotor central de TGF- β 1. Se clonó el promotor central del gen humano de TGF- β 1 (de -650 a +36) en el vector pGEM11Z en el sitio *Apa I* para generar la construcción pGTGF. A partir de esta construcción se libero el inserto en los sitios de restricción *Bam HI* y *Hind III* para generar un fragmento de DNA con extremos 5' salientes. Este fragmento de DNA de 719 pb fue marcado radioactivamente por la incorporación de dGTP-[α -32P] y fue usado como sonda para los ensayos de Footprinting.

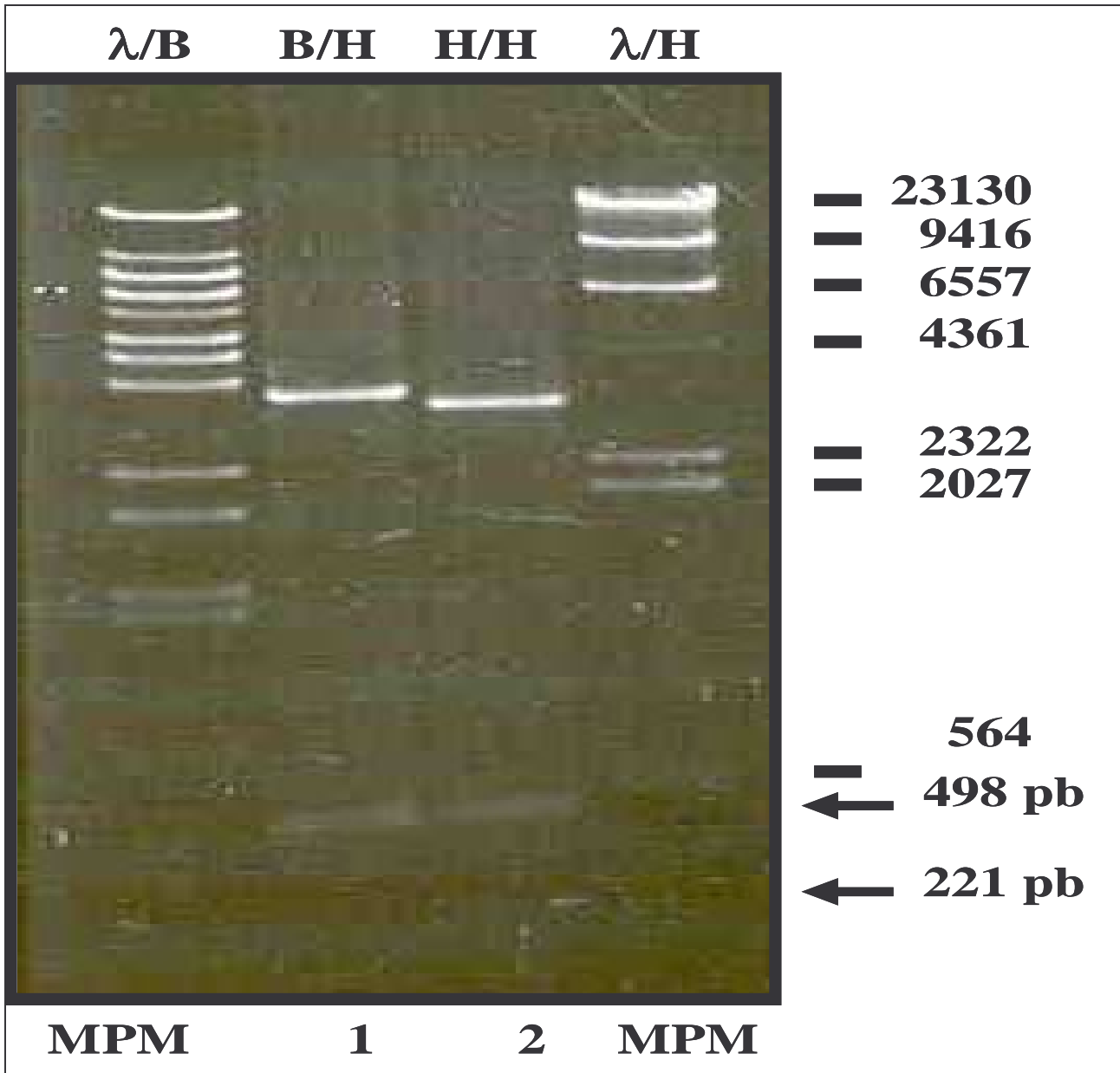
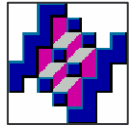


Figura 34. Generación de la construcción pGTGF en el vector pGEM11Z. El promotor central de TGF- β 1 (de -686 a +36) se clonó en el vector pGEM11Z y fue analizado el patrón de fragmentos de restricción con las enzimas *Bam HI/Hinc II* (B/H, carril 1) y con *Hind II/Hinc II* (H/H, carril 2). Como marcadores de peso molecular (MPM) se utilizaron el DNA de λ /*Bst I* y el DNA de λ /*Hind III*. Los productos sugeridos por análisis in silico correspondieron a los productos esperados. Las flechas indican los fragmentos de DNA obtenidos.

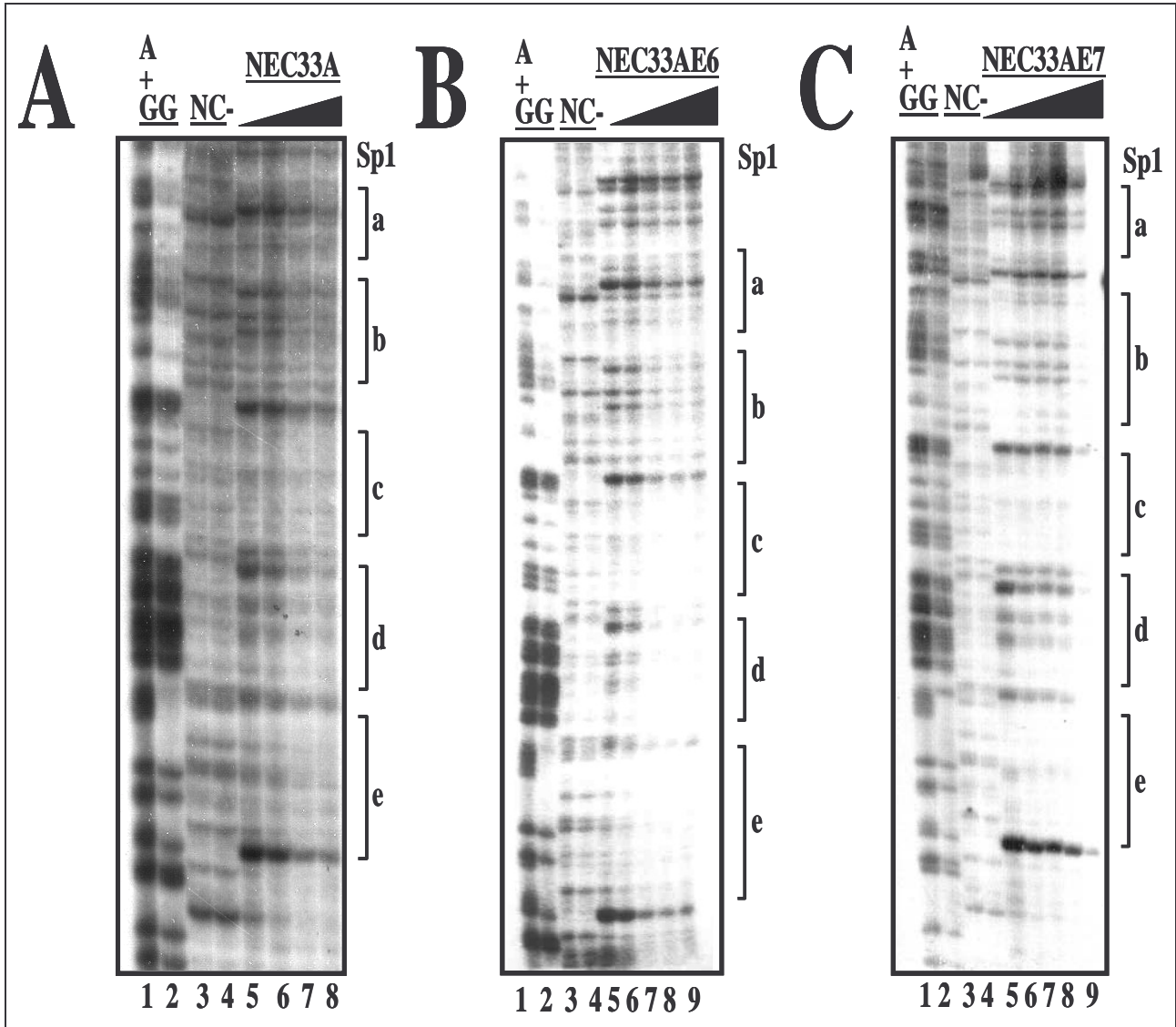
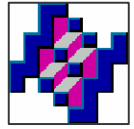
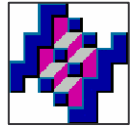


FIGURA 35. Análisis por Footprinting *in vitro* del promotor central del gen humano de TGF- β 1 en presencia de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16. Ensayos de Footprinting del promotor central de TGF- β 1 con extractos nucleares de células C33A sin transfectar (panel A, NEC33A), o transfectadas con el oncogen E6 (panel B, NEC33AE6) o con el encogen E7 (panel C, NEC33AE7). En corchetes se indica la posición de las secuencias para los sitio de unión para Sp1. Los carriles 1 y 2 corresponden a las reacciones de modificación de bases A+G y G de la reacción de Maxam y Gilbert respectivamente. Los carriles 3 y 4 indican las reacciones de control negativo (NC-) sin extractos nucleares. Los carriles 5 a 9 corresponden a concentraciones crecientes de los diferentes extractos nucleares. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes reproducibles.



X.5. UNA SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO ESPECIFICA PARA Sp1 ES CRITICA PARA EL MECANISMO DE TRANS-ACTIVACION DEL PROMOTOR DEL GEN HUMANO DE TGF- β 1 POR E6 Y E7 DE HPV-16

Como se demostró, las cinco secuencias de reconocimiento para el factor de transcripción Sp1 del promotor central de TGF- β 1 tienen la habilidad para interactuar en una manera preferencial con las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16. Para determinar la contribución de cada uno de los sitios de unión para Sp1, se evaluó la funcionalidad de cada una de las secuencias de manera independiente por análisis mutacional.

Por lo tanto, se generaron varias construcciones de plásmidos del promotor central de TGF- β 1 (de -650 a +36) que contiene las secuencias de Sp1 en la versión original y en las versiones mutadas (**Figura 19**, pSp1-wt, pSp1a-mt, pSp1b-mt, pSp1c-mt, pSp1d-mt y pSp1e-mt). Las células C33A fueron transfectadas con estas construcciones y co-transfectadas con los plásmidos pSV2E6 y pSV2E7 para identificar la contribución de cada uno de los sitios de reconocimiento para Sp1 responsables para la trans-activación del promotor central de TGF- β 1 inducida por las oncoproteínas de HPV-16. Los resultados demuestran que la secuencia mutada Sp1e localizada entre los nucleótidos de -108 a -102 del promotor central de TGF- β 1, no produjo aumento de la actividad promotora de TGF- β 1 en presencia de las oncoproteínas E6 ni de E7 de HPV-16 cuando se comparó con la secuencia original de Sp1 (Sp1-wt vs Sp1e-mt). En contraste, los restantes sitios de unión para Sp1 mutados no contribuyeron significativamente a la actividad de trans-activación, ya que cuando fueron mutados la actividad del promotor no se afectó significativamente en relación a la secuencia original (Sp1-wt vs Sp1a-mt, Sp1b-mt, Sp1c-mt y Sp1d-mt) (**Figuras 36 y 37**). Estos resultados sugieren que la secuencia de unión para el factor de transcripción Sp1e, ubicado entre los nucleótidos -108 a -102 antes del primer sitio de inicio de la transcripción del promotor central de TGF- β 1; es particularmente importante para mediar el mecanismo de trans-activación inducido por las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16. Por lo tanto, un posible mecanismo por el cual las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 podrían participar en la trans-activación del promotor central de TGF- β 1, podría ser a través de la interacción directa con la secuencia de unión para Sp1e, o por una interacción indirecta por reclutamiento de co-activadores o co-represores asociados a la secuencia Sp1e.

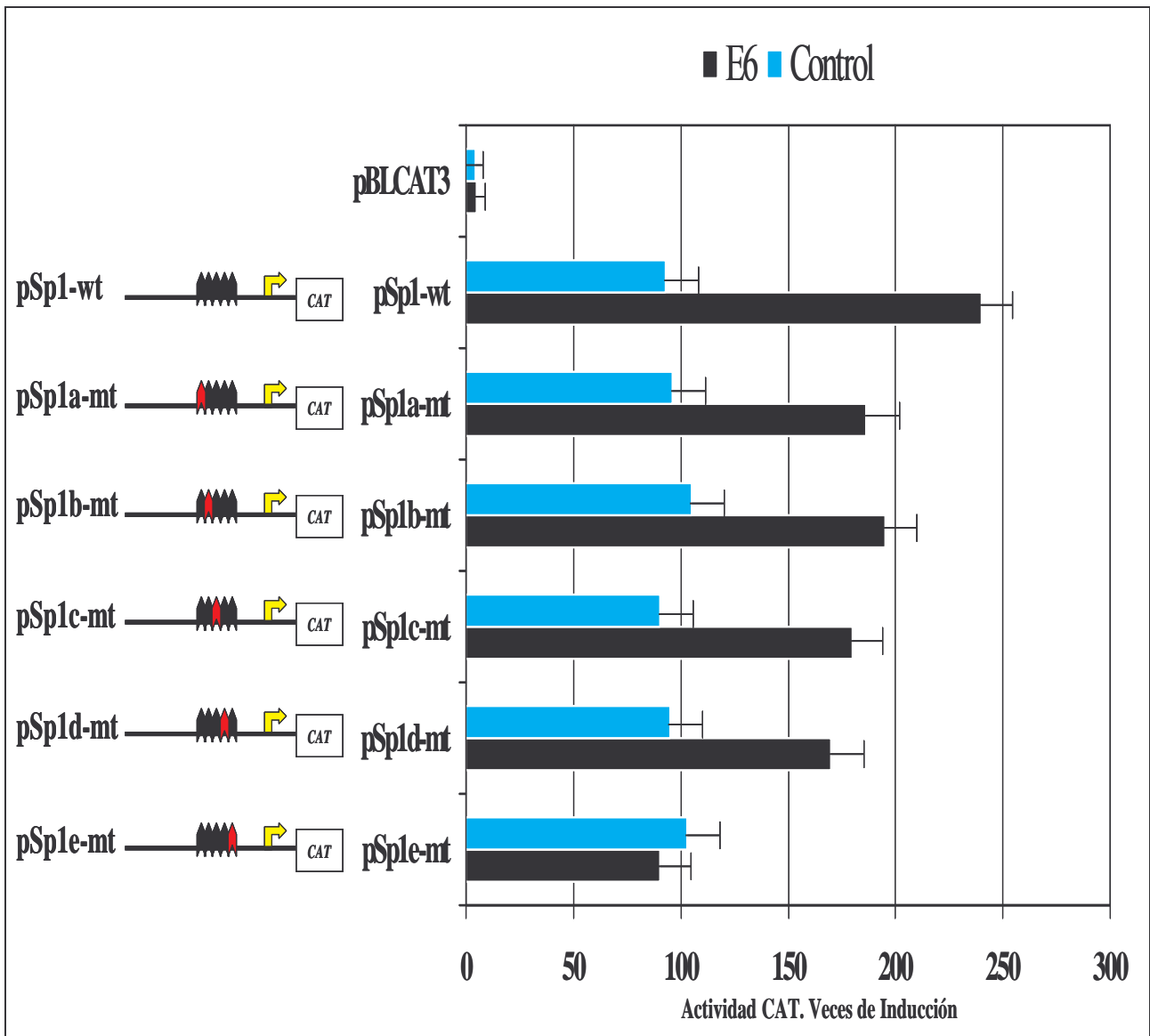
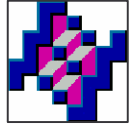


FIGURA 36. Análisis funcional de las secuencias de unión para Sp1 mutadas en el promotor central del gen humano de TGF- β 1. Las células C33A fueron transitoriamente transfectadas con el promotor central de TGF- β 1 en la versión original (Sp1-wt) o con las construcciones que contienen las versiones mutadas de Sp1 (Sp1-nts). La actividad de CAT fue evaluada 48 h después de la transfección. El pBLCAT3 corresponde al vector vacío. Las barras azules corresponden a la actividad promotora de TGF- β 1, mientras que las barras negras indican la actividad del promotor de TGF- β 1 inducida por la oncoproteína E6. Los datos son el promedio de cuatro experimentos independientes reproducibles.

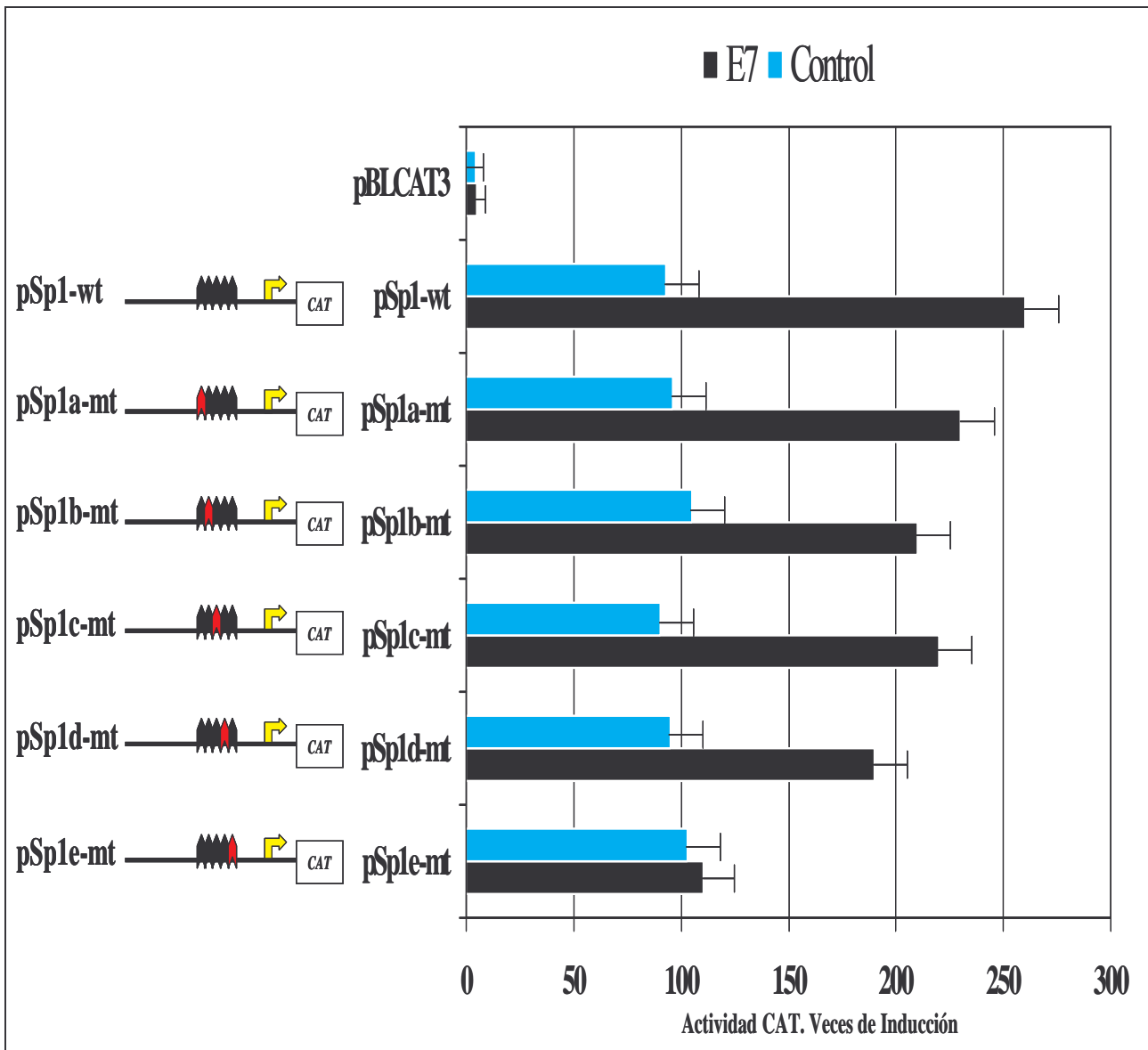
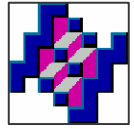
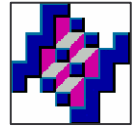


FIGURA 37. Análisis funcional de las secuencias de unión para Sp1 mutadas en el promotor central del gen humano de TGF-β1. Las células C33A fueron transitoriamente transfectadas con el promotor central de TGF-β1 en la versión original (Sp1-wt) o con las construcciones que contienen las versiones mutadas de Sp1 (Sp1-mts). La actividad de CAT fue evaluada 48 h después de la transfección. El pBLCAT3 corresponde al vector vacío. Las barras azules corresponden a la actividad promotora de TGF-β1, mientras que las barras negras indican la actividad del promotor de TGF-β1 inducida por la oncoproteína E7. Los datos son el promedio de cuatro experimentos independientes reproducibles.

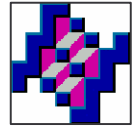


X.6. LAS ONCOPROTEINAS E6 Y E7 DE HPV-16 INTERACTUAN *IN VITRO* CON LA SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO PARA Sp1e EN EL PROMOTOR DEL GEN HUMANO DE TGF- β 1

Para confirmar el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 en el mecanismo de transactivación del promotor de TGF- β 1 y la importancia de la interacción física y de la cooperación funcional con la secuencia de unión para el factor de transcripción Sp1e, se realizó la caracterización de la secuencia Sp1e por ensayos de interacción con las secuencias de DNA y formación de complejos DNA-proteína tipo EMSA (Electrophoresis Movility Shifting Assays) (**Figura 38**) en el promotor central de TGF- β 1.

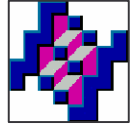
Para este propósito, se diseñó un oligonucleótido de doble cadena 100% complementario que corresponde a la sonda de DNA sintética que contiene la secuencia Sp1e del promotor central de TGF- β 1. Con esta sonda se determinó la habilidad de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 para interactuar con esta secuencia de DNA y la capacidad de formar complejos DNA-proteínas específicos (**Figura 39**). Por este tipo de ensayos se identificó la formación de un complejo de retardamiento DNA-proteína el cual fue observado cuando la sonda Sp1e fue incubada en presencia de extractos nucleares preparados de células C33A previamente transfectadas con los oncogenes E6 o E7 de HPV-16 (**Figura 40**, carriles 3 a 8). Se realizaron los ensayos de EMSA con concentraciones crecientes de los extractos nucleares para validar que el excedente de concentración de proteínas nucleares no afectara la formación del complejo DNA-proteína. Los resultados obtenidos demostraron que no hubo cambios significativos en la intensidad de la formación del complejo (datos no mostrados).

Para definir la especificidad de unión del complejo DNA-proteína identificado, se realizó un ensayo de competencia específica con la sonda Sp1e no marcada como competidor antólogo, y un ensayo de competencia inespecífica con la sonda AP-1 no marcada como competidor heterólogo. Los resultados mostraron que el complejo de retardamiento de DNA-proteína no fue competido con la sonda heteróloga de AP-1 (**Figura 40**, carriles 4 y 7), mientras que el complejo de retardamiento si fue eficientemente auto-competido cuando se utilizó la sonda Sp1e no marcada (**Figura 40**, carriles 9 y



10). Adicionalmente, para confirmar la especificidad de este complejo de retardamiento de DNA-proteína y la participación de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 en la formación de los complejos, se realizó la evaluación por el uso de anticuerpos policlonales anti-E6 y anti-E7 de HPV-16. En el ensayo se identificó la formación de un nuevo complejo de retardamiento DNA-proteína de mayor peso molecular el cual correspondió a los complejos de súper retardamiento cuando se incorporaron ambos anticuerpos de manera independiente (**Figura 40**, carriles 11 y 12). En este tipo de ensayo como un control irrelevante se incluyó el anticuerpo anti-IL6 el cual no tiene la capacidad de inducir la formación complejos DNA-proteína por lo menos con la sonda Sp1e. El resultado muestra que el anticuerpo anti-IL6 no indujo la formación de complejos de súper retardamiento (**Figura 40**, carriles 5 y 8) y confirma la especificidad del complejo de súper-retardamiento con los anticuerpos anti-E6 y anti-E7.

Con la intención de confirmar la participación del factor de transcripción Sp1 en la formación de los complejos de DNA-proteína, se realizó el ensayo de EMSA utilizando ahora un anticuerpo monoclonal anti-Sp1 (**Figura 41**). Nuevamente, los resultados obtenidos confirmaron que las células C33A transfectadas con los oncogenes E6 y E7 de HPV-16 inducen la formación del complejo de retardamiento de DNA-proteína, el cual es muy similar al compararlo con el complejo de retardamiento cuando se utilizaron extractos nucleares de células CaSKi, que son células cervicales tumorales transformadas con HPV-16 (**Figura 41**, carriles 3 y 4 vs carril 5). Este complejo de retardamiento fue eficientemente competido cuando se utilizó la sonda autóloga Sp1 sin marcar (**Figura 41**, carriles 6 a 8) y no fue competido cuando se utilizó la sonda heteróloga de AP-1 (**Figura 41**, carriles 9 a 11). Cuando se utilizaron los anticuerpos anti-E6, anti-E7 y anti-Sp1, se identificó la formación de un complejo de super retardamiento que fue similar cuando se utilizaron extractos nucleares de células C33A transfectadas con los oncogenes E6 y E7 de HPV-16, y con los extractos nucleares de las células CaSKi (**Figura 41**, carriles 12 a 18). Por lo tanto, los resultados de interacción con secuencias de DNA y formación de complejos DNA-proteína analizados por EMSA indican una asociación de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 con la secuencia de unión para el factor de transcripción Sp1e localizada en el promotor central de TGF- β 1, y con el factor de transcripción Sp1. Esta evidencia puede explicar en parte el mecanismo de trans-activación del promotor de TGF- β 1. Sin embargo, futuros experimentos son requeridos para determinar si ocurre una interacción DNA-proteína de naturaleza



directa o indirecta.

En conjunto, los resultados obtenidos de la actividad funcional por la inducción de la expresión del gen reportero CAT acoplado al promotor central de TGF- β 1, la interacción de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 con la secuencia específica de Sp1e, y la formación de complejos DNA-proteína específicos inducidos por las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 y del factor de transcripción Sp1; sugieren fuertemente una influencia de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 sobre la regulación de la expresión del promotor del gen humano de TGF- β 1.

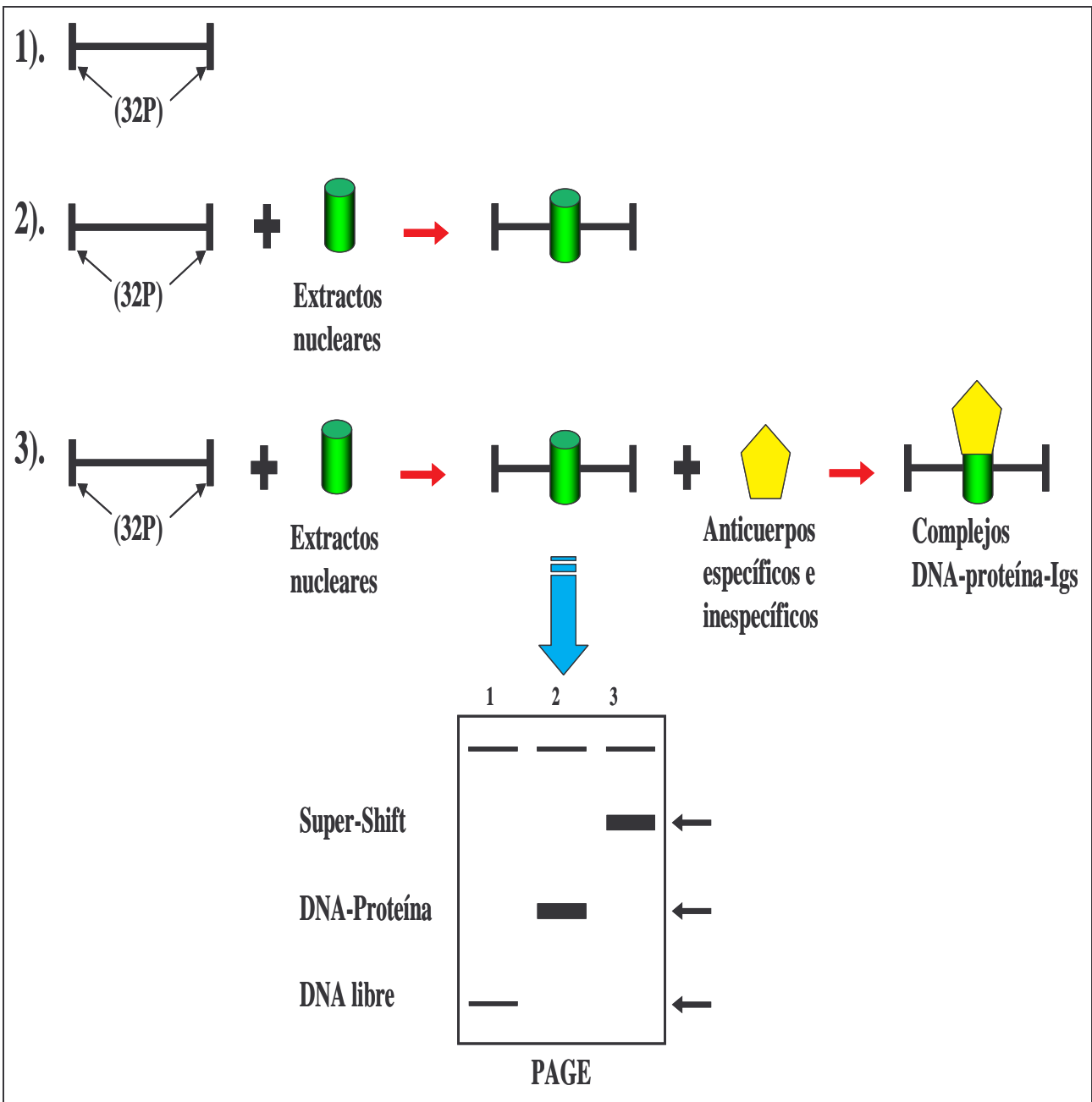
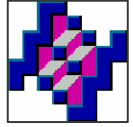


FIGURA 38. Diseño de la estrategia de interacción DNA-proteína tipo EMSA. Se diseñó un oligonucleótido de doble cadena de DNA que contiene la secuencia de unión para el sitio de unión Sp1e el cual se usó como sonda. Esta sonda fue marcada radioactivamente con ATP-[γ - ^{32}P] y fue incubada en ausencia o presencia de extractos nucleares. Posteriormente, fueron adicionados anticuerpos específicos contra E6 y E7 de HPV-16. Los complejos DNA-proteína fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).

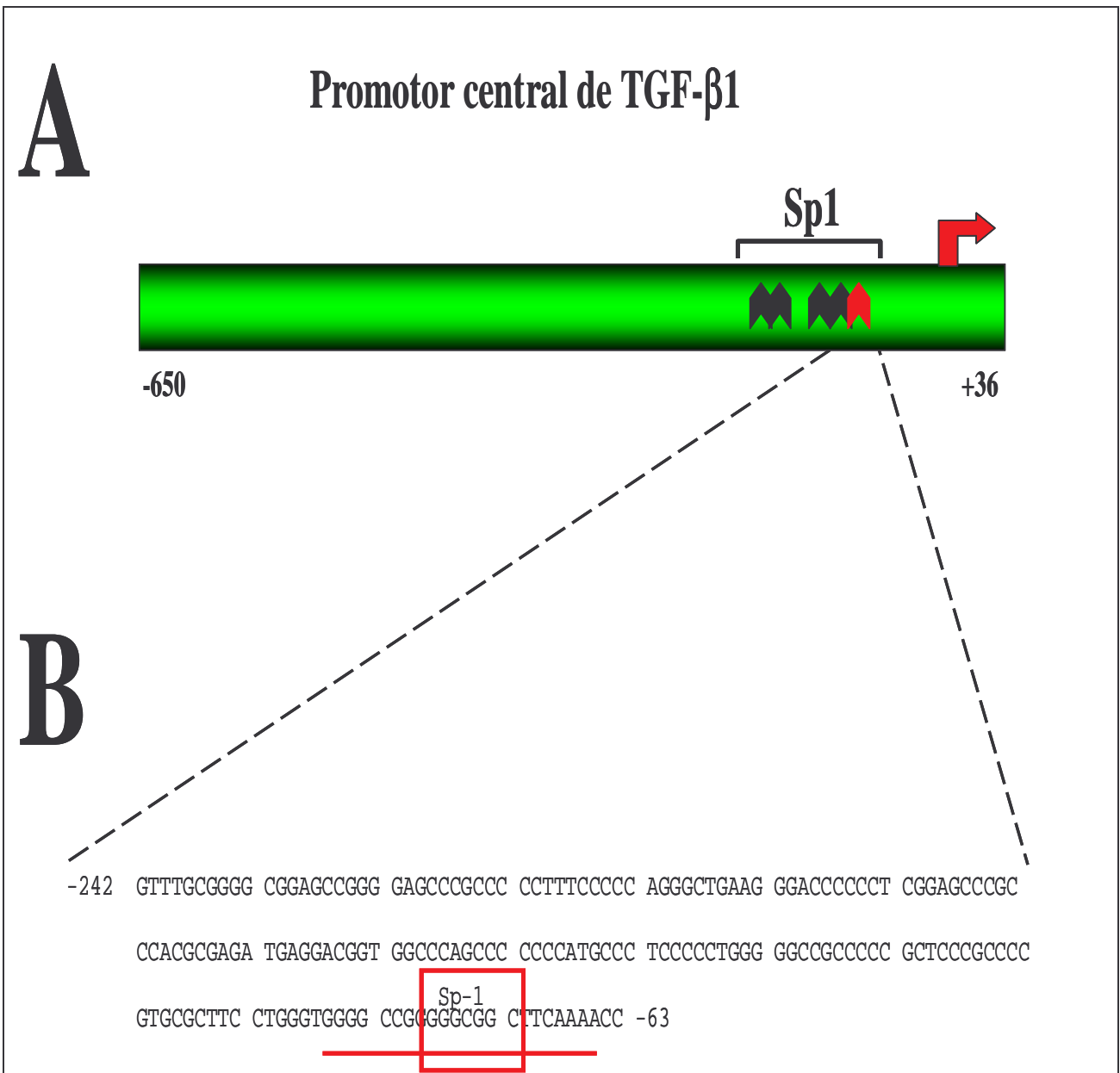


FIGURA 39. Diseño del oligonucleótido Sp1e para el ensayo de EMSA. A: Representación esquemática del promotor central del gen humano de TGF- β 1 y se indica la posición de las secuencias Sp1 y del primer sitio de inicio de la transcripción. **B:** Se muestra un fragmento de la secuencia del promotor central de TGF- β 1 y la localización de la sonda de oligonucleótidos Sp1e subrayado en rojo.

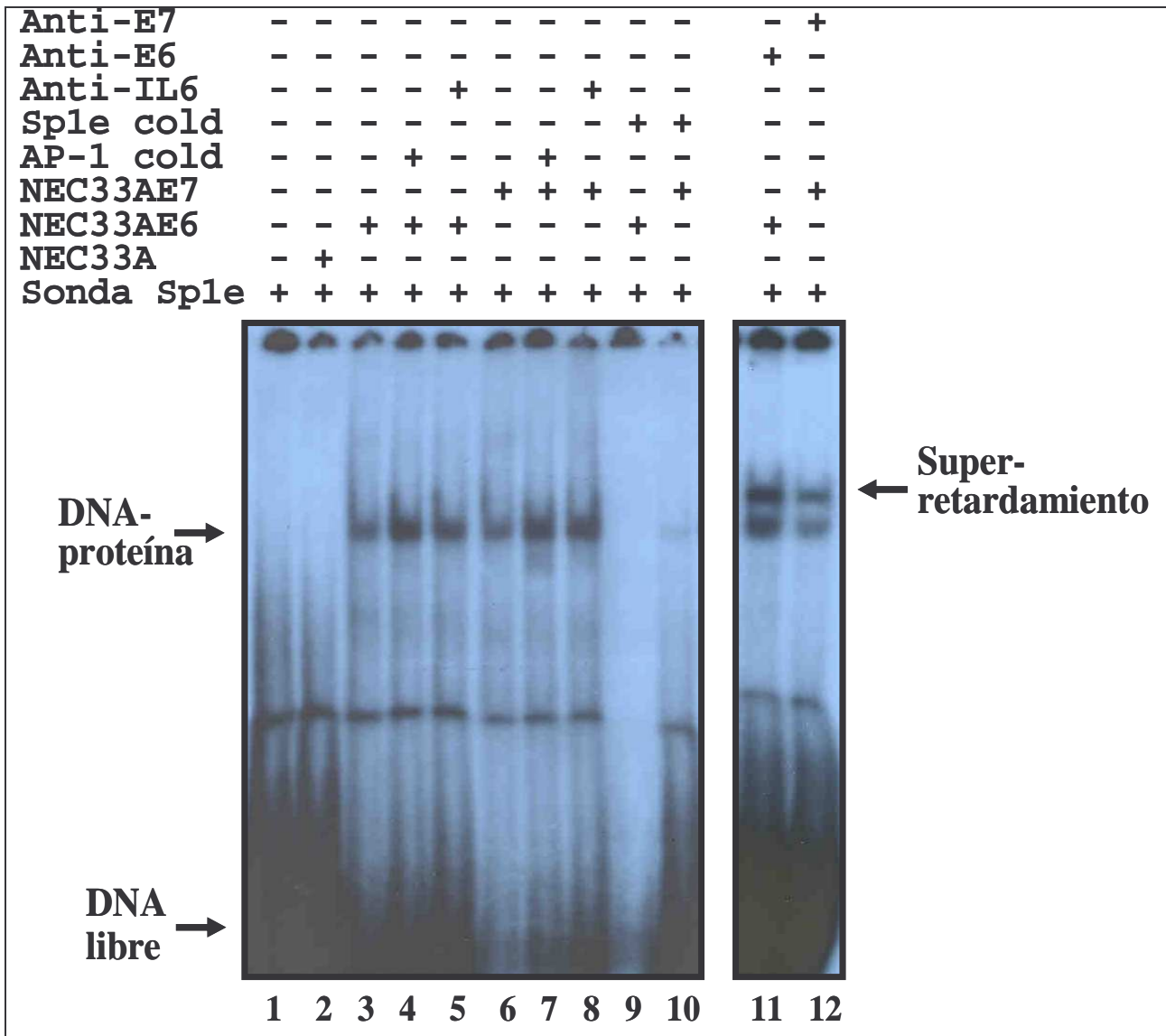
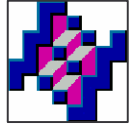


FIGURA 40. Análisis por EMSA de la secuencia de unión Sp1e del promotor central de TGF- β 1. El oligonucleótido de DNA de doble cadena Sp1e fue marcado radioactivamente con ATP-[γ - 32 P] y fue incubado en ausencia (carril 1) o presencia de extractos nucleares de células C33A no transfectadas (carril 2, NEC33A) o transfectadas con el oncogen E6 (carriles 3 a 5, 9 y 11; NEC33AE6) o el oncogen E7 (carriles 6 a 8, 10 y 12; NEC33AE7). Los extractos nucleares de NEC33AE6 y NEC33AE7 fueron pre-incubados con un exceso de 100 veces molar con las sondas no marcadas AP-1 o Sp1e antes de adicionar la sonda Sp1e marcada radioactivamente (carriles 4, 7, 9 y 10). Para el súper retardamiento fueron usados los anticuerpos policlonales anti-E6 y anti-E7 (carriles 11 y 12) y como anticuerpo irrelevante se usó el anticuerpo anti-IL6 (carriles 5 y 8). Las flechas indican la formación de los complejos DNA-proteínas, de súper-retardamiento y el DNA libre. Los datos son representativos de tres experimentos independientes reproducibles.

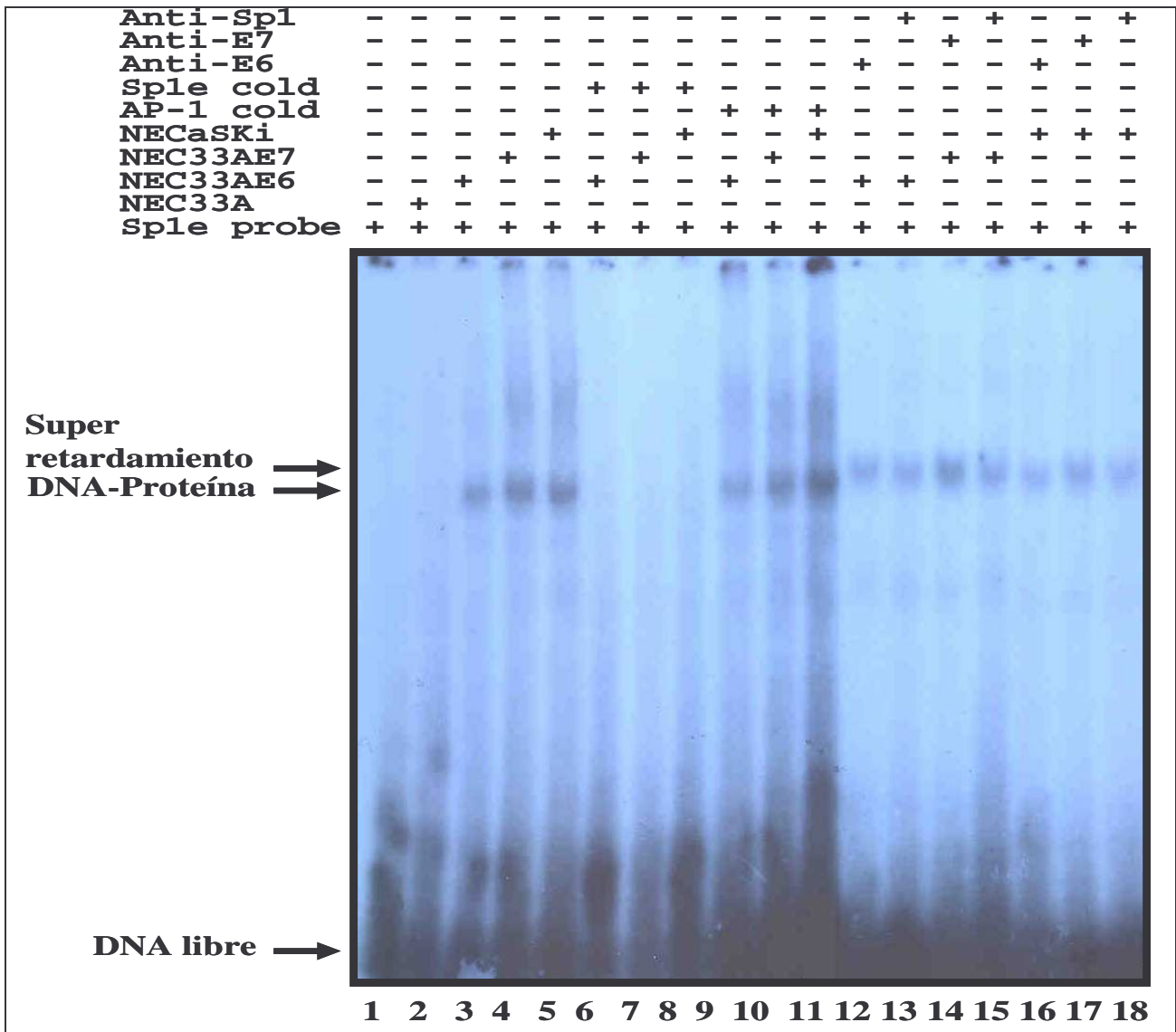
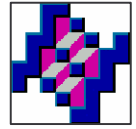


FIGURA 41. Análisis por EMSA de la secuencia de unión Sp1e del promotor central de TGF-β1. El oligonucleótido de DNA de doble cadena Sp1e fue marcado radioactivamente con ATP-[γ-32P] y fue incubado en ausencia (carril 1) o presencia de extractos nucleares de células C33A no transfectadas (carril 2, NEC33A) o transfectadas con el oncogen E6 (carriles 3, 6, 9, 12 y 13; NEC33AE6) o el oncogen E7 (carriles 4, 7, 10, 14 y 15; NEC33AE7). Los extractos nucleares de NEC33AE6 y NEC33AE7 fueron pre-incubados con un exceso de 100 veces molar con las sondas no marcadas Sp1 (carriles 6 a 8) o AP-1 (carriles 9 a 11) antes de adicionar la sonda Sp1e marcada radioactivamente. Para el súper retardamiento fueron usados los anticuerpos policlonales anti-E6 (carriles 12 y 16), anti-E7 (carriles 14 y 17) y anti-Sp1 (carriles 13, 15 y 18). Las flechas indican la formación de los complejos DNA-proteínas, de súper-retardamiento y el DNA libre. Los datos son representativos de tres experimentos independientes reproducibles.

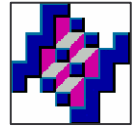


XI. DISCUSION

Durante el desarrollo del cáncer cérvico uterino, se presentan una cascada de eventos anormales los cuales incluyen alteraciones del ciclo celular, perturbaciones en la respuesta inmune anti-tumoral, y alteraciones en la expresión de genes. En todos estos procesos un elemento común que está implicado es la alteración de la expresión del gen de TGF- β 1. Varios estudios se han enfocado al análisis de los mecanismos de la expresión génica de TGF- β 1, de sus efectos biológicos en la proliferación y diferenciación celular, y en las funciones que tiene en el contexto de la respuesta inmune anti-tumoral [13, 68, 69, 71, 82, 85, 122]. En contraste, el conocimiento que se tiene en relación al mecanismo de regulación génica de TGF- β 1 durante la progresión del cáncer cérvico uterino es limitado.

La expresión del gen de TGF- β 1 es normalmente constitutiva, sin embargo, durante la progresión de los tumores hay una sobre expresión del gen, lo cual induce una condición favorable para el desarrollo de los tumores [13, 82, 85]. La reciente caracterización de las propiedades de trans-regulación de genes celulares por parte de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 ha demostrado que tienen efectos de trans-activación sobre distintos genes celulares [9-12]. Además, la demostración de que los sitios de unión al DNA para el factor de transcripción Sp1 son elementos importantes en la vía de transducción de señal inducida por TGF- β 1, y en la regulación del propio gen de TGF- β 1 [132]; permiten proponer la hipótesis de la participación de estas moléculas en la regulación de la expresión génica de TGF- β 1 durante el desarrollo del cáncer cérvico uterino. Por lo tanto, en este estudio demostramos los efectos de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 sobre la actividad del promotor del gen humano de TGF- β 1 en células cervicales tumorales humanas, a través de una secuencia de reconocimiento específica para Sp1.

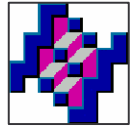
En este estudio se demostró que los niveles de expresión del RNAm y de la proteína de TGF- β 1 en células de cáncer cérvico uterino HPV positivas (HeLa, CaSKi y SiHA) fueron elevados en comparación con las células HPV negativas (C33A) (**Figura 21**). Estos datos son consistentes con los reportes de otros grupos en los cuales cambios en la expresión del gen de TGF- β 1 o en algunos de los componentes de la vía de transducción de señal inducida por TGF- β 1 pueden representar un factor de riesgo en el desarrollo del cáncer cérvico uterino [85, 146]. Los hallazgos aquí reportados apoyan la



posibilidad de que uno de los eventos que ocurren durante la progresión del cáncer cervical consiste en la inducción de la expresión del gen de TGF- β 1 en las células cervicales tumorales humanas transformadas con HPV, y este efecto es independiente del tipo de virus infectante HPV-16 o HPV-18. Esta situación puede favorecer la progresión del tumor, ya que varios estudios han demostrado que la sobre expresión de TGF- β 1 puede generar el desarrollo de un estado de inmunosupresión en el micro ambiente del tumor [141]. De acuerdo a estas evidencias, la presencia de TGF- β 1 podría inactivar la respuesta inmune anti-tumoral por su acción sobre los linfocitos T infiltrantes de tumor [141]. Esta condición puede ser interpretada como un mecanismo desarrollado por el propio tumor para evadir la vigilancia del sistema inmune y aumentar la progresión del cáncer cérvico uterino (Figura 42). Adicionalmente, hay varios reportes que han evidenciado las funciones de algunas proteínas del HPV en la regulación de moléculas involucradas en la respuesta inmune celular contra el tumor [147, 148].

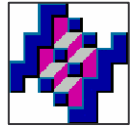
Por otra parte, el factor de transcripción Sp1 pertenece a una familia de proteínas que contienen un dominio de unión al DNA del tipo dedos de Zn, dos dominios ricos en serina/treonina, y dos dominios ricos en glicina. Estos dominios están involucrados en la oligomerización y reclutamiento de co-activadores como los miembros de la familia de proteínas Smad, los cuales participan en la vía de transducción de señal inducida por TGF- β 1 [92-94]. El factor de transcripción Sp1 interactúa constitutivamente con el promotor central de TGF- β 1 para generar un nivel de transcripción basal, independientemente de estímulos externos [132].

En este estudio se identificó un efecto sobre la actividad del promotor de TGF- β 1 por la acción de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 (Figura 28), lo cual puede ser explicado por la potencial interacción de estas oncoproteínas virales con el factor de transcripción Sp1, a través de sus dominios de oligomerización. Esta interacción induciría la formación de nuevos y putativos complejos heteroméricos constituidos por E6-Sp1 y E7-Sp1. Estos complejos hipotéticos podrían asociarse con las secuencias de reconocimiento en el DNA para Sp1 y cooperar con otros factores de transcripción adyacentes, con lo que se aumentaría la estabilidad de la maquinaria transcripcional, o alternativamente se favorecería el reclutamiento de factores del remodelaje de la cromatina co-activadores o co-represores que podrían incrementar o reprimir la actividad del promotor de TGF- β 1 respectivamente.



Los hallazgos aquí reportados demuestran que la secuencia en el DNA de unión a Sp1e en el promotor central de TGF- β 1 funcionalmente coopera con las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16. Este escenario está apoyado por el hecho de que la secuencia de unión para Sp1e mutado en el contexto de promotor central de TGF- β 1 no fue capaz de influir en los niveles de transcripción en respuesta a la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 (**Figuras 36 y 37**). Por lo tanto, es muy probable que se induzca la formación de estos hipotéticos complejos E6-Sp1 y E7-Sp1 que aquí se proponen, lo cual puede representar un evento importante para entender el mecanismo de regulación de la expresión génica de TGF- β 1 en respuesta a la infección por HPV. En consecuencia, el mecanismo molecular que aquí se ha identificado en la secuencia de unión a Sp1e del promotor central de TGF- β 1 permite proponer un modelo hipotético que podría explicar la función de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 como acopladores en el reclutamiento de moléculas de la maquinaria de transcripción a través del factor de transcripción Sp1. Además, sugiere una nueva función para este motivo de unión al DNA. Sin embargo, se requieren de futuros experimentos *in vitro* e *in vivo* para confirmar y evidenciar la formación de los hipotéticos complejos E6-Sp1 y E7-Sp1.

Interesantemente, los experimentos de interacción con las secuencias de DNA y la formación de complejos DNA-proteína mostraron la presencia de un patrón preferencial de unión al DNA para las secuencias de reconocimiento para Sp1 cuando se utilizaron los extractos nucleares de células C33A transfectadas con los oncogenes E6 y E7 de HPV-16 (**Figura 35**). Este efecto podría ser el resultado de la capacidad de factores de transcripción y/o de co-activadores para asociarse con E6 y E7 e inducir la protección de las secuencias de DNA en el ensayo de Footprinting. Se ha reportado que la proteína p300/CBP, una histona acetiltransferasa, interactúa directamente con el dominio COOH-terminal de las proteínas Smad2 y Smad3, y sirve como co-activador de la activación de la transcripción de TGF- β 1 mediada por Smads [149]. Adicionalmente, ha sido demostrado que la oncoproteína E6 de HPV-16 se asocia con p300/CBP. Esta interacción involucra el dominio COOH-terminal de unión del DNA de tipo dedos de Zn de E6 y los residuos de aminoácidos de 1808 a 1826 de p300/CBP [149, 150]. Además, se ha demostrado que E7 tiene la capacidad de interactuar con el factor de transcripción TBP (TATA box Binding Protein) y regular la expresión de genes que participan en el control del ciclo celular. Por lo tanto, estas evidencias sugieren que la trans-activación del gen de TGF- β 1 por las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 puede involucrar la asociación de los factores de transcripción Sp1 y de las proteínas



Smads a través de la incorporación y acción del co-activador p300/CBP, así como del factor de transcripción universal TBP. Sin embargo, futuras investigaciones son necesarias para confirmar y descifrar la participación de p300/CBP o de otros co-activadores o co-represores en la formación de los hipotéticos complejos E6-Sp1 y E7-Sp1.

En conclusión, los hallazgos aquí reportados tienen las siguientes implicaciones: 1) Parte de los mecanismos de regulación de la expresión génica de TGF- β 1 en las células de cáncer cérvico uterino humano involucran la trans-activación del promotor de TGF- β 1 mediado por las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16. 2) Se demostró que este mecanismo de trans-activación es inducido por las oncoproteínas E6 y E7 a través de la secuencia del DNA específica para la unión de Sp1e en el promotor central de TGF- β 1. 3) Se propone un modelo hipotético en donde las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 se acoplan al factor de transcripción Sp1 en el promotor central de TGF- β 1 y pueden inducir el reclutamiento de co-activadores o co-represores para regular la expresión génica de TGF- β 1. 4) Se propone la hipótesis de que la sobre expresión de TGF- β 1 inducida por las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 puede ser un mecanismo que evolucionó en las células tumorales como una estrategia para evadir la vigilancia del sistema inmune en la respuesta inmune anti-tumoral. Finalmente, los hallazgos aquí reportados del mecanismo de trans-activación del promotor de TGF- β 1 inducido por las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 no excluye otros eventos que influyan en la evolución del cáncer cérvico uterino, como serían las alteraciones presentes en la vía de transducción de señal inducida por TGF- β 1 ya previamente identificadas. Adicionalmente al mecanismo de trans-activación, otros procesos de regulación podrían estar participando como el reclutamiento de complejos de remodelaje de la arquitectura de la cromatina, componentes de la vía de señalización por TGF- β 1, la activación de otras cascadas intracelulares de señalización, y el entrecruzamiento con otras vías de transducción de señales; los cuales todos ellos son elementos importantes para el entendimiento global de la función de TGF- β 1 en el proceso de carcinogénesis cervical.

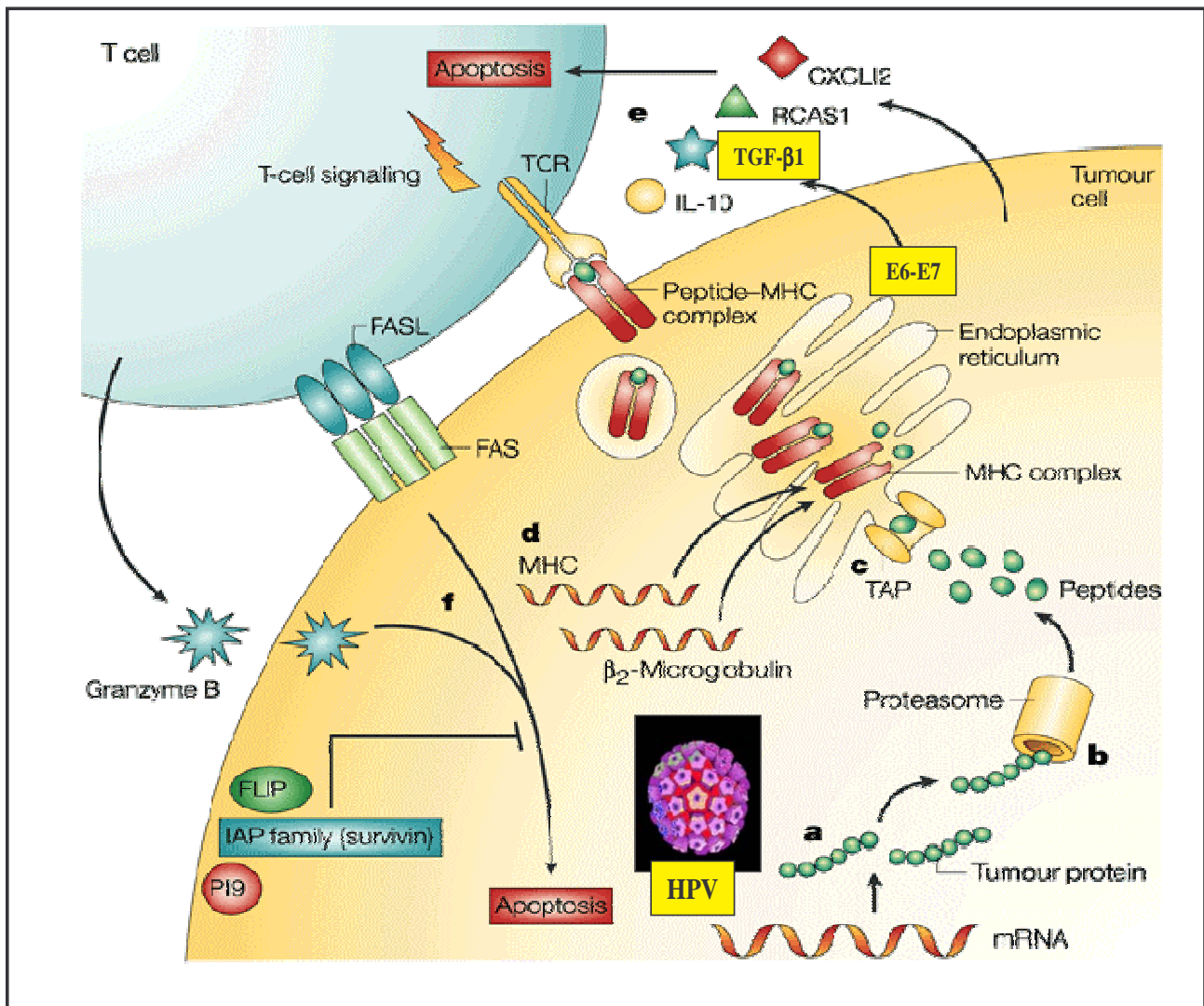
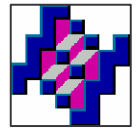
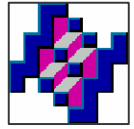


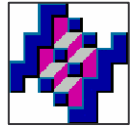
FIGURA 42. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune en las células cervicales tumorales infectadas por HPV. Después de la infección por el HPV, las células expresan las proteínas virales (a) que son procesadas por el proteosoma (b) y transportadas por las moléculas TAP (c) para acoplarse a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad MHC (d). En esta serie de eventos se expresan las oncoproteínas virales E6 y E7 las cuales pueden inducir la expresión de citocinas inmunosupresoras como TGF- β 1 como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune anti-tumoral e inducir la apoptosis de los linfocitos T (e). Otro mecanismo de evasión de la respuesta inmune es la inhibición de la vía de la apoptosis mediada por el complejo de moléculas Fas-ligando en la célula tumoral infectada con HPV (f).



XII. CONCLUSIONES

Por el análisis y discusión de los resultados presentados en la presente tesis, las conclusiones a las que se pueden llegar son las siguientes:

- 1). El aumento de la expresión del RNAm y de la proteína de TGF- β 1 humano correlaciona con la presencia del HPV en células cervicales tumorales humanas.
- 2). Las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 inducen la trans-activación del promotor central del gen humano de TGF- β 1.
- 3). Las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 tienen la capacidad de interactuar con el promotor de TGF- β 1 y de formar complejos DNA-proteína específicos. Además, esta interacción es específica en las secuencias de unión para el factor de transcripción Sp1.
- 4). Las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 interactúan específicamente con la secuencia de unión para el factor de transcripción Sp1e del promotor central de TGF- β 1. Por lo tanto, la inducción del promotor de TGF- β 1 por E6 y E7 de HPV-16 es mediado por un mecanismo de trans-activación a través del elemento regulador Sp1e del promotor central de TGF- β 1.
- 5). El mecanismo de trans-activación del promotor de TGF- β 1 por E6 y E7 de HPV-16 reportado en este trabajo, no excluye la participación de otros eventos que participen en el proceso de carcinogénesis, como la alteración de las vías de transducción de señal inducidas por TGF- β 1.
- 6). Los hallazgos aquí reportados apoyan la hipótesis de que el mecanismo de trans-activación del promotor del gen humano de TGF- β 1 inducido por las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16, representa una alternativa de evasión de la respuesta inmune antitumoral y eventualmente puede favorecer el proceso de carcinogénesis cervical.



XIII. PERSPECTIVAS

Por el análisis y discusión de los resultados presentados en la presente tesis, las perspectivas que se plantean son las siguientes:

1). En el presente trabajo se identificó el mecanismo molecular de trans-activación del promotor del gen humano de TGF- β 1 inducido por las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16. Si embargo, se propone la formación de hipotéticos complejos moleculares constituidos por las oncoproteínas E6 y E7 asociadas al factor de transcripción celular Sp1 (E6-Sp1 y E7-Sp1), los cuales podrían estar involucrados en este mecanismo de trans-activación. Sin embargo, por los resultados obtenidos en el presente estudio, no es posible demostrar la formación de estos complejos moleculares. Por lo tanto, una de las perspectivas a continuar sería demostrar la formación de estos complejos moleculares y su efectiva funcionalidad en el mecanismo de trans-activación del promotor de TGF- β 1.

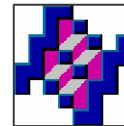
2). Otro aspecto que se plantea en este trabajo es que si bien se ha demostrado el mecanismo de trans-activación del promotor de TGF- β 1 inducido por E6 y E7 de HPV-16, es importante demostrar si existe una interacción directa o indirecta de las oncoproteínas virales con las secuencias genómicas del promotor de TGF- β 1. Aunque nuestros resultados demostraron el mecanismo de trans-activación, no tienen la capacidad de definir si existe una interacción directa o indirecta de las oncoproteínas E6 y E7 con el DNA del promotor del gen de TGF- β 1. De acuerdo a las evidencias experimentales reportadas por otros grupos, todo parece sugerir que el primer evento que ocurre es una interacción directa de las oncoproteínas E6 y E7 con factores de transcripción celulares o con co-activadores o co-represores; y posteriormente una interacción indirecta con el DNA de regiones promotoras de los genes de estudio. Sin embargo, los esfuerzos deben dirigirse en el sentido de demostrar la naturaleza de esta interacción en los mecanismos de trans-activación de genes por parte de E6 y E7 de HPV-16.

3). Un aspecto que puede ser interesante de ser analizado y que no se realizó en el presente trabajo es evaluar la expresión de la proteína soluble de TGF- β 1 por ELISA en los sobrenadantes de los cultivos de las células C33A cuando fueron transfectadas con los oncogenes E6 y E7 de HPV-16 y compararlo con las células C33A no transfectadas. El resultado que se esperaría es que cuando las



células fueran transfectadas con los oncogenes virales, hubiera una correlación en el aumento de la expresión de la proteína de TGF- β 1, lo cual representaría una evidencia más de que la presencia de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 tienen una influencia en la inducción de la expresión de TGF- β 1. Sin embargo, este aspecto puede ser analizado en ensayos futuros.

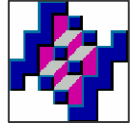
4). Finalmente, la inducción de la expresión de TGF- β 1 en el desarrollo del cáncer cérvico uterino podría inducir el desarrollo de un estado de inmunosupresión local, lo cual representaría un evento exitoso para el cáncer cervical como un mecanismo de escape de la respuesta inmune anti-tumoral. No obstante, se requiere de los diseños experimentales adecuados para demostrar que efectivamente existe este mecanismo de escape de la respuesta inmune por parte del tumor, tanto en el modelo *in vitro* como en el modelo *in vivo*, en donde participa TGF- β 1 como un protagonista importante en este escenario.



XIV. AGRADECIMIENTOS

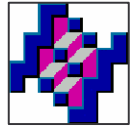
Este trabajo fue realizado en su mayor parte en las instalaciones del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) con dirección postal en Avenida Universidad número 655, Colonia Santa María Ahuacatlán, Cuernavaca Morelos, México. C. P. 62508. Además, este proyecto fue apoyado por un financiamiento Federal del propio INSP, así como por un financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) con número de expediente 1018-M9111. El M. en C. Oscar Peralta Zaragoza fue apoyado con una beca de estudiante de Doctorado con número de expediente 117983 por parte del CONACYT-SEP.

El autor agradece al Dr. Vicente Madrid Marina, Director del Area de Biología Molecular de Patógenos del Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas del INSP, por el apoyo recibido para la realización y conclusión del presente trabajo. De igual manera le agradece al Dr. Félix Recillas Targa del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por su asesoría y por la estancia doctoral que se realizó en su laboratorio; así como le agradece a la Técnico Georgina Guerrero Avendaño del Laboratorio del Dr. Recillas por la asistencia técnica. También externa sus agradecimientos al Dr. Fernando Esquivel Guadarrama y al Dr. Joaquín Sánchez Castillo, investigadores de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), por sus valiosas contribuciones en la revisión académica y crítica del escrito. Además, externa sus agradecimientos a todos los miembros del Laboratorio 4 planta baja del CISEI-INSP y a todos los investigadores y a las personas del INSP y de la UNAM que de alguna manera contribuyeron a la conclusión de este trabajo. De manera especial el autor manifiesta sus agradecimientos a la L. I. Claudia Gómez Cerón por su apoyo incondicional en la realización del presente trabajo, así como por su asistencia profesional y la revisión fina del trabajo.



XV. REFERENCIAS

- [1]. Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 92(9):690-698. 2000.
- [2]. Varmus H. An historical overview of oncogenes. In *Oncogenes and the molecular origins of cancer*. De. Cold Spring Harbor Lab Press. Cap 1:3-44. 1989.
- [3]. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2(5):342-350. 2002.
- [4]. Seedorf K, Oltersdorf T, Krammer G, Rowekamp W. Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16 (HPV 16) and type 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells. *EMBO J.* 6(1):139-144. 1987.
- [5]. Pinion SB, Kennedy JH, Miller RW, MacLean AB. Oncogene expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer of cervix. *Lancet.* 337(8745):819-820. 1991.
- [6]. Meyer T, Christophers E, Beckmann ER, Schroder S, Gissmann L, Stockfleth E. Association of rare human papillomavirus types with genital premalignant and malignant lesions. *J Infect Dis.* 178(1):252-255. 1998.
- [7]. Sousa R, Dostatni N, Yaniv M. Control of papillomavirus gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 1032(1):19-37. 1990.
- [8]. Levine AJ, Momand J. Tumor suppressor genes: the p53 and retinoblastoma sensitivity genes and gene products. *Biochim Biophys Acta.* 1032(1):119-136. 1990.
- [9]. Desaintes C, Hallez S, Van Alphen P, Burny A. Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 66(1):325-333. 1992.
- [10]. Maldonado E, Cabrejos ME, Banks L, Allende JE. Human papillomavirus-16 E7 protein inhibits the DNA interaction of the TATA binding transcription factor. *J Cell Biochem.* 85(4):663-669. 2002.
- [11]. Morosov A, Phelps WC, Raychaudhuri P. Activation of the c-fos gene by the HPV16 oncoproteins depends upon the cAMP-response element at -60. *J Biol Chem.* 269(28):18434-18440. 1994.
- [12]. Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci USA.* Jul 8;100(14):8211-8216. 2003.
- [13]. Pasche B. Role of transforming growth factor beta in cancer. *J Cell Physiol.* 186(2):153-168. 2001.
- [14]. Tervahauta A, Syrjanen S, Yliskoski M, Gold LI, Syrjanen K. Expression of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 in human papillomavirus (HPV)-associated lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 1994 54(3):349-56; 1994.
- [14]. Comerci JT Jr, Runowicz CD, Flanders KC, De Victoria C, Fields AL, Kadish AS, Goldberg GL. Altered expression of transforming growth factor-beta 1 in cervical neoplasia as an early biomarker in carcinogenesis of the uterine cervix. *Cancer.* 77(6):1107-1114. 1996.
- [15]. Woo KM, Lee G, Kook JK, Min BM. Conversion of normal human oral keratinocytes to tumorigenic cells



is associated with the acquisition of resistance to TGF-beta. *Int J Oncol.* 12(4):833-839. 1998.

[16]. El-Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, Jenkins D. Decreased synthesis and expression of TGF-beta1, beta2, and beta3 in epithelium of HPV 16-positive cervical precancer: a study by microdissection, quantitative RT-PCR, and immunocytochemistry. *J Pathol.* 192(4):494-501. 2000.

[16]. Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol.* 1;167(5):2972-8. 2001.

[17]. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 55(2):74-108. 2005.

[18]. Larsen NS. Invasive cervical cancer rising in young white females. *J Natl Cancer Inst.* 86(1):6-7. 1994.

[19]. Berumen J, Miranda EI, Zafra G, Casas L, Segura E, Ordonez RM, Aguirre J, Martinez M, Rosas A, Ibarra V, Pedraza L, Saad A, Marroquin A, Gutierrez M, Martinez A, Gariglio P. Molecular epidemiology of high-incidence cancers in Mexico. *Gac Med Mex.* 133 Suppl 1:35-41. 1997.

[20]. Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol.* 65(2):606-612. 1991.

[21]. Schiffman MH, Castle P. Epidemiologic studies of a necessary causal risk factor: human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 95(6):E2. 2003.

[22]. Golijow CD, Abba MC, Mouron SA, Gomez MA, Dulout FN. C-myc gene amplification detected in preinvasive intraepithelial cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer.* 11(6):462-465. 2001.

[23]. Sharma A, Pratap M, Sawhney VM, Khan IU, Bhambhani S, Mitra AB. Frequent amplification of C-erbB2 (HER-2/Neu) oncogene in cervical carcinoma as detected by non-fluorescence in situ hybridization technique on paraffin sections. *Oncology.* 56(1):83-87. 1999.

[24]. Barrera-Rodriguez R, Peralta-Zaragoza O, Madrid-Marina V. Molecular bases of cancer immunology. *Salud Publica Mex.* 37(4):344-353. 1995.

[25]. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 189(1):12-19. 1999.

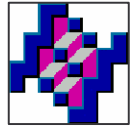
[26]. Yasumoto S, Burkhardt AL, Doniger J, DiPaolo JA. Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J Virol.* 57(2):572-577. 1986.

[27]. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 8(12):3905-3910. 1989.

[28]. Collier L, Oxford J. *Human Virology.* Oxford University Press. USA. Second Edition, Chapter 15: Papovaviruses. 2000.

[29]. Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, Doniger J, DiPaolo JA. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol.* 61(4):1061-1066. 1987.

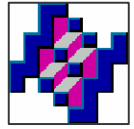
[30]. Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissman L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol.* 66 (Pt 7):1515-1522. 1985.



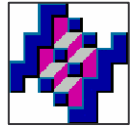
- [31]. Luft F, Klaes R, Nees M, Durst M, Heilmann V, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M. Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *Int J Cancer*. 92(1):9-17. 2001.
- [32]. Ocadiz R, Saucedo R, Cruz M, Graef AM, Gariglio P. High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res*. 47(15):4173-4177. 1987.
- [33]. Chen JJ, Reid CE, Band V, Androphy EJ. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science*. 269(5223):529-531. 1995.
- [34]. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 63(6):1129-1136. 1990.
- [35]. Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev*. 10(19):2438-2451. 1996.
- [36]. Dick FA, Dyson NJ. Three regions of the pRB pocket domain affect its inactivation by human papillomavirus E7 proteins. *J Virol*. 76(12):6224-6234. 2002.
- [37]. Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, Whitaker NJ, Scheffner M. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(3):1218-1223. Epub 2001.
- [38]. Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol*. 77(19):10186-10201. 2003.
- [39]. Syrjanen SM, Syrjanen KJ. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med*. 31(3):175-187. 1999.
- [40]. Vieira KB, Goldstein DJ, Villa LL. Tumor necrosis factor alpha interferes with the cell cycle of normal and papillomavirus-immortalized human keratinocytes. *Cancer Res*. 56(10):2452-2457. 1996.
- [41]. Shier MK, Neely EB, Ward MG, Meyers C, Howett MK. Transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) down-regulates expression and function of proliferation-inducing molecules in HPV-transformed cells. *Anticancer Res*. 19(6B):4977-4982. 1999.
- [42]. Stadnyk AW. Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J*. 8(13):1041-1047. 1994.
- [43]. Khan MA, Tolleson WH, Gangemi JD, Pirisi L. Inhibition of growth, transformation, and expression of human papillomavirus type 16 E7 in human keratinocytes by alpha interferons. *J Virol*. 67(6):3396-3403. 1993.
- [44]. Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 8(2):209-220. 2001.
- [45]. Al-Saleh W, Delvenne P, Arrese JE, Nikkels AF, Pierard GE, Boniver J. Inverse modulation of intraepithelial Langerhans' cells and stromal macrophage/dendrocyte populations in human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Virchows Arch*. 427(1):41-48. 1995.



- [46]. Hamsikova E, Ludvikova V, Smahel M, Sapp M, Vonka V. Prevalence of antibodies to human papillomaviruses in the general population of the Czech Republic. *Int J Cancer*. 77(5):689-694. 1998.
- [47]. Marais DJ, Rose RC, Lane C, Kay P, Nevin J, Denny L, Soeters R, Dehaeck CM, Williamson AL. Seroresponses to human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, and 45 virus-like particles in South African women with cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *J Med Virol*. 60(4):403-410. 2000.
- [48]. De Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JM, Stukart MJ, Doekhie FS, Remmink AJ, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Duggan-Keen MF, Stern PL, Meijer CJ, Scheper RJ. Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: a longitudinal study. *Cancer Res*. 58(8):1700-1706. 1998.
- [49]. Bontkes HJ, de Gruijl TD, Bijl A, Verheijen RH, Meijer CJ, Scheper RJ, Stern PL, Burns JE, Maitland NJ, Walboomers JM. Human papillomavirus type 16 E2-specific T-helper lymphocyte responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol*. 80 (Pt 9):2453-2459. 1999.
- [50]. Bontkes HJ, de Gruijl TD, Walboomers JM, Schiller JT, Dillner J, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Scheper RJ, Meijer CJ. Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. II. Systemic but not local IgA responses correlate with clearance of HPV-16. *J Gen Virol*. 80 (Pt 2):409-417. 1999.
- [51]. Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Chiriva-Internati M, Zhan D, Pecorelli S, Parham GP, Cannon MJ. Induction of human papillomavirus-specific CD4(+) and CD8(+) lymphocytes by E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with human papillomavirus type 16- and 18-positive cervical cancer. *J Virol*. 73(7):5402-5410. 1999.
- [52]. Nakagawa M, Stites DP, Farhat S, Sisler JR, Moss B, Kong F, Moscicki AB, Palefsky JM. Cytotoxic T lymphocyte responses to E6 and E7 proteins of human papillomavirus type 16: relationship to cervical intraepithelial neoplasia. *J Infect Dis*. 175(4):927-931. 1997.
- [53]. Nakagawa M, Stites DP, Patel S, Farhat S, Scott M, Hills NK, Palefsky JM, Moscicki AB. Persistence of human papillomavirus type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens. *J Infect Dis*. 182(2):595-598. Epub 2000.
- [54]. Bontkes HJ, de Gruijl TD, van den Muysenberg AJ, Verheijen RH, Stukart MJ, Meijer CJ, Scheper RJ, Stacey SN, Duggan-Keen MF, Stern PL, Man S, Borysiewicz LK, Walboomers JM. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. *Int J Cancer*. 88(1):92-98. 2000.
- [55]. Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today*. 12(3):A49-A53. 1991.
- [56]. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 76(2):241-51. 1994.
- [57]. Dupuy C, Buzoni-Gatel D, Touze A, Le Cann P, Bout D, Coursaget P. Cell mediated immunity induced in mice by HPV 16 L1 virus-like particles. *Microb Pathog*. 22(4):219-225. 1997.
- [58]. Tsukui T, Hildesheim A, Schiffman MH, Lucci J 3rd, Contois D, Lawler P, Rush BB, Lorincz AT, Corrigan A, Burk RD, Qu W, Marshall MA, Mann D, Carrington M, Clerici M, Shearer GM, Scott DR, Houghten RA, Berzofsky JA. Interleukin 2 production in vitro by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. *Cancer Res*. 56(17):3967-3974. 1996.



- [59]. Scott M, Stites DP, Moscicki AB. Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 6(5):751-755. 1999.
- [60]. Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trabattoni D, Villa ML, Stefanon B, Venzon DJ, Shearer GM, De Palo G, Clerici E. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst.* 89(3):245-250. 1997.
- [61]. Al-Saleh W, Giannini SL, Jacobs N, Moutschen M, Doyen J, Boniver J, Delvenne P. Correlation of T-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J Pathol.* 184(3):283-290. 1998.
- [62]. Clerici M, Shearer GM, Clerici E. Cytokine dysregulation in invasive cervical carcinoma and other human neoplasias: time to consider the TH1/TH2 paradigm. *J Natl Cancer Inst.* 90(4):261-263. 1998.
- [63]. Woodworth CD, Simpson S. Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines. *Am J Pathol.* 142(5):1544-1555. 1993.
- [64]. Mota F, Rayment N, Chong S, Singer A, Chain B. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol.* 116(1):33-40. 1999.
- [65]. Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer.* 2(1):59-65. 2002.
- [66]. Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang MN, Johnson KE, Kastelein R, Fiorentino DF, deVries JE, Roncarolo MG, Mosmann TR, Moore KW. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI. *PNAS USA.* 88(4):1172-1176. 1991.
- [67]. Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim Biophys Acta.* 1032(1):79-87. 1990.
- [68]. Lyons RM, Moses HL. Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem.* 187(3):467-473. 1990.
- [69]. Peralta-Zaragoza O, Lagunas-Martinez A, Madrid-Marina V. Transforming growth factor beta-1: structure, function, and regulation mechanisms in cancer *Salud Publica Mex.* 43(4):340-351. 2001.
- [70]. Tada T, Ohzeki S, Utsumi K, Takiuchi H, Muramatsu M, Li XF, Shimizu J, Fujiwara H, Hamaoka T. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol.* 146(3):1077-1082. 1991.
- [71]. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol.* 16:137-161. 1998.
- [72]. Suda T, Zlotnik A. In vitro induction of CD8 expression on thymic pre-T cells. II. Characterization of CD3-CD4-CD8 alpha + cells generated in vitro by culturing CD25+CD3-CD4-CD8- thymocytes with T cell growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* 149(1):71-76. 1992.
- [73]. Swain SL, Huston G, Tonkonogy S, Weinberg A. Transforming growth factor-beta and IL-4 cause helper T cell precursors to develop into distinct effector helper cells that differ in lymphokine secretion pattern and cell



surface phenotype. *J Immunol.* 147(9):2991-3000. 1991.

[74]. Su HC, Leite-Morris KA, Braun L, Biron CA. A role for transforming growth factor-beta 1 in regulating natural killer cell and T lymphocyte proliferative responses during acute infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Immunol.* 147(8):2717-2727. 1991.

[75]. Su HC, Ishikawa R, Biron CA. Transforming growth factor-beta expression and natural killer cell responses during virus infection of normal, nude, and SCID mice. *J Immunol.* 151(9):4874-4890. 1993.

[76]. Matloubian M, Kolhekar SR, Somasundaram T, Ahmed R. Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol.* 67(12):7340-7349. 1993.

[77]. Maeda H, Shiraishi A. TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J Immunol.* 156(1):73-78. 1996.

[78]. Maeda H, Kuwahara H, Ichimura Y, Ohtsuki M, Kurakata S, Shiraishi A. TGF-beta enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice. *J Immunol.* 155(10):4926-4932. 1995.

[79]. Czarniecki CW, Chiu HH, McCabe SM, Palladino MA. Transforming growth factor-beta 1 modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. *J Immunol.* 140(12):4217-4223. 1988.

[80]. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.* 6:597-641. 1990.

[81]. Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol.* 119(5):1017-1021. 1992.

[82]. Beck C, Schreiber H, Rowley D. Role of TGF-beta in immune-evasion of cancer. *Microsc Res Tech.* 52(4):387-395. 2001.

[83]. Awwad M, North RJ. Immunologically mediated regression of a murine lymphoma after treatment with anti-L3T4 antibody. A consequence of removing L3T4+ suppressor T cells from a host generating predominantly Lyt-2+ T cell-mediated immunity. *J Exp Med.* 168(6):2193-2206. 1988.

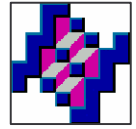
[84]. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science.* 271(5256):1734-1736. 1996.

[85]. Rich J, Borton A, Wang X. Transforming growth factor-beta signaling in cancer. *Microsc Res Tech.* 52(4):363-373. 2001.

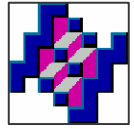
[86]. De Larco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75(8):4001-4005. 1978.

[87]. Jakowlew SB, Cubert J, Danielpour D, Sporn MB, Roberts AB. Differential regulation of the expression of transforming growth factor-beta mRNAs by growth factors and retinoic acid in chicken embryo chondrocytes, myocytes, and fibroblasts. *J Cell Physiol.* 150(2):377-385. 1992.

[88]. Da Cunha A, Vitkovic L. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) expression and regulation in rat cortical astrocytes. *J Neuroimmunol.* 36(2-3):157-169. 1992.



- [89]. Steigerwalt RW, Rundhaug JE, Nettesheim P. Transformed rat tracheal epithelial cells exhibit alterations in transforming growth factor-beta secretion and responsiveness. *Mol Carcinog.* 5(1):32-40. 1992.
- [90]. Massague J. Receptors for the TGF-beta family. *Cell.* 69(7):1067-1070. 1992.
- [91]. Hinck AP, Archer SJ, Qian SW, Roberts AB, Sporn MB, Weatherbee JA, Tsang ML, Zhang BL, Wenker J, Torchia DA. Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2. *Biochemistry.* 35(26):8517-8534. 1996.
- [92]. Massague J. TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell.* 85(7):947-950. 1996.
- [93]. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 67:753-791. 1998.
- [94]. Whitman M. Signal transduction. Feedback from inhibitory SMADs. *Nature.* 389(6651):549-551. 1997.
- [95]. Okadome T, Yamashita H, Franzen P, Moren A, Heldin CH, Miyazono K. Distinct roles of the intracellular domains of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in signal transduction. *J Biol Chem.* 269(49):30753-30756. 1994.
- [96]. Cheifetz S, Hernandez H, Laiho M, ten Dijke P, Iwata KK, Massague J. Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J Biol Chem.* 265(33):20533-20538. 1990.
- [97]. Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell.* 68(4):775-785. 1992.
- [98]. Lin HY, Wang XF. Expression cloning of TGF-beta receptors. *Mol Reprod Dev.* 32(2):105-110. 1992.
- [99]. Kusanagi K, Inoue H, Ishidou Y, Mishima HK, Kawabata M, Miyazono K. Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad-binding element. *Mol Biol Cell.* 11(2):555-565. 2000.
- [100]. Ishida W, Hamamoto T, Kusanagi K, Yagi K, Kawabata M, Takehara K, Sampath TK, Kato M, Miyazono K. Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J Biol Chem.* 275(9):6075-6079. 2000.
- [101]. Chen YG, Hata A, Lo RS, Wotton D, Shi Y, Pavletich N, Massague J. Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev.* 12(14):2144-2152. 1998.
- [102]. Wu G, Chen YG, Ozdamar B, Gyuricza CA, Chong PA, Wrana JL, Massague J, Shi Y. Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science.* 287(5450):92-97. 2000.
- [103]. Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, Kern SE. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell.* 1(4):611-6117. 1998.
- [104]. Chen SJ, Yuan W, Lo S, Trojanowska M, Varga J. Interaction of smad3 with a proximal smad-binding element of the human alpha2(I) procollagen gene promoter required for transcriptional activation by TGF-beta. *J Cell Physiol.* 183(3):381-392. 2000.
- [105]. Lee KS, Hong SH, Bae SC. Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. *Oncogene.*



21(47):7156-7163. 2002.

[106]. Shen X, Liberati NT, Datto MB, Frederick JP, Wang XF. TGF-beta-induced phosphorylation of Smad3 regulates its interaction with coactivator p300/CREB-binding protein. *Mol Biol Cell*. 9(12):3309-3319. 1998.

[107]. Xu W, Angelis K, Danielpour D, Haddad MM, Bischof O, Campisi J, Stavnezer E, Medrano EE. Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type beta transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(11):5924-5929. 2000.

[108]. Satterwhite DJ, Moses HL. Mechanisms of transforming growth factor-beta 1-induced cell cycle arrest. *Invasion Metastasis*. 14(1-6):309-318. 1994.

[109]. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 81(3):323-330. 1995.

[110]. Smith EJ, Nevins JR. The Rb-related p107 protein can suppress E2F function independently of binding to cyclin A/cdk2. *Mol Cell Biol*. 15(1):338-344. 1995.

[111]. Ko TC, Yu W, Sakai T, Sheng H, Shao J, Beauchamp RD, Thompson EA. TGF-beta1 effects on proliferation of rat intestinal epithelial cells are due to inhibition of cyclin D1 expression. *Oncogene*. 16(26):3445-3454. 1998.

[112]. Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev*. 9(15):1831-1845. 1995.

[113]. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev*. 8(1):9-22. 1994.

[114]. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*. 371(6494):257-261. 1994.

[115]. Datto MB, Yu Y, Wang XF. Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem*. 270(48):28623-28628. 1995.

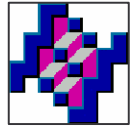
[116]. Rorke EA, Zhang D, Choo CK, Eckert RL, Jacobberger JW. TGF-beta-mediated cell cycle arrest of HPV16-immortalized human ectocervical cells correlates with decreased E6/E7 mRNA and increased p53 and p21(WAF-1) expression. *Exp Cell Res*. 259(1):149-157. 2000.

[117]. Ewen ME, Sluss HK, Whitehouse LL, Livingston DM. TGF beta inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell*. 74(6):1009-1020. 1993.

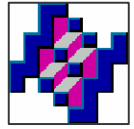
[118]. Sandhu C, Garbe J, Bhattacharya N, Daksis J, Pan CH, Yaswen P, Koh J, Slingerland JM, Stampfer MR. Transforming growth factor beta stabilizes p15INK4B protein, increases p15INK4B-cdk4 complexes, and inhibits cyclin D1-cdk4 association in human mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol*. 17(5):2458-2467. 1997.

[119]. Warner BJ, Blain SW, Seoane J, Massague J. Myc downregulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(Ink4b) G(1) arrest pathway. *Mol Cell Biol*. 19(9):5913-5922. 1999.

[120]. Obaya AJ, Kotenko I, Cole MD, Sedivy JM. The proto-oncogene c-myc acts through the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27(Kip1) to facilitate the activation of Cdk4/6 and early G(1) phase progression. *J Biol Chem*. 277(34):31263-31269. Epub 2002.



- [121]. Datta PK, Bagchi S. Repression of transforming growth factor beta 1 promoter by the adenovirus oncogene E1A. Identification of a unique GC-rich sequence as a target for E1A repression. *J Biol Chem.* 269(41):25392-25399. 1994.
- [122]. Kim SJ, Glick A, Sporn MB, Roberts AB. Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-beta 1 gene. *J Biol Chem.* 264(1):402-408. 1989.
- [123]. Kim SJ, Denhez F, Kim KY, Holt JT, Sporn MB, Roberts AB. Activation of the second promoter of the transforming growth factor-beta 1 gene by transforming growth factor-beta 1 and phorbol ester occurs through the same target sequences. *J Biol Chem.* 264(32):19373-19378. 1989.
- [124]. Roberts AB, Kim SJ, Kondaiah P, Jakowlew SB, Denhez F, Glick AB, Geiser AG, Watanabe S, Noma T, Lechleider R, et al. Transcriptional control of expression of the TGF-betas. *Ann N Y Acad Sci.* 593:43-50. 1990.
- [125]. Kim SJ, Jeang KT, Glick AB, Sporn MB, Roberts AB. Promoter sequences of the human transforming growth factor-beta 1 gene responsive to transforming growth factor-beta 1 autoinduction. *J Biol Chem.* 264(12):7041-7045. 1989.
- [126]. Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, Karin M, Roberts AB. Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol.* 10(4):1492-1497. 1990.
- [127]. Kim SJ, Park K, Koeller D, Kim KY, Wakefield LM, Sporn MB, Roberts AB. Post-transcriptional regulation of the human transforming growth factor-beta 1 gene. *J Biol Chem.* 267(19):13702-13707. 1992.
- [128]. Scotto L, Vaduva PI, Wager RE, Assoian RK. Type beta 1 transforming growth factor gene expression. A corrected mRNA structure reveals a downstream phorbol ester responsive element in human cells. *J Biol Chem.* 265(4):2203-2208. 1990.
- [129]. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature.* 316(6030):701-705. 1985.
- [130]. Batuman OA, Ferrero A, Jimenez SA, Khalili K. Differential regulation of transforming growth factor beta-1 gene expression by glucocorticoids in human T and glial cells. *J Immunol.* 155(9):4397-4405. 1995.
- [131]. Parrelli JM, Meisler N, Cutroneo KR. Identification of a glucocorticoid response element in the human transforming growth factor beta 1 gene promoter. *Int J Biochem Cell Biol.* 30(5):623-627. 1998.
- [132]. Feng XH, Lin X, Derynck R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *EMBO J.* 19(19):5178-5193. 2000.
- [133]. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol.* 75(9):4283-4296. 2001.
- [134]. Dey A, Atcha IA, Bagchi S. HPV16 E6 oncoprotein stimulates the transforming growth factor-beta 1 promoter in fibroblasts through a specific GC-rich sequence. *Virology.* 228(2):190-199. 1997.
- [135]. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 13.78-13.104. 1989.



- [136]. Kanda T, Furuno A, Yoshiike K. Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells. *J Virol.* 62(2):610-613. 1988.
- [137]. Nordeen SK, Green PP 3rd, Fowlkes DM. A rapid, sensitive, and inexpensive assay for chloramphenicol acetyltransferase. *DNA.* 6(2):173-178. 1987.
- [138]. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* 11(5):1475-1489. 1983.
- [139]. Recillas-Targa F, de Maura Gallo CV, Scherrer K, Marcaud L. Silencer and enhancer elements located at the 3'-side of the chicken and duck α -globin-encoding gene domains. *Gene.* 129:229-237. 1993.
- [140]. Stoeck M, Miescher S, MacDonald HR, Von Fliedner V. Transforming growth factors beta slow down cell-cycle progression in a murine interleukin-2 dependent T-cell line. *J Cell Physiol.* 141(1):65-73. 1989.
- [141]. Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, Park BH, Schreiber H, Moses HL, Rowley DA. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(4):1486-1490. 1990.
- [142]. Chen T, de Vries EG, Hollema H, Yegen HA, Vellucci VF, Strickler HD, Hildesheim A, Reiss M. Structural alterations of transforming growth factor-beta receptor genes in human cervical carcinoma. *Int J Cancer.* 82(1):43-51. 1999.
- [143]. Chu TY, Lai JS, Shen CY, Liu HS, Chao CF. Frequent aberration of the transforming growth factor-beta receptor II gene in cell lines but no apparent mutation in pre-invasive and invasive carcinomas of the uterine cervix. *Int J Cancer.* 80(4):506-510. 1999.
- [144]. Santin AD, Hermonat PL, Hiserodt JC, Fruehauf J, Schranz V, Barclay D, Pecorelli S, Parham GP. Differential transforming growth factor-beta secretion in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 64(3):477-480. 1997.
- [145]. Woodworth CD, Chung J, McMullin E, Plowman GD, Simpson S, Iglesias M. Transforming growth factor beta 1 supports autonomous growth of human papillomavirus-immortalized cervical keratinocytes under conditions promoting squamous differentiation. *Cell Growth Differ.* 7(6):811-820. 1996.
- [146]. Wakefield LM, Roberts AB. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 12(1):22-29. 2002.
- [147]. O'Brien PM, Saveria Campo M. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Res.* 88(1-2):103-117. 2002.
- [148]. Zhang B, Li P, Wang E, Brahmi Z, Dunn KW, Blum JS, Roman A. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology.* 310(1):100-108. 2003.
- [149]. Pouponnot C, Jayaraman L, Massague J. Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP. *J Biol Chem.* 273(36):22865-22868. 1988.
- [150]. Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, O'Connor MJ. The HPV-16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol.* 73(8):6209-6219. 1999.



XVI. ANEXOS

PUBLICACIONES GENERADAS COMO PRODUCTOS DE LA REALIZACION DE LA PRESENTE TESIS

1). **Peralta-Zaragoza O.** Martínez Lagunas A, Madrid Marina V. TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA-1: STRUCTURE, FUNCTION AND REGULATION MECHANISMS IN CANCER. Revista Salud Pública de México. 43(4): 340-351; 2001.

2). **Peralta-Zaragoza O.** Bermúdez-Morales VH, Gutiérrez-Xicotencatl L, Alcocer-González JM, Recillas-Targa F, Madrid Marina V. TGF- β 1 PROMOTER IS TRANS-ACTIVATED BY HPV-16 E6 AND E7 ONCOPROTEINS. Immunology. 453-457; 2004.

3). **Peralta-Zaragoza O.** Bermúdez-Morales VH, A, Gutiérrez-Xicotencatl L, Alcocer-González JM, Recillas-Targa F, Madrid-Marina V. E6 AND E7 ONCOPROTEINS FROM HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 INDUCE ACTIVATION OF HUMAN TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA-1 PROMOTER THROUGHOUT Sp1 REGULATORY ELEMENT. Viral Immunology. 2006 (Aceptado).

Reprinted from:

IMMUNOLOGY

2004

MEDIMOND

INTERNATIONAL PROCEEDINGS

TGF- β 1 Promoter Is Trans-activated By HPV-16 E6 and E7 Oncoproteins

O. Peralta-Zaragoza¹, VH. Bermúdez-Morales¹,
L. Gutiérrez-Xicotencatl¹, JM Alcocer-González²,
F. Recillas-Targa³ and V. Madrid- Marina¹

¹National Institute of Public Health, Division of Molecular Biology of Pathogens, Av. Universidad 655, Cuernavaca, Morelos, México 62508. ²School of Biologist Science, UANL, Monterrey Nuevo León, México 66450. ³Institute of Cellular Physiology, UNAM, México D. F. 04510

Summary

Human Papillomavirus (HPV) is the main etiologic agent of cervical cancer, and HPV E6 and E7 oncogenes *trans*-regulate many cellular genes. An association between TGF- β 1 gene expression and the development of cervical cancer has been suggested, however the mechanisms by which HPV influence TGF- β 1 expression remain unclear. In this study we analyze the mechanism throughout HPV-16 E6 and E7 oncoproteins regulate the TGF- β 1 promoter in cervical tumor cells. Our results showed that E6 and E7 increase TGF- β 1 promoter activity. By gel-shift assays we identified a Sp1 binding site in the TGF- β 1 promoter mediating such *trans*-activation. These results suggest an association between oncoproteins and cellular transcription factors on TGF- β 1 promoter and this may explain the contribution of HPV-16 on TGF- β 1 expression in cervical cancer.

Introduction

Cervical cancer is the second most common cause of cancer death in women worldwide. Clinical and epidemiological data associate the HPV infection with cervical cancer development (1), and 99.7% of all cervical carcinomas contain HPV DNA (2). The E6 and E7 oncogenes alter cell differentiation, reactivate host DNA synthesis and stimulate cell cycle progression. Thus, E6 and E7 can immortalize and transform

human keratinocytes (3). These effects are the result of association with several cellular proteins. HPV-16 E6 oncoprotein binds to E6AP which target p53 tumor suppressor protein for rapid degradation by the proteasome and loss of p53 leads to increased genetic instability (4). HPV-16 E7 oncoprotein binds pRb causing release of E2F transcription factors, which in turn stimulate expression of multiple genes involved in cell cycle progression (5). In addition, other important interactions of E6 and E7 with cellular proteins had been reported (6-8). Besides the oncogenic and anti-apoptotic potential of E6 and E7 had also been reported that these oncoproteins can modulate transcription of cellular genes (9). In addition, HPV-16 E6 oncoprotein stimulates the TGF- β 1 promoter (10), however a specific target motif for E6- and E7-mediated *trans*-activation has not yet been identified. To understand the molecular mechanism of TGF- β 1 gene expression mediated by HPV-16 E6 and E7 and their *trans*-activation abilities, we investigated the effects of E6 and E7 oncoproteins on the promoter activity of human TGF- β 1 gene in tumor cervical cell lines. We found that E6 and E7 *trans*-activate TGF- β 1 promoter. This effect is the result of HPV-16 E6 and E7 action over one Sp1 recognition sequences. Thus, our results describe a novel molecular pathway in which HPV-16 E6 and E7 oncoproteins *trans*-activate the TGF- β 1 promoter, and suggest a possible strategy by which HPV-16 induces TGF- β 1 expression during cervical cancer development.

Materials and Methods

PLASMID CONSTRUCTS. TGF- β 1 promoter was obtained by PCR-amplification and nucleotide sequence was identical to reported previously (GenBankTM/EMBL accession number: J04431) (11). This DNA fragment was cloned into pBLCAT3 vector and different constructs were generated by deletion of promoter. The integrity of constructs was verified by restriction enzyme digestions and DNA sequencing.

CAT ASSAYS. HPV negative cells (C33A) were transfected with TGF- β 1 promoter constructs using Lipofectamine reagent. 48 h after transfection, cells were harvested and nuclear extracts were prepared. Co-transfections were performed with pSV2E6 and pSV2E7 plasmids. The CAT activity was measured according to Nordeen method (12).

EMSA ASSAYS. Nuclear extracts were prepared according to Dignam method (13) from C33A cells alone or transfected with the pSV2E6 and pSV2E7. The EMSA was performed as reported previously (14). A Sp1 probe was end-radiolabeled and incubated with nuclear extracts from C33A cells alone or transfected with pSV2E6 and pSV2E7. DNA-protein complexes were resolved by PAGE. The gel was dried and subjected to autoradiography. All experiments were repeated four independent times.

Results and Conclusions

REGULATION OF TGF- β 1 PROMOTER BY HPV-16 E6 AND E7. To understand the mechanism of TGF- β 1 gene regulation by HPV-16 E6 and E7 oncoproteins, we analyzed the effect of E6 and E7 on the TGF- β 1 promoter activity by CAT reporter gene. For this purpose, C33A cells were transfected with the constructs that contain the TGF- β 1 promoter (Fig. 1A). The results showed that when the 3'-distal end sequence was deleted, the TGF- β 1 promoter activity was not affected. In contrast, when the 5'-distal end sequence was eliminated, the reporter activity diminished up to 40%. To evaluate the specific role of the HPV-16 E6 and E7 oncoproteins in TGF- β 1 promoter *trans*-activation, C33A cells were co-transfected with E6 and E7 oncogenes. The results showed a two-fold increase in the reporter gene expression using the TGF- β 1 core promoter (Fig. 1B, construct pTGF3) in E6 and E7

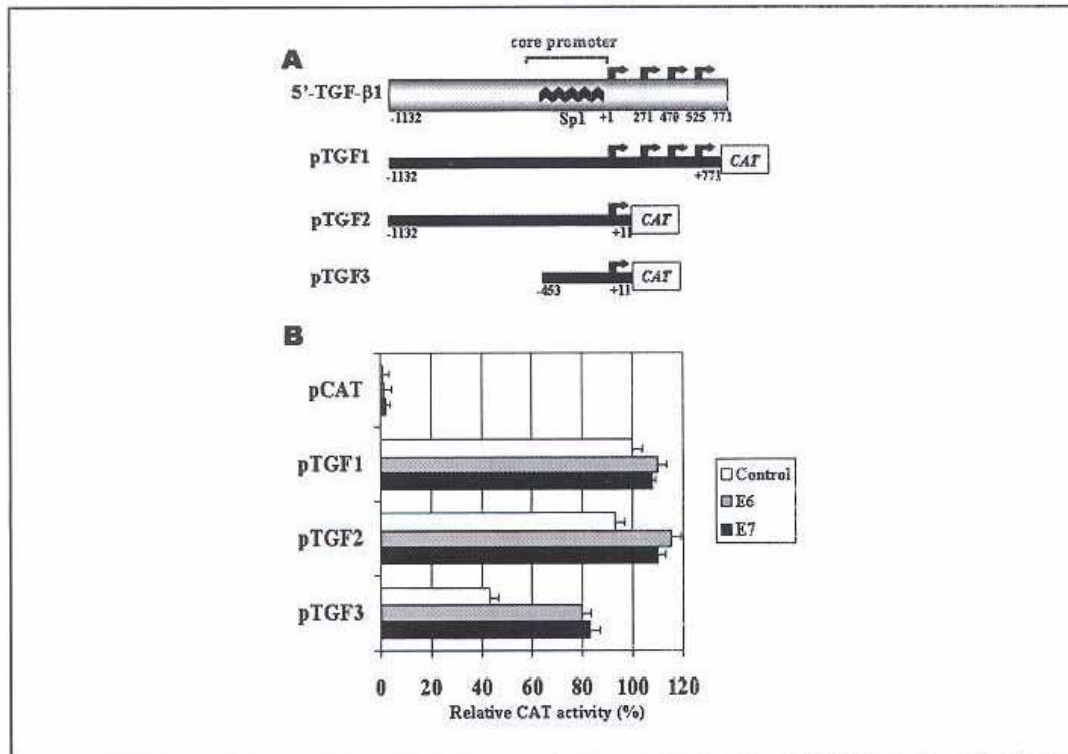


FIGURE 1. FUNCTIONAL ANALYSIS OF TGF- β 1 PROMOTER TRANS-ACTIVATED BY HPV-16 E6 AND E7. A) Plasmid constructs of TGF- β 1 promoter were generated in pBLCAT3 vector. B) C33A cells were transfected with the three pTGFs constructs and co-transfected with pSV2E6 and pSV2E7 plasmids. 48 h after co-transfection CAT activity was measured. The pCAT corresponds to the empty vector. White bars correspond to TGF- β 1 promoter activity alone, meanwhile the grey and black bars indicate the TGF- β 1 promoter activity induced by HPV-16 E6 and E7 oncoproteins.

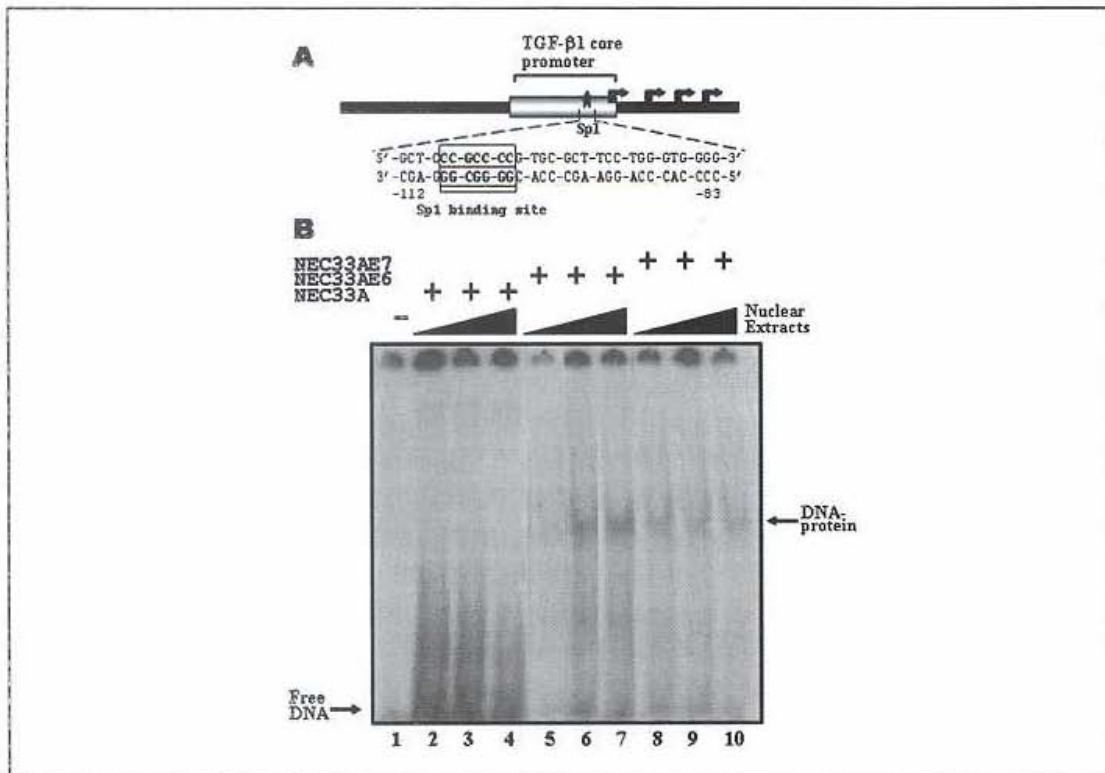


FIGURE 2. EMSA ANALYSIS OF TGF- β 1 CORE PROMOTER. A) TGF- β 1 core promoter shows the Sp1 probe sequence. B) The Sp1 probe was radiolabeled and incubated in absence (lane 1) or presence of increase concentration of nuclear extracts from C33A cells alone (lanes 2 to 4) or transfected with HPV-16 E6 or E7 oncogenes (lanes 5 to 10). The DNA-protein complexes and free-DNA are indicated by the arrows.

expressing cells. These results support the notion of that E6 and E7 oncoproteins involved in cellular immortalization and transformation are also able to *trans*-activate the TGF- β 1 gene expression.

HPV-16 E6 AND E7 BIND TO Sp1 IN TGF- β 1 PROMOTER. In an effort to identify the target sequences responsible of TGF- β 1 promoter *trans*-activation by HPV-16 E6 and E7, we analyzed the TGF- β 1 core promoter sequence and identify a cluster of five Sp1 recognition sequences. To evaluate the effects of HPV-16 E6 and E7 oncoproteins in the physical interaction with Sp1 binding sites, we analyze one of the Sp1 binding sites by EMSA (Fig. 2A). The results showed that a retarded DNA-protein complex was observed with Sp1 probe when incubated with increase concentration of nuclear extracts from C33A cells transfected with HPV-16 E6 and E7 oncogenes (Fig. 2B, lanes 5 to 10). Our DNA-protein interaction results suggest an association of HPV-16 E6 and E7 oncoproteins with Sp1 recognition site of TGF- β 1 core promoter, which may to be in part responsible of TGF- β 1 *trans*-activation. In conclusion, the evidences of the functional activity and interactions

with the Sp1 specific sequence suggest an association of HPV-16 E6 and E7 oncoproteins with TGF- β 1 promoter and may explain the contribution of the HPV-16 oncoproteins on TGF- β 1 gene expression during cervical cancer development. Finally, the relevance of our findings is based on the fact that TGF- β 1 gene expression mechanisms are important to understand the role of TGF- β 1 in the carcinogenesis process.

Acknowledgments

This work was supported by CONACYT of México with a grand No. 1018-M9111 and Peralta-Zaragoza O. was supported by a fellowship number 117983

References

1. zur Hausen H. HPV and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2: 342-350; 2002.
2. Walboomers JM. *et al.* HPV is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 189: 12-19; 1999.
3. Munger K. *et al.* HPV immortalization and transformation functions. *Virus Res*. 89: 213-228; 2002.
4. Scheffner M. *et al.* The E6 oncoprotein encoded by HPV 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 63: 1129-1136; 1990.
5. Dick FA. *et al.* Three regions of the pRb pocket domain affect its inactivation by HPV E7 proteins. *J Virol*. 76: 6224-6234; 2002.
6. Antinore MJ. *et al.* The HPV 16 E7 gene product interacts with and transactivates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J*. 15: 1950-960; 1996.
7. Veldman T. *et al.* HPV E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 8211-8216; 2003.
8. Cho NH. *et al.* Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with HPV: cyclin-dependent kinase inhibitors. *Yonsei Med J*. 43: 722-728; 2002.
9. Nees M. *et al.* HPV 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol*. 75: 4283-4296; 2001.
10. Dey A. *et al.* HPV16 E6 oncoprotein stimulates the TGF- β 1 promoter in fibroblasts through a specific GC-rich sequence. *Virology*. 228: 190-199; 1997.
11. Kim SJ. *et al.* Characterization of the promoter region of the human TGF- β 1 gene. *J Biol Chem*. 264: 402-408; 1989.
12. Nordeen SK. *et al.* A rapid, sensitive, and inexpensive assay for CAT. *DNA*. 6: 173-178; 1987.
13. Dignam JD. *et al.* Accurate transcription initiation by RNA pol II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*. 11: 1475-1489; 1983.
14. Sambrook J. *et al.* Molecular cloning a laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

Volume ISBN 88-7587-069-1
CD ISBN 88-7587-070-5



MEDIMOND S.r.l.

MONDUZZI EDITORE

INTERNATIONAL PROCEEDINGS DIVISION



Via Maserati 5, 40128 Bologna, Italy
Tel. (+39) 051 4151123 · Fax (+39) 051 370529
www.medimond.com



Viral Immunology: <http://mc.manuscriptcentral.com/liebert/vim>

**E6 AND E7 ONCOPROTEINS FROM HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16
INDUCE ACTIVATION OF HUMAN TRANSFORMING GROWTH FACTOR
BETA-1 PROMOTER THROUGHOUT Sp1 RECOGNITION SEQUENCE**

Journal:	<i>Viral Immunology</i>
Manuscript ID:	VIM-06-0009.R1
Manuscript Type:	Articles
Date Submitted by the Author:	27-Feb-2006
Complete List of Authors:	Peralta-Zaragoza, Oscar; National Institute of Public Health, Division of Pathogens Molecular Biology Bermúdez-Morales, Víctor; National Institute of Public Health, Division of Pathogens Molecular Biology Gutiérrez-Xicotencatl, Lourdes; National Institute of Public Health, Division of Pathogens Molecular Biology Alcocer-González, Juan; Autonomous University of Nuevo León, School of Biological Sciences Recillas-Targa, Félix; Institute of Cellular Physiology, National Autonomous University of Mexico, Department of Molecular Genetics Madrid-Marina, Vicente; National Institute of Public Health, Division of Pathogens Molecular Biology
Keyword:	Basic Studies, Immunomodulators, Cytokines

powered by ScholarOne
Manuscript Central™

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

**E6 AND E7 ONCOPROTEINS FROM HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 INDUCE
ACTIVATION OF HUMAN TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA-1 PROMOTER
THROUGHOUT Sp1 RECOGNITION SEQUENCE**

Oscar Peralta-Zaragoza¹, Víctor Bermúdez-Morales¹, Lourdes Gutiérrez-Xicotencatl¹, Juan Alcocer-González², Félix Recillas-Targa³ and Vicente Madrid-Marina^{1*}

1. Division of Pathogens Molecular Biology, National Institute of Public Health, Av. Universidad 655, Cuernavaca, Morelos, México 62508.
2. School of Biological Sciences, Autonomous University of Nuevo León, Monterrey Nuevo León, México 66450.
3. Department of Molecular Genetics, Institute of Cellular Physiology, National Autonomous University of Mexico, México, D. F. 04510.

***Running title:* HPV-16 E6 AND E7-INDUCED ACTIVATION OF TGF- β 1 PROMOTER**

* To whom correspondence should be addressed:

Vicente Madrid-Marina
Division of Pathogens Molecular Biology
National Institute of Public Health
Av. Universidad 655
Cuernavaca, Morelos.
México. 62508.
Tel: (+52-777)-329-30-56
Fax: (+52-777)-317-54-85
Email: vmarina@correo.insp.mx

ABSTRACT

HPV infection is main etiologic agent of cervical cancer and HPV E6 and E7 oncogenes *trans*-regulate many cellular genes. An association between TGF- β 1 gene expression and cervical cancer development has been suggested however the mechanisms by which HPV influences TGF- β 1 expression remain unclear. In present study we analyzed the mechanism throughout HPV-16 E6 and E7 oncoproteins regulate TGF- β 1 promoter in cervical tumor cells. Our results showed that E6 and E7 increased TGF- β 1 promoter activity. Furthermore, we identified specific DNA sequence motif in TGF- β 1 core promoter responsible for *trans*-activation which corresponds to Sp1e binding site associated to HPV-16 E6 and E7 oncoproteins. Mutational analysis showed that Sp1e recognition site abolished the *trans*-activation caused by E6 and E7. These results suggest a physical interaction and functional cooperation between viral oncoproteins and cellular regulatory elements of TGF- β 1 promoter, and may explain the contribution of HPV-16 on TGF- β 1 gene expression in cervical cancer.

Keywords: Cervical cancer, HPV-16, E6, E7, TGF- β 1, *Trans*-activation, Sp1.

INTRODUCTION

Cervical cancer is the second most common form of cancer death in women worldwide. Clinical and epidemiological data associate the HPV infection with cervical cancer development (44). Anogenital cancers including those of the cervix are associated with HPV-16, -18, and -33, and HPV genomes are present in 99.7% of all cervical carcinomas (38). The HPVs are small DNA tumor viruses that replicate in differentiating epithelial cells of the epidermis and anogenital tract. The E6 and E7 viral oncogenes are expressed at low levels in proliferating basal cells, but transcription is activated as cells enter into the terminal differentiation pathway. The E6 oncoprotein alters cell differentiation (31), E7 oncoprotein reactivates cellular proliferation (4) and E6 and E7 together stimulate cell cycle progression (39). Furthermore, E6 and E7 oncogenes are retained and expressed in most cervical cancers, and sustained expression is required for the malignant phenotype (36).

An early event in HPV-associated carcinogenesis is a global perturbation of cellular gene expression by the E6 and E7 oncoproteins. The E6 oncoprotein binds to several cellular proteins including E6AP, a protein-ligase of the proteolysis ubiquitin pathway (29). The E6/E6AP complexes target the p53 tumor suppressor protein for rapid degradation by the proteasome (29). The p53 protein integrates genotoxic stress responses and DNA damage with cell cycle control and apoptosis (3). Therefore, loss of p53 leads to increased genetic instability. The E7 oncoprotein binds to pRb family members (9). Interactions occur primarily with hypophosphorylated forms of pRb, causing a release of E2F transcription factors, which in turn stimulates expression of multiple genes involved in cell cycle progression. In addition, other important interactions of E6 and E7 with cellular proteins such as AP-1 (1), c-myc (35), Epc-1 (41), p21^{waf1/cip1}, p27-kip1 (5), and TBP (17, 24) have been reported. **Thus, E6 and E7 together exert their effects of cell transformation in rodent fibroblasts and their properties of cell immortalization and cell cycle control in keratinocytes** (12, 19). Besides the oncogenic and anti-apoptotic potential of E6 and E7 oncoproteins it has also been reported that these oncoproteins can modulate transcription of viral and cellular genes (7, 20). In addition, it was reported that the HPV-16 E6 oncoprotein stimulates the TGF- β 1 promoter activity (8). However, the molecular mechanism for E6- and E7-mediated *trans*-activation of TGF- β 1 had not yet been identified.

During cervical cancer development the cellular immune response plays an important role (30) and TGF- β 1 expression has relevant functions (23). TGF- β 1 belongs to a multifunctional protein family which is an important regulator of gene expression during embryogenesis, differentiation, development, and wound healing. Human keratinocytes express the three TGF- β isoforms (TGF- β 1, 2 and 3) which share a high level of homology and use the same receptor complexes for signaling to exert a seemingly redundant set of functions *in vivo* (18). In addition, TGF- β 1 prevents the cellular immune response by inhibition of T-cell proliferation and differentiation into cytotoxic T-cells (CTLs) and helper T-lymphocytes by inhibition of stimulatory functions

1
2 induced by antigen-presenting cells (15). Due to the fact that CTLs and Th1 cytokine production are important
3 for effective immune-mediated tumor eradication, suppression of these functions by TGF- β 1 could be an
4 important mechanism for inhibiting the immune response. Therefore, we believe that TGF- β 1 presence in tumor
5 cells can have a relevant role in the suppression of anti-tumor immune responses.
6
7
8
9

10 Although has been shown that deletion of the TGF- β 1 gene or some signaling pathway components may
11 play a role in the progression of carcinogenesis (232), the TGF- β 1 gene regulation mechanisms represent a
12 relevant aspect in the tumor evolution process. Thus, to understand the molecular mechanism of TGF- β 1 gene
13 expression mediated by HPV-16 E6 and E7 and test its potential *trans*-activation abilities, we investigated the
14 effects of the HPV-16 E6 and E7 oncoproteins on the promoter activity of the human TGF- β 1 gene in cervical
15 tumor cell lines. We found that E6 and E7 *trans*-activate the TGF- β 1 promoter. This effect is the result of HPV-
16 16 E6 and E7 action over one specific Sp1 binding site (Sp1e) located in position -108 to -102 into the TGF- β 1
17 core promoter. Thus, our results propose a novel molecular pathway by which HPV-16 E6 and E7 oncoproteins
18 stimulate TGF- β 1 promoter activity. This finding suggests a possible strategy by which HPV-16 regulates TGF-
19 β 1 gene expression during cervical cancer development, which may allow the evasion of the host immune
20 response.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MATERIALS AND METHODS

CELL LINES AND CULTURE CONDITIONS

Human HPV-negative transformed tumor cervical cells (C33A) and HPV-positive (HeLa, CaSKi and SiHa) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The cell lines were cultured in DMEM medium (Invitrogen, Carlsbad, CA.), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and maintained at 37°C in 5% CO₂. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from healthy donors separated by Ficoll-hypaque gradient centrifugation and cultured in RPMI-1640 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA.) containing 10% FBS. The soluble TGF-β1 production was measured in the cell lines medium by the ELISA kit (RD System, Minneapolis, MN.) and normalized by cell number (1x10⁶ cells/ml). Protein concentration was determined by the BCA protein kit (Pierce, Rockford, IL.).

RT-PCR ANALYSIS

Cells were harvested and processed for RNA isolation using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA.). The mRNA was obtained using primer dT, and cDNA synthesis was performed by incubation with M-MLV RT (Invitrogen, Carlsbad, CA.) at 37°C for 1 h. The TGF-β1 gene expression was measured by semi-quantitative RT-PCR using the sense 5'- G C C C T G G A C A C C A A C T A T T G C T -3' and antisense 5'- A G G C T C C A A A T G T A G G G G C A G G -3' primers. PCR amplification program set as follows: 94°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min for 27 cycles followed by 72°C for 5 min. A 160 bp DNA fragment was obtained. The β-actin was used as control using the sense 5'- G T G G G G C G C C C C A G G C A C C A -3' and antisense 5'- C T C C T T A A T G T C A C G C A C G A T T T C -3' primers. PCR amplification program set as follows: 94°C by 1 min, 58°C by 1 min and 72°C by 1 min for 25 cycles followed by 72°C for 5 min. A 540 bp DNA fragment was obtained. For each PCR-amplification, 1 μg cDNA, 2.5 mM dNTPs, 30 pmol primers and 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA.) were used in a 50 μl reaction. To ensure that amplification remained within the linear range, 1:5 serial dilutions of cDNA were made.

CLONING STRATEGY AND PLASMID CONSTRUCTS

The human TGF-β1 gene regulatory region was obtained by PCR-amplification from PBMC genomic DNA using the sense 5'- T T T G G A T C C T T A G C A G G G G A G T A A C A T -3' and antisense 5'- T T T G G A T C C G G C A A C G G A A A A G T C T C A A A -3' primers. A 2181 bp DNA fragment was obtained and sequenced, and the nucleotidic sequence was identical to that reported previously (14) (GenBankTM/EMBL data Bank with accession number: J04431). The amplified DNA fragment was digested with *Pst* I to obtain a 1903 bp DNA fragment which contained 1132 bp upstream and 771 bp downstream in relation to the transcription start site. This DNA fragment was cloned into pBLCAT3 reporter vector and different plasmid constructs were generated by progressive deletion of the TGF-β1 promoter (**Fig. 1A**). Construct pTGF1 (-1132 to +771) was generated by

1
2 cloning of the 1903 bp DNA fragment into the *Pst I* site. Construct pTGF2 included a 1089 bp DNA insert (-318
3 to +771) cloned into the *Bst EII-Pst I* sites. Construct pTGF3 contained an 813 bp DNA fragment (+42 to +771)
4 and was generated by cloning into the *Eag I-Pst I* sites and do not contains the TGF- β 1 core promoter. Construct
5 pTGF4 was produced by cloning a 1543 bp DNA fragment (-1132 to -318, and +11 to +771) into the *Pst I-Bst*
6 *EII* and *Eag I-Pst I* sites without the TGF- β 1 core promoter. Construct pTGF5 contained the TGF- β 1 core
7 promoter alone (-650 to +36) cloned into the *Apa I* site. Construct pTGF6 contained two copies of the TGF- β 1
8 core promoter (-650 to +36). Construct pTGF7 included two copies of the inverted TGF- β 1 core promoter (+36
9 to -650). In addition, we generated several plasmid constructs with the TGF- β 1 core promoter with mutated *Sp1*
10 binding sites generated by PCR (pSp1-wt, pSp1a-mt, pSp1b-mt, pSp1c-mt, pSp1d-mt and pSp1e-mt) (**Fig. 1B**).
11 The integrity of all mutant constructs was verified by restriction pattern and DNA sequencing.
12
13
14
15
16
17
18
19

20 21 **DNA TRANSFECTION AND CAT ASSAYS**

22 C33A cells were transiently transfected with TGF- β 1 promoter constructs using Lipofectamine reagent
23 (Invitrogen, Carlsbad, CA.). All transfection experiments were performed with 20 μ g of total DNA. Cells were
24 incubated with Lipofectamine for 4 h, rinsed and replenished with DMEM containing 10% FBS. Forty eight
25 hours after transfection, cells were harvested and nuclear extracts were prepared in 100 μ l of Tris-HCl buffer.
26 The co-transfection assays were performed with pSV2E6 and pSV2E7 expression plasmids, which contain the
27 open reading frames of HPV-16 E6 and E7 oncogenes and were kindly provided by Dr. K. Yoshiike (National
28 Institute of Health, Tokyo, Japan) (13). The β -galactosidase activity was not affected by HPV-16 E6 and E7
29 oncogenes expression in C33A cells (data not shown). Therefore, the chloramphenicol acetyltransferase (CAT)
30 activity in all assays was normalized by the β -galactosidase reporter gene. The CAT activity was measured
31 according to the method of Nordeen (21) and the mean percentage of acetylation was calculated and presented as
32 relative CAT activity. All transfections and co-transfections were repeated four independent times.
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 **DNase I FOOTPRINTING ASSAYS**

43 Nuclear extracts from C33A cells (1×10^7 cells) were prepared according to the method of Dignam (10).
44 Briefly, 1×10^7 cells were resuspended in 2 ml of buffer A (20 mM HEPES pH 8.0, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1.5
45 mM $MgCl_2$, 0.5 mM PMSF, 0.25 mM EDTA and 0.25 mM EGTA) and lysed with a glass homogenizer pestle with
46 20 strokes. The nuclei were centrifuged at 2,000 rpm for 10 min and resuspended in 2 ml of buffer C (20 mM
47 HEPES pH 8.0, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM DTT, 0.25 mM PMSF, 0.25 mM EDTA, 0.25 mM EGTA, 420 mM NaCl
48 and 50% glycerol) and homogenized as above. The suspension was centrifuged at 12,000 rpm for 2 min and the
49 supernatant stored at $-70^\circ C$. Protein concentration was determined by the BCA protein kit (Pierce, Rockford,
50 IL.). Footprinting assay was performed as previously described [29, 30] and the DNA probe used corresponded
51 to the TGF- β 1 core promoter (-650 to +36). This DNA fragment was cloned in the pGEM11Z plasmid
52 (Promega, Madison, WI.) and digested with *Bam HI* and *Hind III*. Probe was incubated with the DNA
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2 polymerase I Klenow fragment and 30 μCi of [α - ^{32}P]-dGTP. The A+G and G sequences were determined with the
3 Maxam and Gilbert sequencing method using DMS and piperidine (Sigma). Samples were treated with DMS stop
4 buffer (1.5 mM sodium acetate pH 7.0, 1 M β -mercaptoethanol, and 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ glycogen) and precipitated with
5 ethanol at -70°C . DNA pellets were washed, resuspended in 200 μl of 1 M piperidine and heated at 90°C for 30 min.
6
7 Samples were then lyophilized three-times and resuspended in 10 μl of Dye buffer (0.1% bromophenol blue, 80%
8 formamide and 1X TBE). We performed the DNA-protein binding and DNase I digestion in the presence of
9 increasing concentrations of nuclear extracts from C33A cells alone and transfected with HPV-16 E6 and E7
10 oncogene cDNA in binding buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 25 mM CaCl_2 , 2% BSA, 25 mM KCl, 0.25 mM EDTA,
11 4 mM EGTA and 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ poly dI-dC) and digested with 0.015 U DNase I (Whorstrington). After 2 min of digestion
12 at room temperature the samples were treated with DNase stop solution (50 mM EDTA pH 8.0, 0.2% SDS, 100
13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ glycogen, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinase K). Samples were extracted three-times with phenol-chloroform-isoamlic
14 (1:1:24), precipitated with ethanol at -70°C and resuspended in 10 μl of Dye buffer. Samples were electrophoresed
15 for 4 h at 1800 V in 6% polyacrylamide-6 M urea sequencing gel. The gel was dried and subjected to
16 autoradiography at -70°C with an intensifier screen. The footprints were compared with A+G and G ladders
17 produced by the chemical cleavage sequencing reaction of the same probe to determine the corresponding nucleotide
18 sequences.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30 **ELECTROPHORESIS MOBILITY SHIFTING ASSAY (EMSA)**

31
32 Nuclear extracts were prepared from C33A cells alone or transfected with pSV2E6 and pSV2E7 vectors as
33 described above. EMSA was performed as reported previously (10). An oligonucleotide containing the Sp1e binding
34 site was end-radiolabeled with T4 DNA polynucleotide kinase using 30 μCi of [γ - ^{32}P]-dATP, and purified from 1%
35 agarose gel. Nuclear extracts (5 μg) were incubated for 20 min at room temperature with the radiolabeled
36 oligonucleotide ($1\text{-}2 \times 10^5$ cpm) in banding buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM
37 EDTA, 5% glycerol and 1 μg poly dI-dC). DNA-protein complexes were resolved in low-isotonic strength on non-
38 denaturing 6% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) containing 0.5X TBE. Samples were electrophoresed for
39 3 h at 200 and gel was dried and subjected to autoradiography at -70°C with an intensifier screen. For competition
40 experiments, 100-fold molar excess of AP-1 and Sp1 unlabeled probes were added 20 min before incorporating the
41 labeled probe. For immune band shift assays, DNA-protein complexes were allowed to form prior to the addition of
42 5 μg of anti-E6 or anti-E7 polyclonal IgG antibodies or anti-IL-6 as an irrelevant IgG antibody (Santa Cruz,
43 Biotechnology, Santa Cruz, CA). Samples were incubated with the antibodies for 4 h at 4°C before resolving the
44 DNA-protein complexes on 6% PAGE.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

HUMAN TGF- β 1 EXPRESSION IN HPV-TRANSFORMED CELLS

Initial studies indicated that TGF- β 1 suppresses the activation and proliferation of T lymphocytes and is probably involved in immune-evasion of cancer (32, 34). Such evidences support a tight association between the disruption of TGF- β 1 expression and the development of gynecological malignancies (2, 40). To address the pattern of TGF- β 1 expression in cervical cancer cells, we first analyzed the TGF- β 1 mRNA levels in human tumor cervical cell lines (HeLa, CaSKi, SiHa and C33A) by semi-quantitative RT-PCR (**Fig. 2A**). **Consistent with previous observations from other researcher groups (40), there is an increased expression of the TGF- β 1 mRNA upon HPV-transformed cells compared to HPV-negative transformed C33A cells. In addition, TGF- β 1 mRNA expression was observed in all cell lines and the densitometry analysis we found that mRNA percentage was increased at least two-fold (28% vs. 78%) in HPV-transformed cells compared to HPV-negative cells (Fig. 2B, C33A cells vs. CaSKi cells).** In an attempt to correlate TGF- β 1 mRNA expression levels with protein synthesis, we determined the TGF- β 1 protein expression in all cell lines. The data were normalized by protein concentration (50 μ g) and cell number (1×10^6 cells) (**Fig. 2C**). The results showed that TGF- β 1 protein synthesis increased over 1000 pg/ml on HPV-transformed cells, while in HPV non-transformed cells it was less than 600 pg/ml, and this was in agreement with the TGF- β 1 mRNA expression levels. This result suggests that HPV-transformed cells are specifically able to mediate TGF- β 1 transcriptional activation in response to HPV oncoproteins expression.

REGULATION OF HUMAN TGF- β 1 PROMOTER ACTIVITY BY HPV-16 E6 AND E7 ONCOGENE PRODUCTS

In order to understand the mechanism of TGF- β 1 gene regulation by HPV-16 E6 and E7 oncoproteins, we analyzed the effect of these oncoproteins over TGF- β 1 promoter activity by using a CAT reporter gene. For this purpose, the human TGF- β 1 regulatory region was amplified by PCR and several plasmid constructs containing different fragments of the promoter were generated (**Fig. 1A**). C33A cells were transfected with the constructs that contain the TGF- β 1 regulatory region alone and co-transfected with either pSV2E6 or pSV2E7 expression plasmids (**Fig. 3A**). The construct containing the TGF- β 1 promoter (pTGF1) was used as the reference activity. The result shows that when the 5'-distal end sequence was eliminated from the TGF- β 1 promoter the reporter activity diminished up to 25% (pTGF2). Promoter activity decreased up to 5% when the TGF- β 1 core promoter that includes the first transcriptional start site (+1) was deleted (pTGF3 and pTGF4). The activity was partially recovered in the presence of TGF- β 1 core promoter (pTGF5) and was restored up to 75%

1
2 when the core promoter was present in duplicate (pTGF6). TGF- β 1 core promoter activity was abolished when
3 the core promoter was tested in opposite orientation (pTGF7). To evaluate the specific role of the E6 oncoprotein
4 over TGF- β 1 promoter *trans*-activation, C33A cells were co-transfected with the E6 oncogene cDNA. **The**
5 **results showed a 45% and 62% of increase in the reporter gene expression using the TGF- β 1 core**
6 **promoter (pTGF2 and pTGF5, respectively) in E6 expressing cells compared to the non-transfected cells.**
7 The E6-mediated effect was even higher in the cells that contain the TGF- β 1 core promoter in two tandem
8 copies, reaching the highest *trans*-activation levels (pTGF6). In parallel, a set of C33A cells were co-transfected
9 with the E7 oncogene cDNA and showed similar effects as did the one seen in E6 transfected cells. The E7
10 oncoprotein induced the transcription activity only over the TGF- β 1 core promoter (pTGF2, pTGF5 and
11 pTGF6). We did not observe significant differences when E6 and E7 oncogenes were transfected together (data
12 not shown). The empty pBLACT3 vector not induced promoter activity. To confirm the specific effect of E6 and
13 E7 oncoproteins over induction of TGF- β 1 promoter activity, we analyzed the E6 and E7 mRNA expression by
14 Northern blot in the transfected C33A cells. As demonstrated, the transiently transfected C33A cell efficiently
15 expressed the E6 and E7 mRNA (**Fig. 3B**). The different mRNA species of E6 and E7 oncogenes observed in
16 CaSKi cells correspond to splicing products of the viral oncogenes. Our results showed that the TGF- β 1
17 promoter activation by HPV-16 E6 and E7 is modest but could be physiologically relevant. Moreover, the TGF-
18 β 1 promoter *trans*-activation is slightly elevated in E7 compared to E6 expression cells, which could suggest a
19 differential interaction with transcription factors into the TGF- β 1 core promoter. These results support the notion
20 that HPV-16 E6 and E7 oncoproteins involved in cell transformation and immortalization are also able to *trans*-
21 activate the human TGF- β 1 gene expression.

22 **IDENTIFICATION OF REGULATORY ELEMENTS IN TGF- β 1 PROMOTER RESPONSIBLE FOR** 23 **TRANS-ACTIVATION BY HPV-16 E6 AND E7**

24
25 The TGF- β 1 core promoter sequence (-650 to +36) contains a cluster of five DNA binding motifs 100%
26 homologous to Sp1 recognition sites (Sp1a, Sp1b, Sp1c, Sp1d and Sp1e) (**Fig. 4**). In an effort to identify the
27 target sequences responsible for TGF- β 1 promoter *trans*-activation by HPV-16 E6 and E7 oncoproteins, we
28 examined the pattern of DNA-protein interaction at the TGF- β 1 core promoter (**Fig. 5**). Footprinting *in vitro*
29 assays revealed that incubation of the TGF- β 1 core promoter with nuclear extracts from C33A cells alone
30 resulted in several partially protected areas in this DNA fragment. When we analyzed the precise position of
31 these protected sequences we identified Sp1 recognition sites (**Fig. 5A**). **However, when C33A cells were co-**
32 **transfected with E6 or E7 oncogene cDNA we identified a similar protection pattern at Sp1 binding sites.**
33 **While, transfection with E6 oncogene produced a protection pattern mainly over the Sp1c to Sp1e binding**
34 **sites, we observed that E7 oncogene induced a large protected area over Sp1 binding sites (Fig. 5B and 5C,**
35 **from Sp1a to Sp1e). This protected regulatory elements by the HPV-16 E6 and E7 oncoproteins in the**

1
2 **TGF- β 1 core promoter suggests that these oncoproteins may induce varied interactions in C33A cells and**
3 **may favor the recruitment of co-activators and/or transcription factors (7, 17).** These results suggest that
4 HPV-16 E6 and E7 oncoproteins expression may induce the formation of novel molecular transcription
5 complexes throughout Sp1 recognition sites in tumor cells during cervical cancer development.
6
7
8

9 10 **A SPECIFIC Sp1 RECOGNITION SEQUENCE IS CRITICAL FOR *TRANS*-ACTIVATION OF TGF- β 1** 11 **PROMOTER BY HPV-16 E6 AND E7** 12 13

14
15 As demonstrated, the five Sp1 recognition sequences in the TGF- β 1 core promoter have the ability to
16 interact in a differential way with HPV-16 E6 and E7 oncoproteins. To determine the contribution of each Sp1
17 binding site, we functionally evaluated each Sp1 recognition site independently by mutational analysis. Several
18 plasmid constructs of the TGF- β 1 core promoter (-650 to +36) with mutated Sp1 sequences were generated (**Fig.**
19 **1B**). C33A cells were transfected with these constructs and co-transfected with pVS2E6 or pVS2E7 expression
20 plasmids to identify the specific Sp1 recognition site responsible for *trans*-activation of HPV-16 oncoproteins
21 over the TGF- β 1 core promoter. The data showed that the mutated Sp1e sequence did not further increase TGF-
22 β 1 promoter activity in the presence of E6 or E7 oncoproteins, as compared to the Sp1 wild-type. In contrast, the
23 remaining mutated Sp1 sites did not significantly contribute to *trans*-activation activity. The empty pBLCAT3
24 vector not induced promoter activity (**Fig. 6**). These results suggest that the Sp1e binding site localized between
25 -108 and -102 bp upstream of the transcriptional start site in the TGF- β 1 core promoter is particularly important
26 for the *trans*-activation mechanism mediated by HPV-16 E6 and E7 oncoproteins. Thus, a possible process by
27 which the HPV-16 E6 and E7 oncoproteins could participate in the mechanism of *trans*-activation of TGF- β 1
28 promoter could be through interaction with the Sp1e binding site, or by indirect interaction with Sp1e-associated
29 co-activators.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 **HPV-16 E6 AND E7 ONCOPROTEINS BIND TO Sp1e REGULATORY ELEMENT IN TGF- β 1** 43 **PROMOTER *IN VITRO*** 44 45

46
47 To confirm the effects of HPV-16 E6 and E7 oncoproteins in the *trans*-activation of the TGF- β 1
48 promoter and the importance of the interaction with the Sp1 recognition site, we further characterized the Sp1e
49 binding site of TGF- β 1 core promoter. For this purpose, we designed a synthetic DNA probe that contains the
50 Sp1e sequence to determine the ability of E6 and E7 oncoproteins to interact with this Sp1e binding site in an
51 EMSA assay (**Fig. 7A**). We not observed a retarded DNA-protein complex when the Sp1e probe was incubated
52 with nuclear extracts from non-transfected C33A cells (**Fig. 7B**, lane 2). However, when nuclear extracts were
53 prepared from C33A cells previously transfected with E6 or E7 oncogenes a clearly retarded DNA-protein
54 complex was obtained (**Fig. 7B**, lanes 3 to 8). To define the specificity of binding, we performed the competition
55
56
57
58
59
60

1
2 with an unlabeled Sp1e probe and using AP-1 as an unrelated competitor. The results showed that the retarded
3 complex was not competed against by the AP-1 probe (**Fig. 7B**, lanes 4 and 7), while the complex was
4 efficiently self-competed with the unlabeled Sp1e probe (**Fig. 7B**, lanes 9 and 10). Furthermore, this retarded
5 DNA-protein complex was super-shifted when anti-E6 or anti-E7 polyclonal antibodies were incorporated (**Fig.**
6 **7B**, lanes 11 and 12). An irrelevant antibody (anti-IL6) failed to generate a super-shift complex (**Fig. 7B**, lanes 5
7 and 8). Thus, our DNA-protein interaction results indicate an association of E6 and E7 oncoproteins with the
8 Sp1e binding site on the TGF- β 1 core promoter, which may be in part responsible for TGF- β 1 *trans*-activation,
9 although further investigation is needed to determine if this is a direct or indirect interaction. Thus, the evidences
10 of the functional activity, the interaction with the Sp1e specific sequence and the formation of specific DNA-
11 protein complex taken together suggests an influence of HPV-16 E6 and E7 oncoproteins over the human TGF-
12 β 1 promoter.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

DISCUSSION

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

In cervical cancer development a cascade of abnormal events are induced, which include the disruptions of cellular cycle control, perturbation of anti-tumor immune response and alteration of gene expression. In all these processes a common element implicated is the TGF- β 1 gene expression alteration. Several reports have addressed the mechanisms of TGF- β 1 gene expression, its biological effects on cellular proliferation, differentiation, and function in the context of anti-tumor immune response (14, 23, 37). In contrast, our knowledge concerning TGF- β 1 regulation mechanisms during cervical cancer progression remains limited. TGF- β 1 gene expression is normally constitutive however, during the tumor progression there is an up-regulation of TGF- β 1 gene expression, which induces a favorable condition for tumor development (37). The recent characterization of HPV-16 E6 and E7 oncoproteins has shown *trans*-activation effects over distinct cellular genes (20). In addition, the demonstration that Sp1 binding sites belong to the TGF- β 1 signal transduction pathway (11, 16), lead us to raise the hypothesis of the involvement of these molecules in TGF- β 1 gene expression regulation in cervical cancer. Therefore, in this study we demonstrated the effect of HPV-16 E6 and E7 oncoproteins on TGF- β 1 promoter activity in human cervical tumor cells throughout a specific Sp1 recognition site.

In our study we demonstrated that the levels of TGF- β 1 mRNA and protein expression in cervical cancer **HPV-transformed cells** were elevated in comparison to **HPV-negative transformed cells (Fig. 2)** and to prove that mRNA and protein of HPV-16 E6 and E7 are expressed in the HPV-negative transfected cells with E6 and E7 oncogenes, a Northern blot (**Fig. 3B**) and a band shifting assays (**Fig. 7B**) were carried out. These data are consistent with other reports in which changes in TGF- β 1 gene expression or some signal transduction pathway components could represent a risk factor in cervical cancer development (37). Our findings support the possibility that one of the events that occurs during cervical cancer progression consists of inducing the TGF- β 1 gene expression in **HPV-transformed tumor cervical cells**. This situation may favor the cell tumor progression, since previous studies have demonstrated that TGF- β 1 over-expression may generate an immune-suppression state in the tumor micro-environment (34). According to these evidences, the presence of TGF- β 1 could inactivate anti-tumor immune response by its action over tumor infiltrate T lymphocytes (15). This condition may be interpreted as a self-tumor mechanism to evade immune surveillance and enhance cervical cancer progression (23). In addition, there are several reports concerning the role of some HPV proteins in the regulation of molecules involved in cellular immune response against the tumor (22, 42).

Sp1 transcription factor belongs to a protein family that contains a DNA binding zinc finger domain, two serine/threonine-rich domains and two glycine-rich domains. These domains are involved in oligomerization and recruitment of co-activators like Smads family members that participate in the TGF- β 1 signal transduction

1 pathway (33). The Sp1 transcription factor interacts constitutively with the TGF- β 1 core promoter to generate a
2 basal level of transcription, independent of external stimuli (16). We observed an effect over TGF- β 1 promoter
3 activity by HPV-16 E6 and E7 oncoproteins that could be explained by the potential interaction of these viral
4 oncoproteins with the Sp1 transcription factor through its oligomerization domains leading to formation of new
5 E6-Sp1 and E7-Sp1 putative heterodimer complexes. These hypothetical complexes could associate with the Sp1
6 recognition sequences and cooperate with other adjacent transcription factors, enhancing the stability of
7 transcriptional machinery or alternatively recruiting co-activators that would increase TGF- β 1 promoter activity.
8 We showed that the Sp1e DNA sequence of the TGF- β 1 core promoter functionally cooperates with HPV-16 E6
9 and E7 oncoproteins. This scenario is supported by the fact that the mutant Sp1e binding site in the TGF- β 1 core
10 promoter was not able to influence transcription levels in response to E6 and E7 oncogene expression (**Fig. 6**).
11 Therefore, it is possible that E6-Sp1 and E7-Sp1 putative interactions may represent an important event in
12 understanding the TGF- β 1 regulation mechanism in response to HPV-16 infection. Thus, the mechanism that we
13 propose here identifies at the Sp1e binding site of the TGF- β 1 core promoter as a new partner of HPV-16 E6 and
14 E7 oncoproteins and suggests a novel function for this DNA binding motif. However, further *in vitro* and *in vivo*
15 experiments are needed to confirm the stable formation of E6-Sp1 and E7-Sp1 complexes.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29 Interestingly, DNA-protein interaction experiments showed the presence of different patterns of DNA
30 binding to the Sp1 recognition sites using nuclear extracts from C33A cells transfected with HPV-16 E6 and E7
31 oncogenes. This effect could be the result of the capacity of co-activators to associate with E6 or E7. It has been
32 reported that CBP/p300 protein, a histone acetyltransferase, interacts directly with C-terminal domain of Smad 2
33 and Smad 3 and serves as co-activator of TGF- β 1 transcription activation mediated by Smad (25). In addition, it
34 has been demonstrated that the HPV-16 E6 oncoprotein targets CBP/p300, involving the C-terminal DNA
35 binding zinc finger domain of E6 and CBP/p300 residues 1808 to 1826 (43). This evidence suggests that TGF-
36 β 1 gene *trans*-activation by HPV-16 E6 and E7 oncoproteins may involve the association of Sp1, and possibly
37 Smads transcription factors through the incorporation and action of the CBP/p300 co-activator. However, further
38 investigations are needed to confirm and decipher the involvement of CBP/p300 in E6-Sp1 and E7-Sp1
39 formation complexes.
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 In conclusion, the findings reported here have the following implications: i) Part of the TGF- β 1
50 regulation mechanism on cervical cancer cells involves a *trans*-activation of the TGF- β 1 promoter throughout
51 HPV-16 E6 and E7 oncoproteins, ii) we have shown that *trans*-activation is induced by HPV-16 E6 and E7
52 oncoproteins throughout the specific Sp1e DNA-binding site in the human TGF- β 1 core promoter, iii) we
53 hypothesize that TGF- β 1 up-regulation through HPV-16 E6 and E7 oncoproteins may be a mechanism that
54 evolved in tumor cells to evade immune system responses. Our findings of the *trans*-activation mechanism of the
55 TGF- β 1 promoter induced by HPV-16 oncoproteins do not exclude the disruption of the signaling pathway
56
57
58
59
60

1
2 attributed to cervical cancer or other widely reported cancer types (23, 37). In addition to TGF- β 1 *trans*-
3 activation mechanism another regulation process could be involved like the recruitment of remodeling chromatin
4 complexes. Finally, the relevance of our findings is based on the fact that the TGF- β 1 gene expression
5 mechanism, TGF- β 1 signaling pathway, activation of other intracellular signaling cascades and cross-talk with
6 other signaling pathways are important factors in understanding the role of TGF- β 1 in the carcinogenesis
7 process.
8
9
10
11
12
13
14
15
16

17 ACKNOWLEDGEMENTS

18
19
20 This work was supported by a grant from the National Council of Science and Technology (Consejo
21 Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)) of Mexico, No. 1018-M9111. O. Peralta-Zaragoza was recipient
22 of a Doctoral fellowship number 117983 from CONACYT, México.
23
24
25

26 We thank to Dr: Joaquín Sánchez-Castillo for critically reviewing the manuscript, to G. Guerrero-Avedaño
27 from F. Recillas-Targa laboratory for technical assistance and to Claudia Gómez-Cerón for secretariat assistance.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

1. Antinore M. J., M. J. Birrer, D. Patel, L. Nader, D. J. McCance. 1996. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J.* 15:1950-960.
2. Chen T., E. G. De Vries, H. Hollema, H. A. Yegen, V. F. Vellucci, H. D. Strickler, A. Hildesheim, M. Reiss. 1999. Structural alterations of transforming growth factor-beta receptor genes in human cervical carcinoma. *Int. J. Cancer.* 82:43-51.
3. Chen X., L. J. Ko, L. Jayaraman, C. Prives. 1996. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev.* 10:2438-51.
4. Cheng S., D. C. Schmidt-Grimminger, T. Murant, T. R. Broker, L. T. Chow. 1995. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev.* 9:2335-2349.
5. Cho N. H., Y. T. Kim, J. W. Kim. 2002. Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors. *Yonsei Med. J.* 43:722-728.
6. Chu T. Y., J. S. Lai, C. Y. Shen, H. S. Liu, C. F. Chao. 1999. Frequent aberration of the transforming growth factor-beta receptor II gene in cell lines but no apparent mutation in pre-invasive and invasive carcinomas of the uterine cervix. *Int. J. Cancer.* 80:506-510.
7. Desaintes C., S. Hallez, P. Van Alphen, A. Burny. 1992. Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 66:325-333.
8. Dey A., I. A. Atcha, S. Bagchi. 1997. HPV16 E6 oncoprotein stimulates the transforming growth factor-beta 1 promoter in fibroblasts through a specific GC-rich sequence. *Virology.* 228:190-199.
9. Dick F. A., N. J. Dyson. 2002. Three regions of the pRb pocket domain affect its inactivation by human papillomavirus E7 proteins. *J. Virol.* 76:6224-6234.
10. Dignam J. D., R. M. Lebovitz, R. G. Roeder. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* 11:1475-1489.

- 1
2 11. Feng X. H., X. Lin, R. Derynck. 2000. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15 (Ink4B)
3 transcription in response to TGF-beta. EMBO. J. 19:5178-5193.
4
- 5
6 12. Halbert C. L., G. W. Demers, D. A. Galloway. 1992. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6
7 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. J. Virol. 66:2125-2134.
8
9
- 10
11 13. Kanda T., A. Furuno, K. Yoshiike. 1988. Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a
12 transforming gene for rat 3Y1 cells. J. Virol. 62:610-613.
13
14
- 15
16 14. Kim S. J., A. Glick, M. B. Sporn, A. B. Roberts. 1989. Characterization of the promoter region of the human
17 transforming growth factor-beta 1 gene. J. Biol. Chem. 264:402-408.
18
19
- 20
21 15. Letterio J. J., A. B. Roberts. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. Annu. Rev. Immunol.
22 16:137-161.
23
24
- 25
26 16. Li J. M., M. B. Datto, X. Shen, P. P. Hu, Y. Yu, X. F. Wang. 1998. Sp1, but not Sp3, functions to mediate
27 promoter activation by TGF-beta through canonical Sp1 binding sites. Nucleic Acids Res. 26:2449-2456.
28
29
- 30
31 17. Maldonado E., M. E. Cabrejos, L. Banks, J. E. Allende. 2002. Human papillomavirus-16 E7 protein inhibits
32 the DNA interaction of the TATA binding transcription factor. J. Cell. Biochem. 85:663-669.
33
34
- 35
36 18. Massague J. 1998. TGF-beta signal transduction. Annu. Rev. Biochem. 67:753-791.
37
38
- 39
40 19. Munger K., P. M. Howley. 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions.
41 Virus Res. 89:213-228.
42
43
- 44
45 20. Nees M., J. M. Geoghegan, T. Hyman, S. Frank, L. Miller, C. D. Woodworth. 2001. Papillomavirus type 16
46 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and
47 NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. J. Virol. 75:4283-4296.
48
49
- 50
51 21. Nordeen S. K., P.P. Green. 3rd, D. M. Fowlkes. 1987. A rapid, sensitive, and inexpensive assay for
52 chloramphenicol acetyltransferase. DNA. 6:173-178.
53
54
- 55
56 22. O'Brien PM, M. Saveria Campo. 2002. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded
57 proteins. Virus Res. 88:103-117.
58
59
60

- 1
2 23. Pasche B. 2001. Role of transforming growth factor beta in cancer. *J. Cell. Physiol.* 186:13-168.
3
4
5 24. Phillips A. C., K. H. Vousden. 1997. Analysis of the interaction between human papillomavirus type 16 E7
6 and the TATA-binding protein, TBP. *J. Gen. Virol.* 78:905-909.
7
8
9
10 25. Pouponnot C., L. Jayaraman, J. Massague. 1998. Physical and functional interaction of SMADs and
11 p300/CBP. *J. Biol. Chem.* 273:22865-22868.
12
13
14
15 26. Recillas-Targa F., C. V. de Maura Gallo, M. Huesca, K. Scherrer, L. Marcaud. 1993. Silencer and enhancer
16 elements located at the 3'-side of the chicken and duck α -globin-encoding gene domains. *Gene.* 129:229-237.
17
18
19
20 27. Sambrook J., E. F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. Chemical sequencing. 13.78-13.104. Cold Spring Harbor
21 Laboratory Press. *Molecular cloning a laboratory manual.* 2nd. Edn.
22
23
24
25 28. Santin A. D., P. L. Hermonat, J. C. Hiserodt, J. Fruehauf, V. Schranz, D. Barclay, S. Pecorelli, G. P. Parham.
26 1997. Differential transforming growth factor-beta secretion in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of
27 the uterine cervix. *Gynecol. Oncol.* 64:477-480.
28
29
30
31 29. Scheffner M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, P. M. Howley. 1990. The E6 oncoprotein
32 encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 63:1129-1136.
33
34
35
36 30. Scott M., M. Nakagawa, A. B. Moscicki. 2001. Cell-mediated immune response to human papillomavirus
37 infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8:209-220.
38
39
40
41 31. Sherman L., R. Schlegel. 1996. Serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes is
42 inhibited by the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 70:3269-3279.
43
44
45
46 32. Stoeck M., S. Miescher, H. R. MacDonald, V. Von Fliedner. 1989. Transforming growth factors beta slow
47 down cell-cycle progression in a murine interleukin-2 dependent T-cell line. *J. Cell. Physiol.* 141:65-73.
48
49
50
51 33. Stopa M., D. Anhof, L. Terstegen, P. Gatsios, A. M. Gressner, S. Dooley. 2000. Participation of Smad2,
52 Smad3, and Smad4 in transforming growth factor beta (TGF-beta)-induced activation of Smad7. The TGF-beta
53 response element of the promoter requires functional Smad binding element and E-box sequences for
54 transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 275:29308-29317.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
34. Torre-Amione G., R. D. Beauchamp, H. Koeppen, B. H. Park, H. Schreiber, H. L. Moses, D. A. Rowley. 1990. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:1486-1490.
35. Veldman T., X. Liu, H. Yuan, R. Schlegel. 2003. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:8211-8216.
36. Von Knebel Doeberitz M., C. Rittmuller, H. zur Hausen. 1992. Durst M. Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA. *Int. J. Cancer.* 51:831-834.
37. Wakefield L. M., A. B. Roberts. 2002. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:22-29.
38. Walboomers J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer, N. Munoz. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189:12-19.
39. Woodworth C. D., S. Cheng, S. Simpson, L. Hamacher, L. T. Chow, T. R. Broker, J. A. DiPaolo. 1992. Recombinant retroviruses encoding human papillomavirus type 18 E6 and E7 genes stimulate proliferation and delay differentiation of human keratinocytes early after infection. *Oncogene.*; 7:619-626.
40. Woodworth C. D., J. Chung, E. McMullin, G. D. Plowman, S. Simpson, M. Iglesias. 1996. Transforming growth factor beta-1 support autonomous growth of human papillomavirus-immortalized cervical keratinocytes under conditions promoting squamous differentiation. *Cell Growth Differ.* 7:811-820.
41. Yukawa K., K. Butz, T. Yasui, H. Kikutani, F. Hoppe-Seyler. 1996. Regulation of human papillomavirus transcription by the differentiation-dependent epithelial factor Epc-1/skn-1a. *J. Virol.* 70:10-16.
42. Zhang B., P. Li, E. Wang, Z. Brahmi, K. W. Dunn, J. S. Blum, A. Roman. 2003. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology.* 310:100-108.
43. Zimmermann H., R. Degenkolbe, H. U. Bernard, M. J. O'Connor. 1999. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional co-activator CBP/p300. *J. Virol.* 73:6209-6219.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

44. Zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat. Rev. Cancer. 2:342-350.

For Peer Review

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. TGF- β 1 PROMOTER PLASMID CONSTRUCTS. **A.** TGF- β 1 promoter region and the four transcription start sites are shown (+1, +271, +470 and +525). Five Sp1 binding sites are located in the TGF- β 1 core promoter. Different plasmid constructs (pTGF1 to pTGF7) were generated in the pBLCAT3 expression vector by deletion of different sites of the TGF- β 1 promoter region. **B.** Mutagenesis of Sp1 recognition sequences. The Sp1 binding sites in the TGF- β 1 core promoter were individually mutated by PCR and are indicated with a **X**.

FIGURE 2. TGF- β 1 GENE EXPRESSION IN HUMAN TUMOR CERVICAL CANCER CELL LINES. **A.** Semi-quantitative RT-PCR analysis of TGF- β 1 gene expression in cervical cancer cell lines transformed by HPV-18 (HeLa), HPV-16 (CaSKi, and SiHa) and C33A cells that are not HPV-infected. DNA from PBMC of health donors was used as internal control. Samples were separated in 1% agarose gel. A 50 bp DNA ladder and ϕ X174 DNA/Hae III were used as molecular weight markers (MW). **B.** Bands of panel A were scanned using a computer-assisted densitometry (Fluor-S-Multi-imager, Bio-Rad) and the data were plotted as a TGF- β 1/ β -actin mRNA ratio. **C.** Analysis of TGF- β 1 protein abundance by ELISA in the same cell lines as in panel A. Semi-quantitative RT-PCR and ELISA assays were performed in triplicate and a representative experiment is shown.

FIGURE 3. FUNCTIONAL ANALYSIS OF TGF- β 1 PROMOTER ACTIVITY TRANS-ACTIVATED BY HPV-16 E6 AND E7. **A.** Transcriptional activation of TGF- β 1 promoter is induced by E6 and E7 oncoproteins. C33A cells were transiently transfected with the pTGFs constructs and co-transfected with pSV2E6 and pSV2E7. Forty eight hours after co-transfection, CAT activity levels were measured. The pCAT3 corresponds to the empty vector. White bars correspond to TGF- β 1 promoter activity alone, while the grey and black bars indicate the TGF- β 1 promoter activity induced by E6 or E7 oncoproteins, respectively. **B.** Northern blot analysis of E6 and E7 oncogenes. C33A cells alone (lanes 1 and 4) or transfected with pSV2E6 (lane 2) or pSV2E7 (lane 5) were harvested and total RNA was isolated. The RNA from CaSKi cells was used as positive control (lanes 3 and 6). The arrows show different splicing products of E6 and E7 oncogenes. Data showed in the CAT assays is the average of four independent experiments.

FIGURE 4. NUCLEOTIC SEQUENCE OF HUMAN TGF- β 1 CORE PROMOTER. Sequence shows the TGF- β 1 core promoter sequence and the position of the Sp1 binding sites onsite the boxes (Sp1a, Sp1b, Sp1c, Sp1d and Sp1e). The transcription start site is indicated. The information was taken from GenBankTM/EMBL data Bank with access number J04431.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

FIGURE 5. FOOTPRINTING *IN VITRO* ANALYSIS OF TGF- β 1 CORE PROMOTER IN THE PRESENCE OF HPV-16 E6 AND E7 ONCOPROTEINS. Footprinting *in vitro* analysis of TGF- β 1 core promoter using nuclear extracts from C33A cells non-transfected (panel A, NEC33A), and transfected with E6 (panel B, NEC33AE6) or E7 (panel C, NEC33AE7) oncogenes. The position of Sp1 binding sites are shown in the brackets. The lanes 1 and 2 correspond to A+G and G Maxam and Gilbert reactions respectively. Lanes 3 and 4 indicate the negative control reaction (NC-) without nuclear extracts. Lanes 5 to 9 correspond to increasing concentrations of different nuclear extracts. A representative result of three independent experiments is shown.

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

FIGURE 6. MUTATIONAL ANALYSIS OF THE Sp1 BINDING SITES OF TGF- β 1 CORE PROMOTER. C33A cells were transiently transfected with TGF- β 1 core promoter wild-type (pSp1-wt) or with the different mutated Sp1 binding sites (pSp1-mts) and co-transfected with pSV2E6 and pSV2E7. Forty eight hours post-transfection, CAT activity levels were measured. The pCAT3 corresponds to empty vector. The white bars correspond to TGF- β 1 promoter activity alone, while the grey and black bars indicate the TGF- β 1 promoter activity induced by E6 or E7 oncoproteins, respectively. Data shown are the average of four independent experiments.

28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE 7. EMSA ANALYSIS OF TGF- β 1 CORE PROMOTER. A. TGF- β 1 core promoter shows the Sp1e probe. **B.** EMSA analysis of Sp1e. The radiolabeled oligonucleotide was incubated in absence (lane 1) or presence of nuclear extracts from C33A cells non-transfected (lane 2, NEC33A) and transfected with E6 (lanes 3 to 5, 9 and 11, NEC33AE6) or E7 oncogenes (lanes 6 to 8, 10 and 12, NEC33AE7). The nuclear extracts from NEC33AE6 and NEC33AE7 were pre-incubated with 100-fold molar excess of AP-1 or Sp1e unlabeled probes before the addition of the Sp1e radiolabeled probe (lanes 4, 7, 9 and 10). Anti-E6 and anti-E7 polyclonal antibodies were used for the super shift assay (lanes 11 and 12) as well as the irrelevant anti-IL6 polyclonal antibody (lanes 5 and 8). The DNA-protein, super-shift complexes and free-DNA are indicated with arrows. Data is representative of three independent experiments.

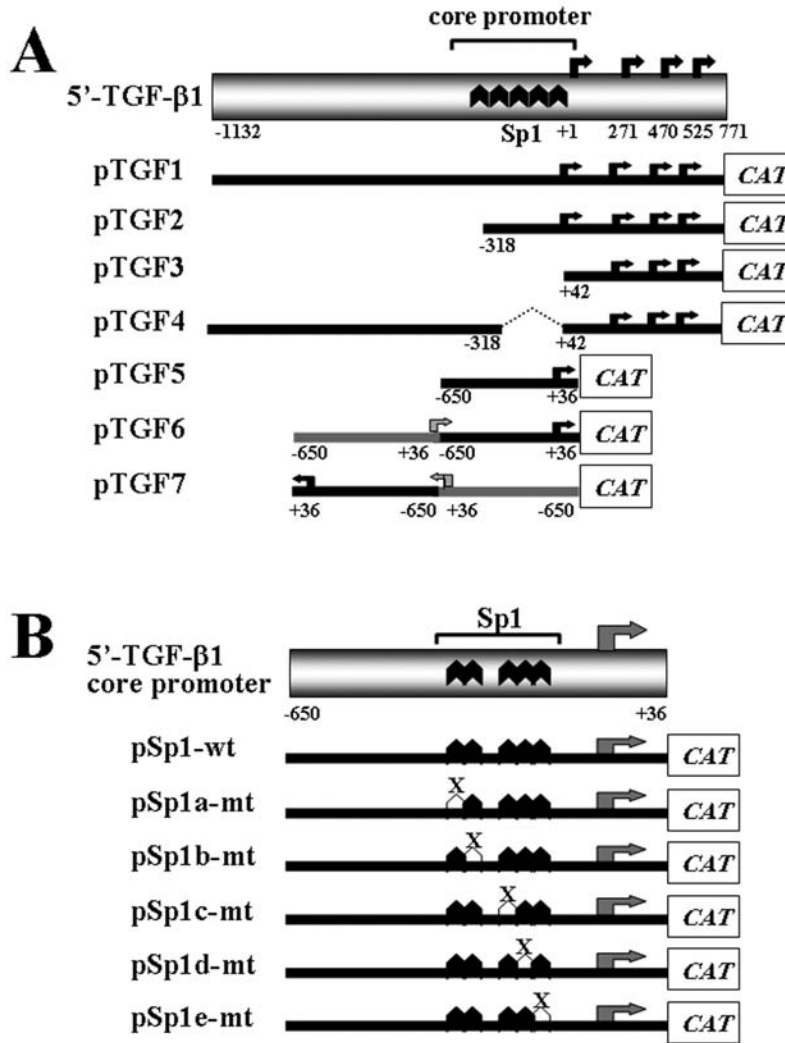


FIGURE 1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

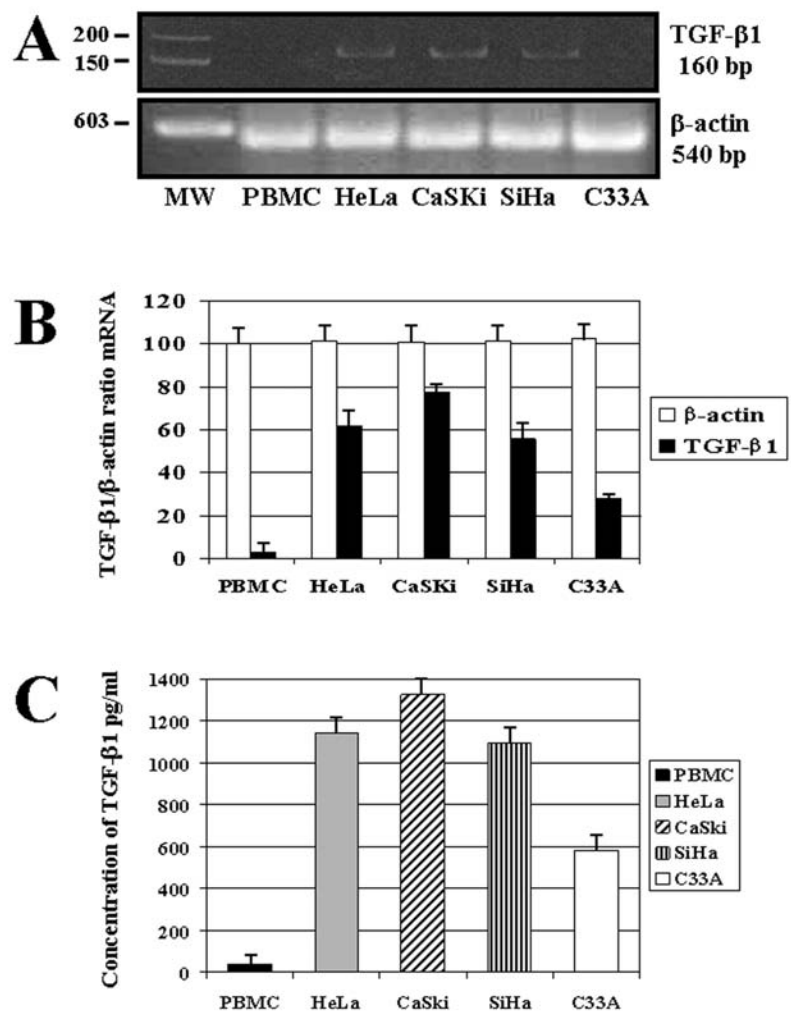


FIGURE 2

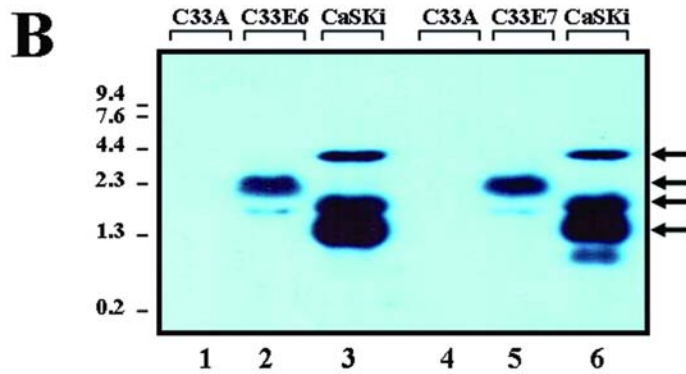
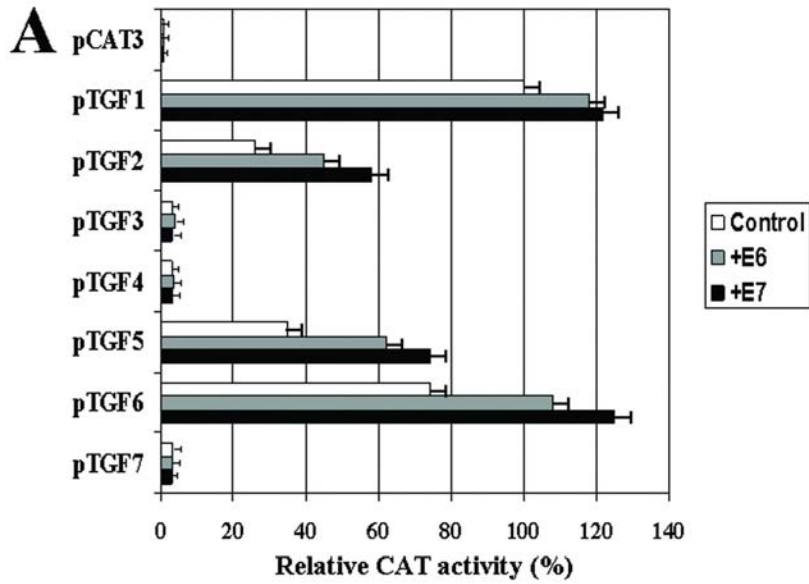


FIGURE 3

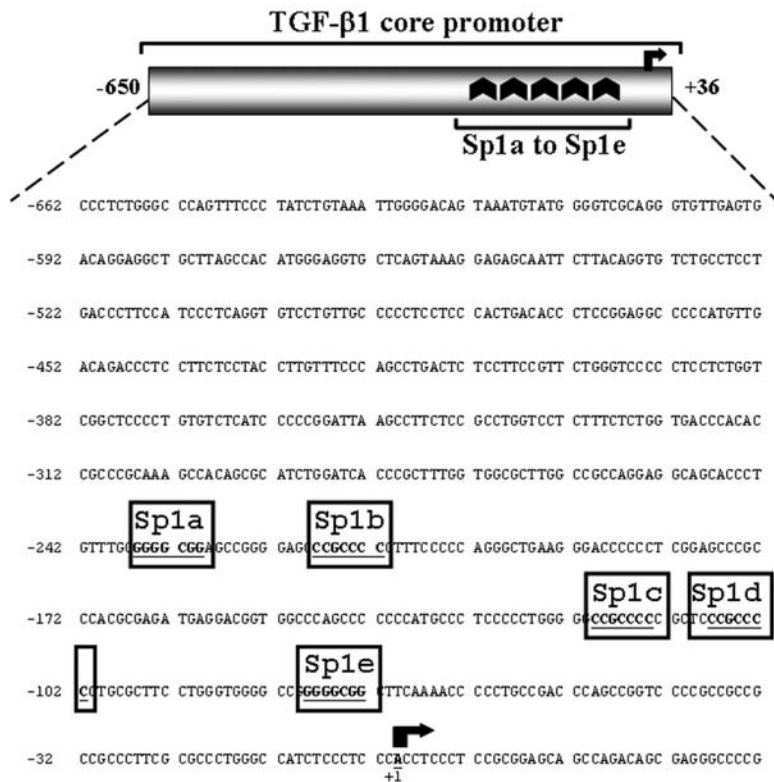


FIGURE 4

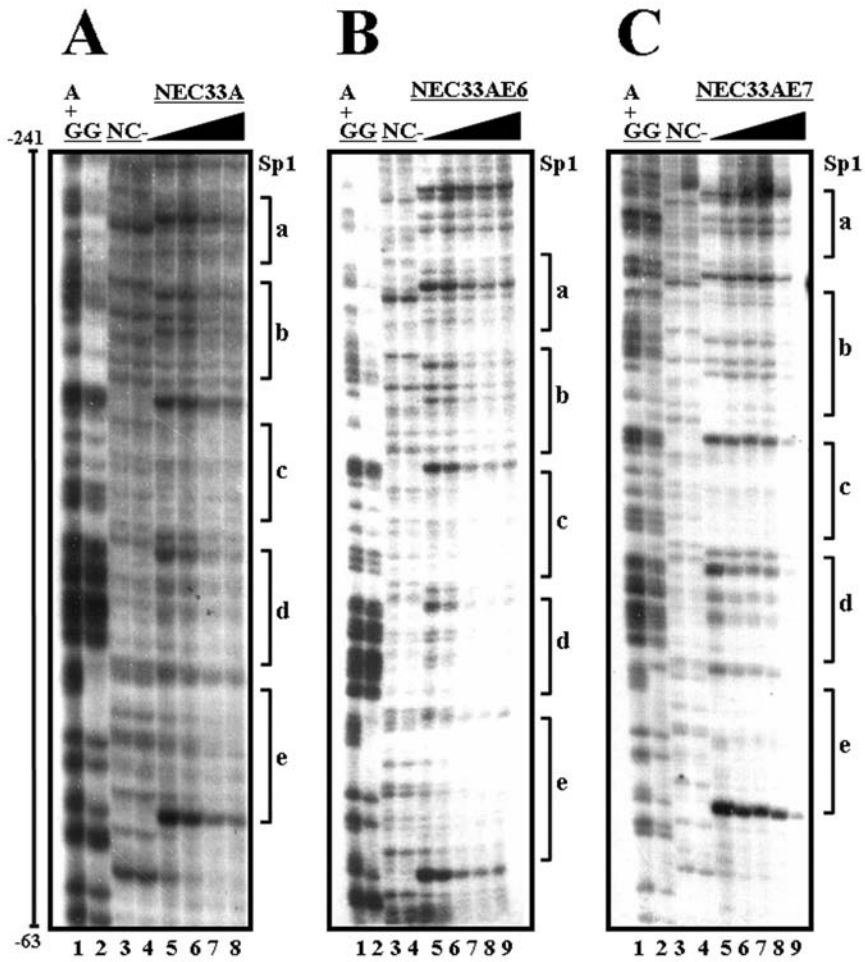


FIGURE 5

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

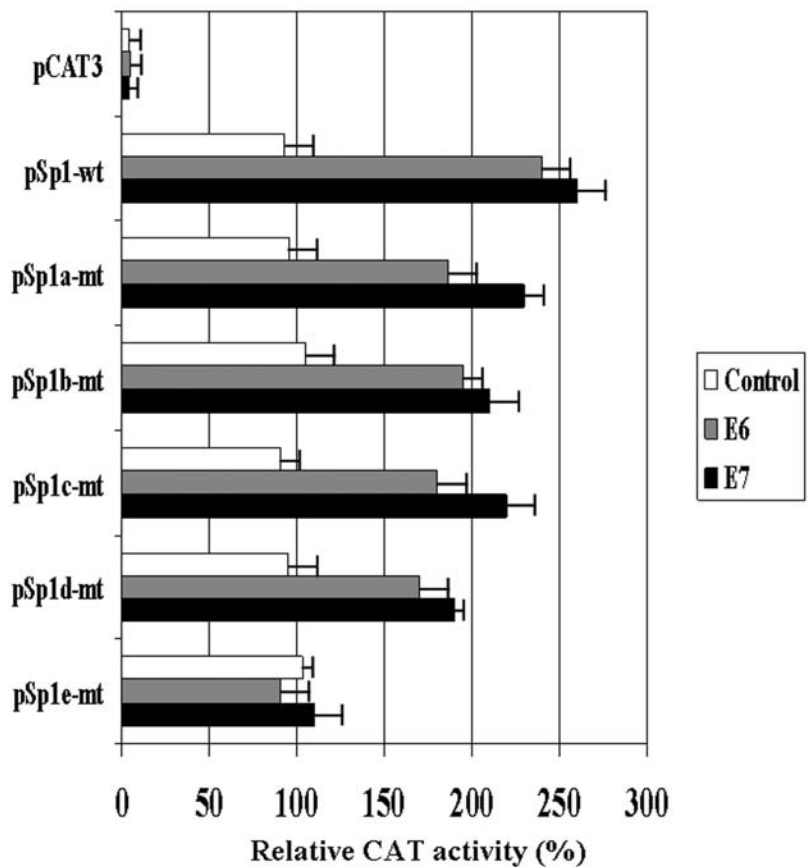


FIGURE 6

