

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Facultad de Medicina

**EFFECTO DE LA ONCOPROTEÍNA E6 DEL VIRUS DEL  
PAPILOMA TIPO 18 SOBRE LA PROTEÍNA hDlg Y LA VÍA DE  
SEÑALIZACIÓN Akt/PKB**

**TESIS**

que para obtener el grado de:

**Doctora en Ciencias**

**P R E S E N T A:**

**ADRIANA CONTRERAS PAREDES**

Directora de tesis:

Dra. Marcela Lizano Soberón

México, D.F.

Abril 2009



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.



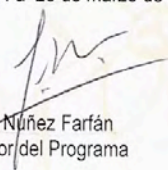
**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de noviembre de 2007, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **CONTRERAS PAREDES ADRIANA** con número de cuenta **88207278** con la tesis titulada: **"EFECTO DE LA ONCOPROTEÍNA E6 DEL VIRUS DEL PAILOMA TIPO 18 SOBRE LA PROTEÍNA hDIg Y LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN Akt/PBK"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN**:

Presidente:	DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
Vocal:	DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ
Vocal:	DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Vocal:	DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS
Secretario:	DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Suplente:	DR. VICENTE MADRID MARINA
Suplente:	DRA. BEBECA LÓPEZ MARURE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F. a 25 de marzo de 2009.

  
Dr. Juan Nuñez Farfán  
Coordinador del Programa

## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por todo su apoyo durante mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de doctorado otorgada durante el desarrollo de este trabajo, con número de referencia **176656**.

A la Dra. Marcela Lizano, por su confianza, apoyo incondicional y por permitirme aprender a su lado no sólo en el terreno laboral, sino también en el personal.

A la Dra. Rebeca López Marure y al Dr. Alejandro García Carrancá por sus consejos e invaluable apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A los Dres. Marco Antonio Cerbón, Alejandro Zentella, Mauricio Salcedo y Vicente Madrid por sus valiosos comentarios y aportaciones.

Esta tesis fue realizada en el Instituto Nacional de Cancerología en la Subdirección de Investigación Básica.

La elaboración de este trabajo fue financiado por  
El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT SALUD-2004-  
01-067 y Salud-2002-C01-6579/A1).

## DEDICATORIA

*A la vida por representar un reto diario y a Dios por permitirme enfrentarla*

*A mis padres por ser los pilares de mi vida y por mostrarme a cada momento su enorme e incansable amor hacia mi.*

*A mis hermanas Gaby y Coral, por su amor inquebrantable, por disfrutar mis triunfos y su apoyo incondicional en mis fracasos.*

*A mi abuelita por sus consejos, por su enorme fe en mí y por su amorosa presencia a lo largo de toda mi vida.*

*A toda mi familia: Tíos, Tías, Primos y Primas, por su cariña y apoyo incondicional.*

*Los amo*

## A mis amigos

- ♥ A Chava, por su enorme fe en mi, por permitirme enseñarle lo poco que sé y por enseñarme tanto.
- ♥ A Rafa, Boris y Bicho, por reír conmigo y mostrarme que los momentos difíciles, son solo eso momentos.
- ♥ A Erick por su enorme apoyo en el terreno laboral y personal.
- ♥ A Marco por su cariño, comprensión y por estar siempre.
- ♥ A Rubén por mostrarme que la verdadera amistad supera las largas ausencias.
- ♥ A Elenaé, por su apoyo, su confianza y por tomar el riesgo de ser mi primera alumna.
- ♥ A Inés y Rocío por su amistad, apoyo y compartir conmigo esas suculentas mañanas.
- ♥ A todos mis compañeros de laboratorio: Ade, Ime, Vero, Fredy, Fer, Señor H, Mariana, Aida, Naye, Joaquín y Saida, por permitirme aprender de cada uno de ustedes, por hacer amenos y divertidos aún los peores momentos.

## INDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Incidencia y mortalidad por cáncer en México.
- FIGURA 2.** Muerte en mujeres mexicanas por cáncer en el año 2002.
- FIGURA 3.** Muerte en mujeres mexicanas por cáncer en el año 2005.
- FIGURA 4.** Estructura del cérvix.
- FIGURA 5,** Corte histológico del epitelio cervical.
- FIGURA 6,** Histología: Epitelio cilíndrico.
- FIGURA 7.** Corte histológico de la unión escamo-columnar.
- FIGURA 8.** Cortes histológicos: Etapas en el desarrollo del CaCU.
- FIGURA 9.** Estructura del genoma del VPH.
- FIGURA 10.** Organización del genoma del VPH.
- FIGURA 11.** Estructura de la proteína E7 del HPV-16.
- FIGURA 12.** Interacción de la oncoproteína E7 con la proteína supresora de tumor pRb.
- FIGURA 13.** Estructura de la proteína E6 del VPH-18.
- FIGURA 14.** Proteínas celulares con las que interacciona la oncoproteína E6 de VPHs de alto riesgo.
- FIGURA 15.** Vías de señalización moduladas por la proteína supresora de tumor PTEN.
- FIGURA 16.** El promotor de PTEN no está metilado en líneas celulares de cáncer de cervix.
- FIGURA 17.** Los niveles de pPTEN disminuyen en las células transfectadas con las variantes de E6 del HPV-18.
- FIGURA 18.** La expresión de las variantes de E6 del HPV-18 se asocia con niveles diferentes de hDlg.
- FIGURA 19.** hDlg y PTEN interaccionan en la línea celular MCF-7.
- FIGURA 20.** La expresión de las variantes de E6 correlaciona con niveles diferenciales de pPKB.
- FIGURA 21.** La expresión de las variantes de E6 correlaciona con los niveles diferente de pPI3K.



**FIGURA 22.** La expresión de la variante AsAi de la oncoproteína E6 se asocia con una mayor actividad de las MAPks.

**FIGURA 23.** La expresión de la oncoproteína E6 del aislado Af está asociada a una menor proliferación en las células MCF-7.

**FIGURA 24.** La proteína E6 contribuye específicamente a la activación de las vías de señalización PKB y MAPKs.

**FIGURA 25.** Las variantes de E6 actúan sobre las vías de señalización PKB y MAPKs a través de su unión con la proteína hDlg.

## **INDICE DE CUADROS**

**CUADRO 1.** Función de las proteínas virales.

**CUADRO 2.** Proteínas celulares que se unen a E7.

**CUADRO 3.** Secuencias de los iniciadores de la reacción empleados para determinar el estado de metilación del promotor de PTEN.

**CUADRO 4.** Secuencias de iniciadores de la reacción para la síntesis de siRNAs contra las proteínas E6 del HPV-18, HPV-16 y hDIg.

**CUADRO 5.** Análisis del ciclo celular de MCF-7 transfectadas con las variantes de la concoproteína E6.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AsAi: Asiático Amerindia

E: Europea

Af: Africana

CaCU: Cáncer cérvico-uterino

VPH: Virus del papiloma humano

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PKB: Proteína cinasa B

PKC: Proteína cinasa C

PI3K: Fosfatidil inositol 3 cinasa

PDK: Cinasa dependiente de fosfatidil

**INDICE GENERAL**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	
1.-El cáncer cervicouterino.....	4
1.1 Epidemiología.....	5
1.2 La estructura del cervix.....	6
1.3 Patología cervical.....	8
2.-El virus del papiloma humano y el cáncer cérvico uterino.....	11
2.1Historia.....	11
3.-Biología molecular del VPH.....	12
3.1 Estructura viral.....	12
3.2 Organización del genoma viral.....	13
3.3 El papel de las proteínas virales en la carcinogénesis.....	14
3.3.1. La proteína E1.....	15
3.3.2. La proteína E2.....	15
3.3.3. La proteína E4.....	16
3.3.4. La proteína E5.....	17
3.3.5. La proteína E7.....	17
3.3.6. La Proteína E6.....	21
4. Variantes de VPH.....	30
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	
1. Cultivo celular.....	36
2. Transfección Celular.....	36
2.1. Extracción de RNA y ensayos de expresión.....	37
3. Modificación del ADN con bisulfito de sodio.....	37
3.1.Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica para metilación.....	38
4. Análisis de western blot.....	39
5. Ensayos de unión proteína-proteína (Inmunoprecipitación).....	40
6 Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo.....	41
7, Síntesis de RNAs de interferencia (siRNAs) contra E6 and hDlg.....	41
7.1.Transfección del siRNA.....	43
8. Análisis estadístico .....	43
<b>RESULTADOS</b>	
1. La actividad de PTEN no es regulada significativamente por la metilación de su promotor.....	44
2. La oncoproteína E6 de las variantes del VPH-18 regula la actividad de PTEN mediante	

su unión con hDlg .....	46
3. Las variantes de la proteína E6 del VPH-18 inducen un aumento en la actividad de la vía de PI3K/Akt. ....	50
4,- La oncoproteína E6 del VPH-18 induce un aumento en la activación de las MAPks mediante la activación de la proteína PI3K.....	52
5, La oncoproteína E6 del HPV-18, regula la actividadde las proteínas PTEN y Akt/PKB a través de su unión con hDlg.....	56
<b>DISCUSIÓN</b> .....	59
<b>CONCLUSIONES</b> .....	66
<b>REFERENCIAS</b> .....	67
<b>ANEXO 1.</b> Artículos publicados	

**RESUMEN**

El cáncer cérvico uterino (CaCU) constituye un serio problema de salud pública y se conoce que una infección persistente con virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo es el factor etiológico principal. La infección por VPH se considera una causa necesaria pero no suficiente para que una lesión intraepitelial del cérvix progrese a cáncer. Se ha propuesto que cambios en el genoma viral podrían estar asociados a un diferente comportamiento biológico que repercute en el desarrollo de CaCU. En este trabajo se evaluó el efecto de los cambios nucleotídicos del oncogen E6 de distintos aislados de VPH-18 en las vías de señalización Akt/PKB (Protein Kinase B) y MAPKs (Mitogen-Associated Protein kinase) y su repercusión en efectos biológicos como proliferación. Se sabe que la oncoproteína E6 tanto de VPH tipo16, como del tipo 18 es capaz de unirse y promover la degradación de la proteína supresora de tumor hDlg (human Disc large). Esta proteína está involucrada en la adhesión, la arquitectura y el control de la proliferación celular. Además se ha visto que hDlg regula la actividad de la proteína supresora de tumor PTEN, un componente de la vía de señalización de PKB. De esta manera consideramos que E6 podría ejercer su efecto sobre las vías de proliferación y supervivencia mediado por su interacción con hDlg. Se analizaron los niveles de proteínas celulares totales y activadas de células transfectadas con vectores de expresión con los distintos genes E6 variantes de VPH18: Asiático Amerindia (AsAi), Europea (E) y Africana (Af). Los ensayos de western blot con anticuerpos específicos mostraron que las variantes de E6 modulan diferencialmente los niveles de hDlg. Menores niveles de hDlg se observaron en las células MCF-7 transfectadas con E6 AsAi y E, lo cual repercute directamente en la disminución de la actividad de PTEN y aumento de pPKB.

Las variantes de E6 también son capaces de modular diferencialmente la actividad de la fosfo proteína PI3K (Phosphatidyl Inositol 3-kinase). La mayor actividad de esta proteína se encontró en las variantes AsAi y E, lo cual correlaciona con la actividad de las MAPKs y la proliferación celular.

La participación de E6 en las vías PKB y MAPKs se demostró mediante la reducción de su expresión con RNAs pequeños de interferencia (siRNA) en células HeLa.

En las células tratadas con siRNA-E6 se recuperaron los niveles de hDlg y la actividad de PTEN, mientras que la actividad de PKB y MAPKs se observó una disminución.

Se demostró que el efecto producido por E6 es mediado por su interacción con hDlg. El tratamiento de las células MCF-7 con el siRNA-hDlg, disminuyó claramente los niveles de la proteína hDlg, con la consecuencia del decremento en la proteína PTEN fosforilada y el aumento de las formas activas de PKB y MAPKs, eventos muy similares a los observados en las células transfectadas con E6-AsAi.,

Estos resultados apoyan un mecanismo por el cual las variantes de E6 del VPH-18 afectan diferencialmente las vías de señalización Akt/PKB and MAPKs, las cuales están directamente involucradas en procesos carcinogénicos.

**ABSTRAC**

Intra-type genome variations of high risk Human papillomavirus (HPV) have been associated with a differential threat for cervical cancer development. In this work, the effect of HPV18 E6 isolates in Akt/PKB and Mitogen-associated protein kinase (MAPKs) signaling pathways and its implication in cell proliferation were analyzed. E6 from HPV types 16 and 18 are able to bind and promote degradation of Human disc large (hDlg). Our results show that E6 variants differentially modulate hDlg degradation, rebounding in levels of activated PTEN and PKB. HPV18 E6 variants are also able to upregulate phospho-PI3K protein, strongly correlating with activated MAPKs and cell proliferation. Data was supported by the effect of E6 silencing in HPV18-containing HeLa cells, as well as hDlg silencing in the tested cells. Results suggest that HPV18 intratype variations may derive in differential abilities to activate cell-signaling pathways such as Akt/PKB and MAPKs, directly involved in cell survival and proliferationA



## **INTRODUCCIÓN**

El cáncer representa un problema de salud a nivel mundial, tanto en hombres como en mujeres, aún en países desarrollados. En 2004, esta enfermedad representó la segunda causa de muerte, en USA, seguida de las enfermedades cardiovasculares (1). La Organización Mundial de la Salud, estimó que 7.6 millones de personas murieron por cáncer en el 2005 y que 84 millones más podrían morir en los siguientes 10 años. En este mismo año, se presentaron 10,9 millones de nuevos casos, actualmente existen 24.6 millones de personas que viven con cáncer (1,2).

### **1.- El cáncer cervicouterino**

#### **1.1 Epidemiología**

En el ámbito mundial, el cáncer cérvico uterino (CaCU) es el segundo cáncer más frecuente, sobre todo en los países subdesarrollados, donde suceden el 80% de los casos. Cada año, se diagnostican 510.000 casos y se producen 288.000 fallecimientos, de forma que representa la segunda causa de muertes por cáncer en mujeres (3). La mayoría de las mujeres que desarrollan este tipo de cáncer tienen un promedio de edad de 48 años. Sin embargo, cada vez es más común ver mujeres jóvenes, que a edades de 20 y 30 años son diagnosticadas.

Mientras que en países desarrollados la incidencia y la mortalidad debido a este padecimiento disminuyeron de manera significativa en el siglo anterior, en los países en vías de desarrollo no se ha observado este comportamiento; en particular los países de América Latina, se han caracterizado por notificar las mayores tasas de incidencia en toda la orbe. En el año 2000, se estimaron al menos 76 000 casos incidentes de cáncer de cuello uterino, y 30 000 muertes para la Región en general, lo cual representa 16 y 13% del total del mundo, respectivamente. Se estima que esta región una de cada mil mujeres de entre 35 y 55 años de edad padece cáncer de cervix (4).

En México, el panorama es coincidente y en la última década del siglo XX la mortalidad mostró una tendencia ascendente. En el año 2002, se presentaron 12 512 nuevos casos de cáncer cervicouterino, de los cuales 5 777, el 46% de los casos, fueron decesos (4). Esta enfermedad fue la primera causa de muerte entre las mujeres mexicanas con cáncer, ocupando un 16.6 % de otros cánceres (Fig. 1 y 2). En el 2005, fue la primera causa de muerte por cáncer en la mujer, junto con el cáncer de mama (5).

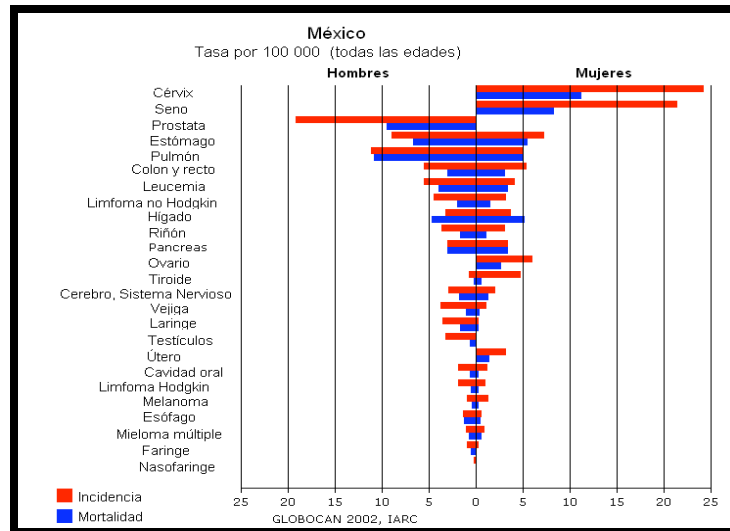


Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer en México. Fuente:GLOBOCAN 2002 (4).

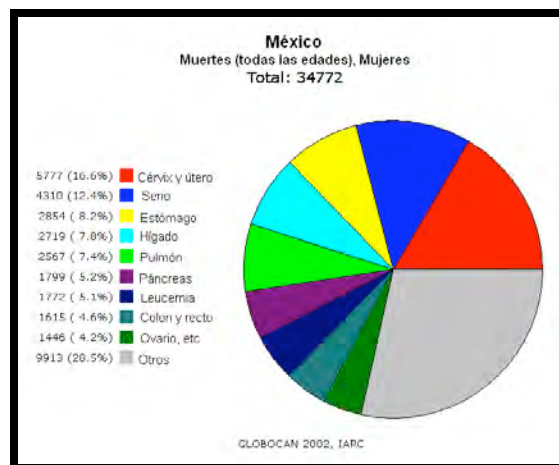


Figura 2. Muerte en mujeres mexicanas por cáncer en el año 2002. Fuente:GLOBOCAN 2002(4).



Figura 3. Muerte en mujeres mexicanas por cáncer en el año 2005. Fuente:INEGI 2007 (5)

### 1.2 La estructura del cervix

El cervix es la parte inferior o abertura del útero. El cuello uterino está compuesto por exocervix y endocervix, el primero se extiende hacia abajo del orificio cervical externo. El canal endocervical es la porción del cuello uterino que se extiende hacia arriba del orificio cervical externo (Fig. 4).

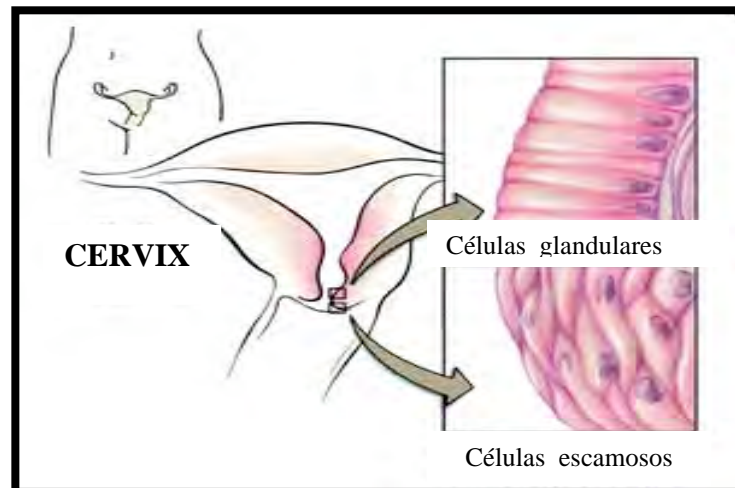
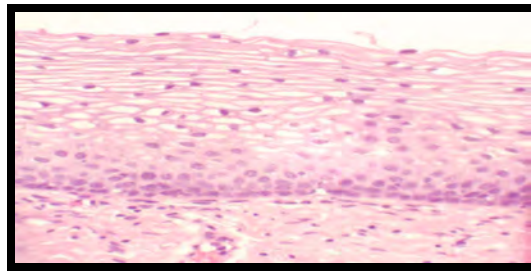


Figura 4. Estructura del cervix: endocervix (células glandulares) y exocervix (células escamosas). Fuente:www.cancerquest.org/index.cfmpage=4086 (6).

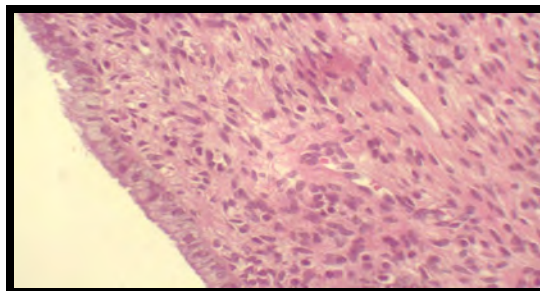
En el cuello uterino se encuentran dos tipos de epitelio: el epitelio escamoso no queratinizado que recubre la superficie vaginal del exocervix y el epitelio columnar mucosecretor, que constituye el recubrimiento epitelial del endocervix (Fig. 4).

El epitelio escamoso es un epitelio plano poliestratificado con 7-10 hileras de células que se dividen en tres estratos (Fig. 5): Estrato basal, con células de núcleos grandes y citoplasma fundamentalmente basófilo. Estrato intermedio o espinoso, que muestra varias hileras de células ovaladas con núcleo vesicular y citoplasma grande. Finalmente el estrato superficial que presenta células de contornos regulares y núcleos picnóticos. Este epitelio se reemplaza cada 4-5 días, es muy sensible a los estrógenos y progesterona y contiene glucógeno (7).



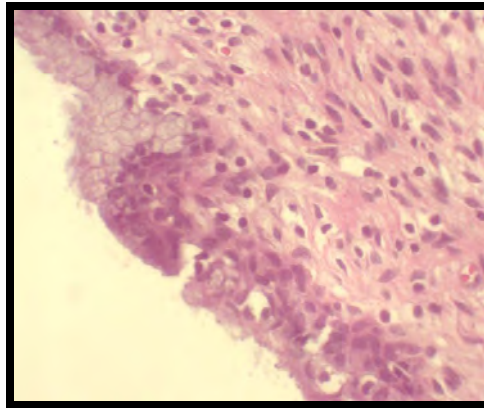
**Figura 5. Corte histológico del epitelio cervical escamoso.** Fuente: Tratado y Atlas de patología cervical. 1993 (7).

El epitelio columnar mucosecretor, está constituido por un solo estrato de células cilíndricas altas de forma ovalada que reviste la superficie del conducto endocervical y todas sus formaciones glandulares (Fig. 6).



**Figura 6. Histología: Epitelio cilíndrico.** Fuente: Tratado y Atlas de patología cervical. 1993 (7).

El punto en el cuello uterino, donde los dos epitelios se unen se le denomina “Zona escamo-columnar” o también llamada “Zona de transformación” (ZT); ésto debido al epitelio columnar que se encuentra en constante transición hacia el epitelio escamoso. La unión entre el epitelio columnar del endocervix y el epitelio escamoso del exocervix es un sitio de cambios continuos, por lo tanto es el sitio ideal para el desarrollo de lesiones malignas, tales como displasias y principalmente CaCU. La zona de transformación puede encontrarse en el exterior del cervix, donde puede observarse fácilmente o dentro del canal cervical, haciéndose difícil su observación (Fig. 7)(7).



**Figura 7. Corte histológico de la unión escamo – columnar. En la parte de arriba se observa epitelio cilíndrico muco-secretor y en la parte de abajo epitelio escamoso. Fuente: Tratado y Atlas de de patología cervical. 1993 (7).**

### 1.3 Patología cervical

El CaCU, se origina en la zona de transformación del cervix y se produce como un cambio gradual que pasa por las siguientes etapas de:

- 1.- Cervix normal
- 2.- Displasia leve, moderada y grave
- 3.- Cáncer *in situ*
- 4.- Cáncer invasor

**Displasia cervical y cáncer**

El término displasia significa crecimiento, por lo que el concepto de displasia cervical indica un crecimiento desordenado del epitelio cervical. En un cervix normal, se ven las capas de las células distribuidas en una forma ordenada y con un proceso de diferenciación o maduración celular en forma ascendente, en donde las células basales emergen hacia la superficie a medida que se dividen, remplazando a las células de la superficie.

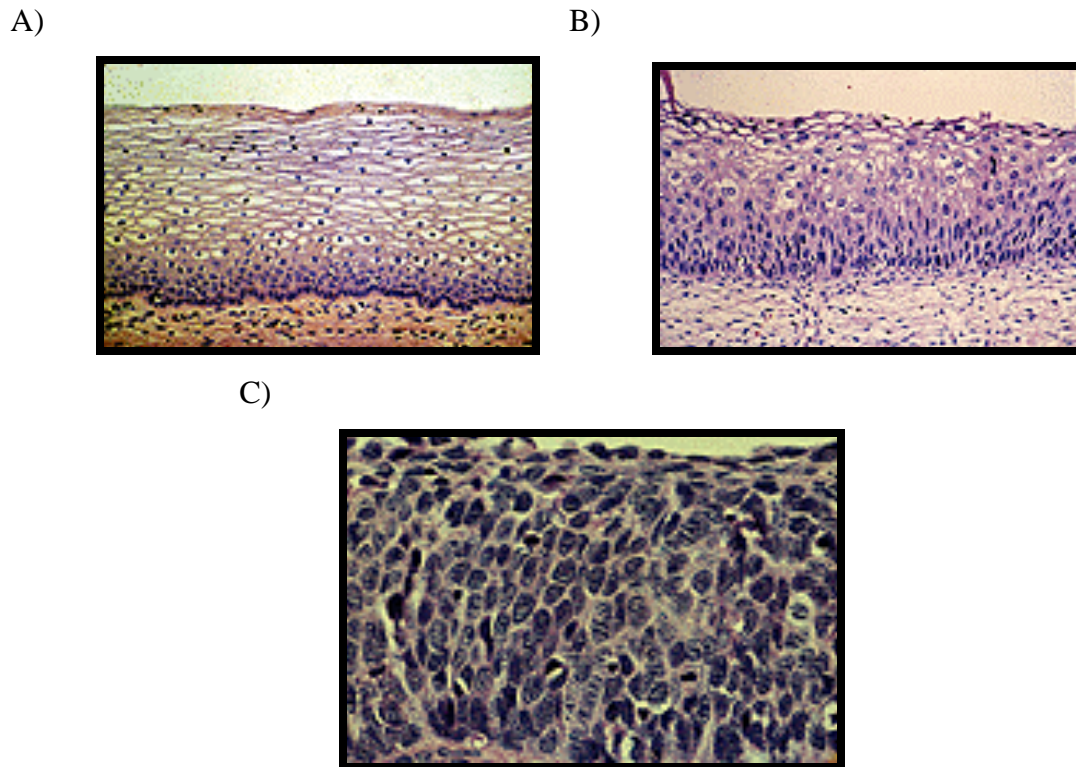
**Displasia cervical leve:** en estas lesiones hay una deficiencia en el proceso de crecimiento organizado, hay alteraciones en el arreglo regular de la tercera parte inferior del epitelio, conservando las otras dos terceras partes de su arquitectura normal. La regularidad de las células basales dispuestas en empalizadas se pierde y se distribuyen en forma irregular, los cambios celulares más superficiales son muy escasos y están constituidas por células que presentan abundante citoplasma y ligero crecimiento del núcleo.

**Displasia moderada:** en este tipo de lesión, solamente la tercera parte superior del epitelio tiene caracteres morfológicos normales en su estratificación y maduración, y las dos terceras partes inferiores están constituidas por numerosas células que se disponen en forma desordenada.

**Displasia grave y carcinoma *in situ*:** la alteración epitelial esta presente en todo el espesor del epitelio. La diferencia entre la displasia grave y el carcinoma *in situ*, esta constituida por la presencia de alguna capa superficial de células diferenciadas en el primer caso, y ausente en el carcinoma *in situ*. La células son maduras, pero de aspecto inmaduro, carecen de citoplasma y lo más notorio es la presencia de núcleos de forma y tamaño regular, hipercrómico y de cromatina granular e irregular. Hay numerosas mitosis anormales en todo el espesor de la lesión.

**Cáncer invasor:** en este tipo de cáncer a diferencia del cáncer *in situ*, donde todas las células anormales se encuentran confinadas por la membrana basal, las células tienen la capacidad de migrar a otros tejidos a través de la microvasculatura que envuelve al tumor

maligno. Esta vasculatura se forma mediante el proceso llamado Angiogénesis, cuyo principal estímulo es la liberación de factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) por las células tumorales y como consecuencia de la deficiencia de oxígeno. De esta manera el cáncer puede invadir otros órganos



**Figura 8. Etapas en el desarrollo del CaCU.** A) Exocervix normal, revestido por epitelio escamoso. B) Displasia cervical leve, se mantiene la estructura de varias capas desordenadas de células poligonales, con núcleos de formas, tamaños y bordes irregulares. C) Carcinoma *in situ*, epitelio de varias capas, en el que no se reconocen estratos. Fuente: Tratado y Atlas de de patología cervical. 1993 (7).

Según el sitio de origen o estirpe celular de la cual se origina, el cáncer de cervix puede ser de tipo epidermoide o escamoso, mixto o adenoescamoso, así como de otras variedades menos frecuentes, como el de células pequeñas. El comportamiento biológico de estos tipos histológicos varía, siendo en general el adenocarcinoma y los carcinomas adenoescamosos más agresivos que los epidermoides, por lo cual presentan un peor pronóstico aún en etapas clínicas similares (8).

## **2.- El VPH y el cáncer cérvico uterino**

Uno de los más grandes descubrimientos sobre la etiología del cáncer, en los últimos 25 años, ha sido la asociación del cáncer cérvico uterino, con la infección persistente de ciertos genotipos de VPH y fue hecho por zur Hausen a mediados de los 80s. Él proporcionó evidencia de la presencia de los tipos virales 16 y 18 en cáncer de cervix (9).

El VPH está implicado en el 99.7 % de los casos de cáncer cervicouterino de células escamosas y la infección persistente es un requisito necesario, pero no suficiente para el desarrollo de esta enfermedad (10). El VPH es causa de otros carcinomas anogenitales incluyendo: pene (11), vagina (12), vulva (13) y ano (14).

### **2.1 Historia**

El primer aislamiento del VPH, fue realizado por Stone R en 1959, a partir de un corte histológico de tumor de conejo que había sido mantenido en glicerina por un periodo de un año, logrando comprobar que el virus de papiloma se puede ubicar en estratos celulares donde exista poca presencia de queratina y de igual forma lograron establecer que el virus inicia su proliferación en el nucléolo de las células infectadas (15).

Herber y Morgan en 1964, cultivaron cortes de tejido obtenido de condiloma de mujer que revelaron un aumento en la densidad celular, generado por la formación de capas múltiples de tejido, que hicieron pensar la existencia de fases en proliferación en la lesión preexistente (16).

Zur Hausen H. en 1976 fue el primero en relacionar y estudiar al VPH, como agente causal de cáncer del cuello uterino. Por medio de experimentos de hibridación demostró, que las verrugas genitales y los tejidos de cáncer de cervix, contienen genomas del VPH humano (17-19).



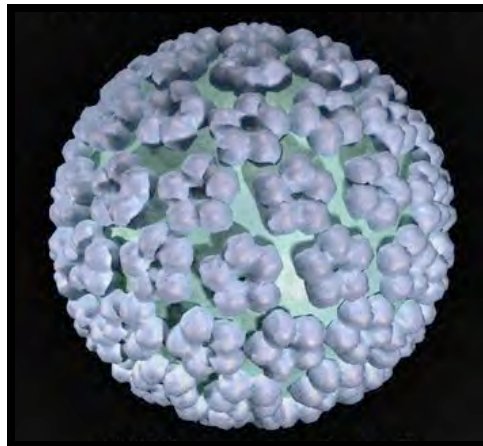
Finalmente, durante la década de los 90s, estudios epidemiológicos apoyados por tecnología molecular, evidenciaron el papel de algunos HPVs en el desarrollo del cáncer de cervix (20).

### 3. Biología molecular del VPH

#### 3.1 Estructura viral

El VPH, pertenece a la familia Papillomaviridae, una familia que fue reconocida como distinta de los polyomavirus por el Consejo Internacional para la Taxonomía de los virus, (ICTV) (21, 22).

Los Papilomavirus son pequeños virus de DNA circular con aproximadamente 7900 pares de bases que infectan una gran variedad de vertebrados incluyendo al hombre. Miden 50 nm de diámetro, carecen de membrana, y su cápside tiene forma icosaédrica compuesta por 72 capsómeros formado por 5 unidades proteicas (Fig. 9) (23,24).



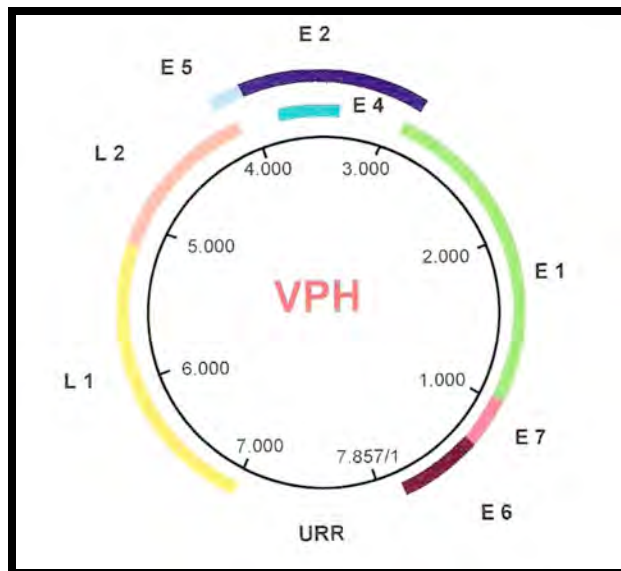
**Figura 9. Estructura del VPH.** En el esquema se muestran los capsómeros que conforman la cápside. Fuente: [www.jociencia.blogspot.com](http://www.jociencia.blogspot.com)

Los papilomavirus son ubicuos y han sido detectados en una gran variedad de animales así como en humanos y son específicos para sus respectivos hospederos. Se han reconocido más de 200 tipos de acuerdo a su secuencia de DNA (23,25). Los VPHs infectan las células epiteliales de la superficie mucosa y la piel, y se clasifican como tipos cutáneos y mucosos. Los tipos cutáneos, son epidermitrópicos e infectan la piel de las manos y pies. (26) Los

tipos mucosos infectan el interior de la boca, garganta, tracto respiratorio y el epitelio anogenital. Basados en su asociación con cáncer de cervix y lesiones precursoras, los VPHs han sido agrupados en tipos de bajo y alto riesgo. Los tipos virales de bajo riesgo incluyen a los VPHs 6, 11, 42, 43, y 44. De alto riesgo a los tipos 16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 70. Dentro del tipo de alto riesgo se incluyen a tipos poco frecuentes en cáncer, pero que se han detectado en lesiones intra epiteliales. (27).

### 3.2 Organización del genoma viral

El genoma viral está dividido en tres regiones: una región temprana E (Early), la cual codifica para las proteínas virales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), necesarias para la duplicación del DNA viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular, una región Tardía L (Late), que codifica para proteínas estructurales (L1 y L2), las cuales son los antígenos de la cápside expresadas en la infección productiva, y una región reguladora conocida como región larga de control LCR (Long Control Region), que contienen la secuencia de DNA que permiten el control de la duplicación y de la expresión del genoma viral (Fig. 10) (28).



**Figura 10. Organización del genoma del VPH.** Fuente: Prendiville, 2004 (26).

### 3.3 El papel de las proteínas virales en la carcinogénesis

El tamaño y la función de las proteínas del papalomavirus se describen a continuación (Cuadro1).

**Cuadro 1. Función de las proteínas virales.** Fuente:Prendiville, 2004 (26).

Proteína celular blanco		Función
<b>E1</b>	38-65 kDa	Inicia la duplicación del genoma víral, ATPasa y helicasa
<b>E2</b>	48 kDa	Esencial para la duplicación y transcripción del DNA víral, formando complejos con E1. Represor transcripcional de E6 y E7
<b>E3</b>	Desconocida	No se conoce su función Sólo está presente en algunos VPH
<b>E4</b>	10-44 kDa	Proteína Tardía; rompe estructuras de citoqueratinas.
<b>E1^E4</b>	Desconocido	Una proteína de fusión creada por la unión de los marcos de lectura abiertos E1 y E4. Se une a proteínas del citoesqueleto
<b>E5</b>	14 kDa	Proteína membranal, interactua con receptores de factores de crecimiento.(EGF/PDGF)
<b>E6</b>	16-18 kDa	Proteína transformante e inmortalizante. Promueve la degradación de p53.
<b>E7</b>	~10 kD	Bloquea la regulación normal de la división de la célula huésped por medio de la degradación de pRb
<b>E8^E2c</b>	20 kD	Proteína de fusión creada por la unión de partes de los marcos de lectura abiertos E8 y E2. Regula la transcripción y la duplicación del genoma víral
<b>LI</b>	57 kD	Forma la cápside en un 80% aproximadamente
<b>L2</b>	43 a 53 kD	Forma la cápside minoritariamente

### 3.3.1. La proteína E1

E1 es una proteína de duplicación viral, posee sitios de unión a DNA y una función de helicasa y ATPasa. La proteína se divide en tres regiones: un dominio amino terminal, que pudiera estar regulando las actividades de E1 residentes en el carboxilo terminal, pues es blanco de una serie de fosforilaciones que influyen positiva o negativamente en su función; una región espaciadora de longitud variable y una región carboxilo terminal más grande, relacionada con la función ATPasas y helicadas de la proteína. El gen E1 es el más grande y de los mas conservados de los papilomavirus, casi 2 Kb de secuencia y de 67.5 (VPH 47) a 76.2 kDa (VPH 10) para la proteína nuclear de 593 (VPH 48) a 681 aminoácidos (VPH 10)(27,28).

### 3.3.2. La proteína E2

La proteína E2 posee tres dominios funcionales: el extremo amino terminal, donde reside la actividad potenciadora de la transcripción, que es aparentemente, independiente de la interacción con el DNA; el extremo carboxilo terminal, donde se realiza la función de unión al DNA y, por lo tanto, es donde reside la capacidad de represión transcripcional; y la porción intermedia que, por su alto contenido de prolinas, es considerada como una bisagra (29,30).

La capacidad de activación de E2, se debe a la facilidad del extremo amino de interactuar físicamente con factores celulares (p.e: Spl) (31). En vista de las características palindrómicas del sitio E2, es lógico y ha sido experimentalmente demostrado que la proteína E2 se une en forma dimérica a su sitio blanco, sin embargo, se requieren cuando menos dos sitios E2, es decir de un tetrámero de la proteína E2, para activar la transcripción.(32).

E2 también tiene una función anti proliferativa al reprimir el crecimiento e inducir apoptosis, en parte mediante la represión de la transcripción de E6 y E7, así como por el consecuente aumento de p53 (32-34). E2 induce un paro del ciclo celular en la fase G1 activando el complejo p21/WAF, inhibidor del complejo ciclina E/CDK2. Este paro lleva a la célula transformada por VPH a senescencia. La reintroducción de E2 en células HeLa

provoca muerte por apoptosis (34). A diferencia del paro en G1, esta apoptosis inducida puede ser tanto independiente de p53, como de secuencias virales. Esto se comprobó transduciendo, con un adenovirus el gen E2 a la línea celular de osteosarcoma Saos, mutante a p53 y que no tiene secuencias virales en su genoma. Las células murieron por apoptosis (34).

Aparte de su papel esencial en la regulación transcripcional de los VPH, la proteína E2 también tiene una función relevante en la duplicación del DNA viral. Al asociarse físicamente con la proteína E1, E2 le confiere especificidad de secuencia para unirse al DNA. Esta interacción es suficiente y necesaria para promover la duplicación viral, independientemente del entorno celular.(32)

### **3.3.3. La proteína E4**

Las proteínas E4, de 10 a 44 kDa, se expresan a partir de un RNAm procesado (E1^E4) abundantemente durante las etapas tardías del ciclo viral y la duplicación vegetativa del DNA viral (35-37). Aunque el marco de lectura de E4 esta localizado dentro de la región temprana; se expresa como un gen tardío, debido a que se encuentra bajo el dominio de un promotor específico de la diferenciación. La función principal de E4 es inducir la ruptura de las redes de citoqueratina del citoplasma de las células infectadas, permitiendo la liberación de los viriones.

E1^E4 de VPH 16 causa paro en la fase G2/M del ciclo celular cuando se expresa en células HeLa y SiHa. Esto sugiere un papel antagónico con la proliferación celular inducida por E7 durante la etapa productiva de la infección, así como el requerimiento de E1^E4 y E2 para inhibir la división celular durante el ciclo viral (35).

La secuencia codificante de E4, aproximadamente 260 pb, está contenido dentro del marco de E2 y las dos proteínas se expresan de un RNAm diferencialmente procesado. E4 puede expresarse junto con E1 y E2 durante la infección. El solapamiento de ambos marcos de lectura y el hecho de que ambas proteínas, E2 y E4, pueden inhibir el ciclo celular, sugiere que cooperan durante el ciclo viral (36-38).

### 3.3.4. La proteína E5

El gen E5, de aproximadamente 230 a 250 pb, codifica para una proteína de 90 aminoácidos con un peso molecular de 14 kDa. Es una proteína de membrana e hidrofóbica. Se halla principalmente en el retículo endoplásmico y Golgi, pero también en la membrana citoplasmática (39,40).

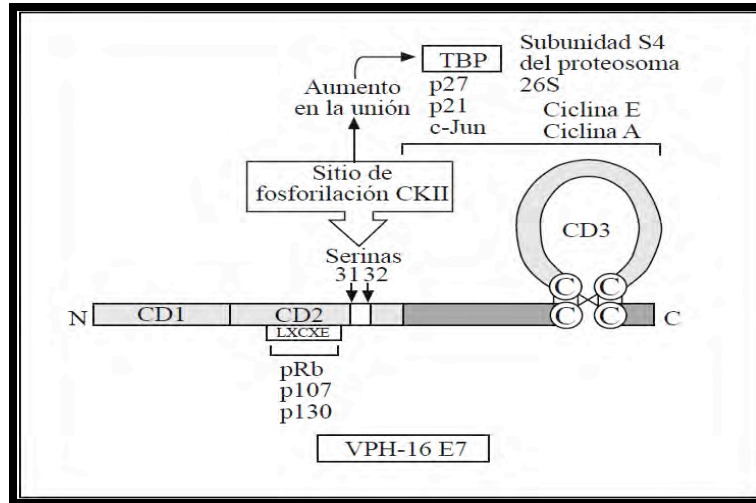
La principal función de E5 es reducir el requerimiento de factores de crecimiento necesarios para la proliferación celular. Aunque su capacidad transformante es débil, se ha observado que E5 del VPH-16, se puede unir e inhibir la degradación de receptores de factores de crecimiento, como el del factor de crecimiento epidermal (EGFR) o el del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) (41,42). Esta función de E5 esta relacionada con su capacidad de unión a la subunidad de 16 kDa de la ATPasa vacuolar (43). La ATPasa es un complejo proteico de unión a membrana, cuya subunidad de 16 kDa forma el poro por lo que pasan los iones  $H^+$  que acidifican el contenido de los endosomas. Se demostró que E5 de VPH-16 inhibe la acidificación de los endosomas, lo que resulta en la retención del receptor, en la prolongación de su señal activa y en el reciclaje de los receptores para anclarse de nuevo en la superficie en ausencia del ligando (44,45).

### 3.3.5. La proteína E7

Las proteínas E7 de alto riesgo, son pequeños polipéptidos de aproximadamente 100 aminoácidos. Al igual que E6, E7 poseen un sitio de unión a dedos de zinc en su extremo carboxilo terminal, el cual se utiliza para su dimerización. La proteína E7 es fosforilada por la caseína II (CK II) en el dominio N-terminal (28).

La proteína E7 está conformada por tres dominios llamados CD1, CD2 y CD3, basados en la homología con la proteína E1A del adenovirus. El dominio CD1 está compuesto por los aminoácidos 1-20, CD2 contiene los residuos 21-39, y CD3 del 40-98 (en E7 del VPH 16) (Fig. 11). La región amino terminal de la proteína E7 del HPV 16 tiene homología con las proteínas Ad E1A y SV40 TAg. Estos dominios conservados, son críticos para las actividades transformantes para cada una de estas oncoproteínas, a través de estos dominios

estas proteínas interactúan con una gran variedad de proteínas celulares, incluyendo al producto del gen supresor de tumores del retinoblastoma pRb (28).

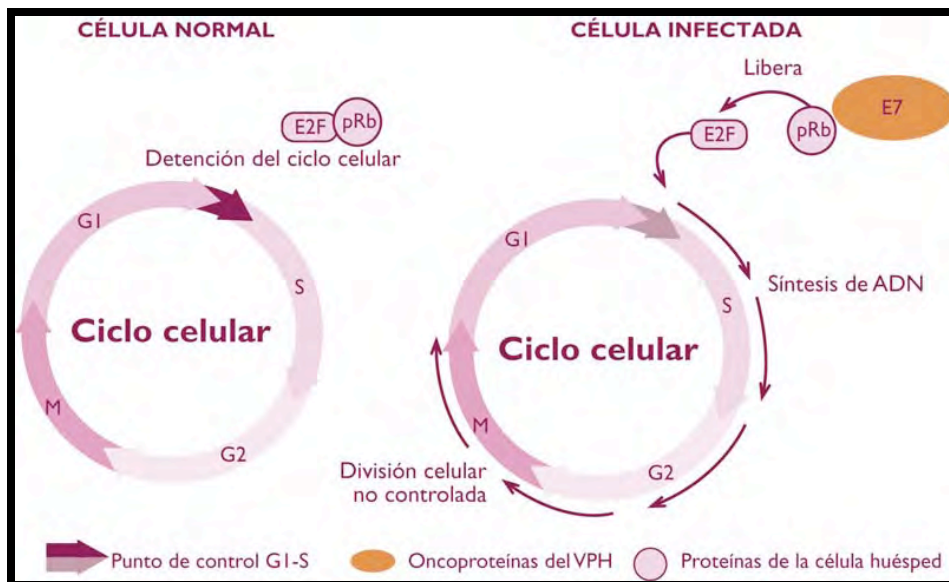


**Figura 11. Estructura de la proteína E7 del HPV-16.** Se muestran sus tres dominios altamente conservados (CD1-CD3) y sus sitios de interacción con sus blancos celulares. Fuente: De la Cruz, 2004 (28).

### La proteína E7 y su interacción con la proteína pRb

La proteína pRb, es un miembro de la familia de “proteínas de bolsillo” que incluye a p107 y p130. Estas proteínas contienen regiones homólogas para la unión a E7 del VPH. La proteína supresora de tumores pRb es la más estudiada dentro de esta familia. Su estado de fosforilación se regula a través del ciclo celular. La proteína pRb se fosforila en múltiples residuos de serina por ciclinas dependientes de cinasas en los límites de G1/S y durante S, G2, y M, y hasta el final de M, cuando se defosforila por una fosfatasa específica. La hipofosforilación representa el estado activo de la proteína y en este estado evita la entrada a la fase S del ciclo celular (46).

La proteína E7 forma un complejo con la forma hipofosforilada de la proteína pRb. Esta interacción permite la inactivación de pRb y la entrada a la fase S. La habilidad de E7 para formar este complejo, le permite inducir la síntesis de DNA y la promover la proliferación celular (Fig. 12) (46).



**Figura 12. Interacción de la oncoproteína E7 con la proteína supresora de tumor pRb.**  
Fuente: Burd, 2003 (48).

Además de la degradación de Rb, la proteína E7, interactúa con un gran número de blancos celulares implicados principalmente en la síntesis del DNA y el control del ciclo celular (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Proteínas celulares que se unen a E7. Fuente Munger, 2001(47)**

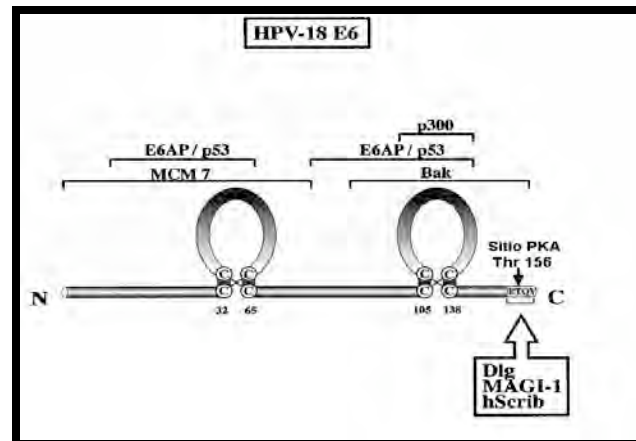
Proteína celular blanco	Función celular de la proteína blanco	Posibles consecuencias de la interacción para la célula
Miembros de la familia API	Factores de transcripción	Abolición de la actividad de IRF-1
$\alpha$ -glucosidasa	Enzima del control glucolítico	Activación alostérica que sobreconsume las reservas de glucógeno. Promoción de hiperproliferación celular
Ciclina A Ciclina E	Actividad de cinasa	Activación de ciclina A y E
Cinasa de la histona H1	Actividad de cinasa	Interferencia con la transición G2/M del ciclo celular
hTid-1	Homólogo al supresor de tumores de Drosophila Tid56 dnaj, modulador de la apoptosis	Activación de los promotores que responden a E2F



IGFBP-3 (proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina)	Blanco transcripcional de p53 que limita la disponibilidad de IGF	Disminución en la cantidad de IGFBP
IRF-1 Factor transcripcional inducido por el interferón- $\gamma$	Regula la expresión del IFN- $\beta$	Inhibición de la activación del promotor del IFN- $\beta$ mediada por el IRF-1, a través de una deacetilasa de histonas
Mi2 $\beta$	Deacetilasa de histonas	Abolición de la actividad transcripcional de IRF-1
Mpp2	Factor de transcripción	Abolición de la actividad transcripcional de IRF-1
M2 piruvato-cinasa (M2-PK)	Modulación de la actividad de la enzima glucolítica M2	Cambio del balance desde la forma tetramérica de alta afinidad por su sustrato hacia el estado dimérico de baja afinidad de la M2-PK
pRb	Regulación del ciclo celular mediante la unión con los factores de transcripción E2F	Fosforilación de pRb y subsecuente liberación de E2F, ubiquitinación y subsecuente degradación
Proteínas pocket asociadas a pRb	Regulación del control del ciclo celular	Pérdida del control del ciclo celular y activación de genes específicos para la progresión del ciclo celular
P21 <sup>CIP-1</sup>	Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas	Estimulación del crecimiento mediante la pérdida del control del ciclo celular
P27 <sup>KIP-1</sup>	Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas	Estimulación del crecimiento mediante la pérdida del control del ciclo celular
P48	Proteína regulatoria del interferón (componente de unión al DNA de ISGF3). Proteína mensajera	Inhibición de las vías de señalización del interferón por medio de la translocación de P48 a núcleo dada la estimulación del IFN- $\alpha$
ATPasa subunidad 4	Subunidad S4 del proteosoma 26S	Degradación de pRb mediante la unión directa a la proteosoma
TAF110 (Factor asociado a la proteína de unión a la caja TATA)	Involucrada en el inicio de la transcripción; coactivador en la regulación de la transcripción	Modulación de la transcripción
TBP (Proteína de unión a la caja TATA)	Involucrada en el inicio de la transcripción	Interferencia con la activación de los promotores que responden a P53

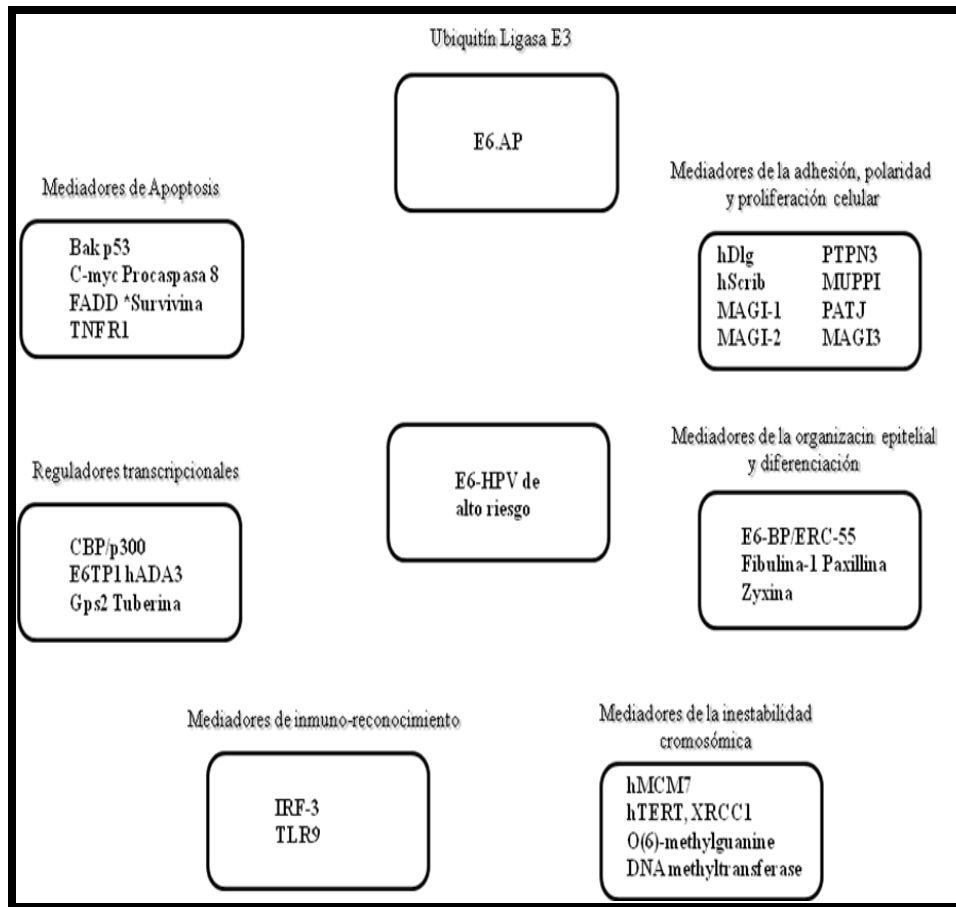
### 3.3.6. La Proteína E6

El gen E6, de aproximadamente 450 a 500 pb, codifica para una proteína de casi 150 aminoácidos con un peso molecular de 16 a 18 kDa. Esta proteína contiene 2 dominios de dedos de Zinc, cuya integridad es esencial para su función (Fig. 13) (49).



**Figura 13. Estructura de la proteína E6 del VPH-18.** En este esquema se muestran las dos estructuras esenciales en la actividad de E6: sus dos dedos de zinc, como estructuras fundamentales para la interacción de la proteína con un gran número de blancos celulares y el carboxilo terminal, el cual contiene el sitio de unión a proteínas con dominios PDZ. Fuente Montovani, 2001(49).

A pesar de que E6 es una proteína pequeña, induce cambios muy importantes en el ciclo de vida del virus y sobre el proceso de inmortalización y transformación de la célula. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la expresión de E6 causa hiperproliferación en células epiteliales, pérdida de diferenciación en las capas epiteliales, y la formación de tumores benignos y malignos. E6, es uno de los primeros genes que se expresan durante el ciclo viral, bloquea la apoptosis, altera la maquinaria transcripcional, trastorna las interacciones célula-célula (un paso crucial hacia la malignidad), incrementa la vida de las células. Las funciones de transformación de E6 están mediadas a través de su interacción con una gran variedad de proteínas celulares (50), las cuales median la transcripción y la diferenciación celular, las vías de señalización apoptóticas, la organización epitelial, la unión célula-célula, la polaridad y el control del ciclo celular (Fig.14) (50-53).



**Figura 14. Proteínas celulares con las que interacciona la oncoproteína E6 del VPHs de alto riesgo.** Fuente:Tungteakkhun, 2008 (50).

### Participación de E6 en la transcripción génica

La oncoproteína E6 es capaz de regular positiva y negativamente la transcripción de genes celulares y virales. E6 interactúa con la proteína CBP, la cual es capaz de activar la transcripción al menos por dos mecanismos: la acetilación de histonas y proteínas no histonas y por la inducción de la unión de factores de transcripción a componentes de la maquinaria de transcripción basal. La unión de E6 a CBP, puede evitar ambos mecanismos. Cuando E6 se une a CBP, puede prevenir la acetilación de p53 mediada por CBP, reduciendo su afinidad por sitios de unión a DNA (51, 28).

Por otro lado, E6 tiene la capacidad de interactuar con el complejo CBP/p300, provocando un bloqueo en sus actividades. CBP/p300 activa la transcripción dependiente de CREB, por medio del reclutamiento de la RNA helicasa A, un componente del complejo de la

RNA polimerasa II, con un promotor con un sitio de unión a CREB. E6 compite por este sitio de unión con la RNA helicasa A, previniendo así su activación. La represión de la maquinaria transcripcional, afecta a una gran variedad de genes, especialmente a aquellos envueltos en la diferenciación celular y en la producción de citocinas involucradas en la señalización de la respuesta inmune, un ejemplo de lo anterior es la transcripción de las IL-6 e IL-8, la cual es dependiente del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual es co-activado por CBP/p300. E6 asimismo, puede inhibir la transcripción mediada por NF- $\kappa$ B (50,28).

La oncoproteína E6 se puede unir e inhibir la acción de otros coactivadores transcripcionales como hDAD3, que es crítico para reclutar a las acetilasas de histonas, involucradas en la expresión de genes supresores de tumor. La acción de E6 al unirse a hDAD3 podría inhibir la expresión de estos supresores de tumor. Otro mecanismo inducido por E6, para regular la actividad de las proteínas supresoras de tumor es su unión con la proteína E6TP1, que posee una alta homología con las proteínas activadas por la actividad GTPasa (GAP), las cuales actúan principalmente como proteínas supresoras de tumor, así que la inactivación de esta proteína por E6, puede contribuir a su capacidad oncogénica (51).

E6, al igual que muchos oncogenes, aumenta la actividad del promotor del gen de VEGF y por tanto, su transcripción. VEGF es uno de los inductores más importantes en la angiogénesis: un proceso esencial para el reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos un pre-requisito fundamental para la expansión progresiva de los tumores (54). El efecto estimulante de E6 sobre el promotor de VEGF puede tener un efecto positivo en la actividad de otros factores de transcripción como Sp-1. E6 también puede contribuir incrementado la señal de VEGF por interferir con la degradación mediada por la ubiquitinación del factor inducible de hipoxia 1alfa (HIF-1 $\alpha$ ): un factor de transcripción involucrado en la activación del promotor de VEGF en respuesta a hipoxia (55). E6 además, puede incrementar la expresión del gen de la fibronectina, transactivar los promotores de protimosina  $\alpha$ , c-Myc, y TGF-1 $\beta$ .

### **Efecto de E6 en la apoptosis**

E6 puede asociarse con el producto del gen supresor de tumores p53. El análisis de tumores humanos ha revelado que p53 es de los genes comúnmente mutados. Las condiciones de estrés celular como radiación UV, hipoxia o infecciones virales inducen a la proteína p53: la cantidad de la proteína puede ser incrementada por estabilización post-transcripcional, produciendo un bloqueo celular en la fase G1. Este bloqueo, permite a la célula reparar el daño al DNA antes de que el ciclo celular continúe (51).

p53 es un factor transcripcional. Estimula la expresión de genes involucrados en el paro del ciclo celular y apoptosis, por ejemplo, es inhibidor de las cinasas dependientes de ciclinas (p21) (51). E6 se une a p53 y la conduce a su degradación a través de la vía de la ubiquitina. En este proceso, también participa la proteína celular asociada a E6 (E6-AP). Ésta actúa como una ubiquitin ligasa (56).

Las mutantes de E6-AP incapaces de unirse a E6 no pueden interactuar con p53 y las proteínas mutantes de p53 que no se unen a E6, no son susceptibles a la degradación inducida por E6-AP, señalando que E6 es requerida para mediar la interacción p53/E6-AP. E6 al unirse a p53 también puede producir su retención en el citoplasma, bloqueando su translocación hacia el núcleo y por tanto inhibiendo su función, independiente del proceso de degradación (52).

La interacción de E6-p53 es importante para la progresión del ciclo celular. El gen p14, un producto alternativo de p16, es un supresor de tumores que induce el paro celular a través de p53, causando una elevación en los niveles de p21 y finalmente el paro en las fases G1 o G2. A diferencia de las células normales, en fibroblastos que expresan E6, se pueden omitir el paro en el ciclo celular y continuar la proliferación a pesar de los altos niveles de p14. El análisis del mecanismo de E6 para abolir esta señal de paro celular, ha revelado que se trata de una ruta dependiente de p53 en la que existe un mecanismo de represión de los promotores de la ciclina B y cdc2 (57).

E6 ha sido implicado en la prevención de apoptosis a través de mecanismos dependientes de p53 e independientes de éste (59). E6 es capaz de unirse a Bak (un miembro pro apoptótico de la familia Bcl-2) a través de un mecanismo independiente de p53 y degradándolo muy probablemente por el reclutamiento de este, por medio de la proteína E6-AP vía ubiquitinación. Estudios bioquímicos, han revelado que Bak puede unirse a E6-AP en ausencia de E6, a diferencia de p53. El VPH, es un virus estrictamente epitelitrópico, con duplicación en queratinocitos diferenciados: estudios recientes, han demostrado que Bak es una proteína con gran expresión en las capas superiores del epitelio, por tanto, su degradación por E6, contribuye con la duplicación viral (58).

Otro mecanismo por el cual la oncoproteína E6 podría estar regulando la apoptosis es a través de su unión con la proteína pro-apoptótica c-myc (59), a la cual marca para su degradación induciendo un aumento en la proliferación de las células infectadas. La proteína E6 también puede ejercer su efecto en apoptosis mediante la regulación negativa de la transcripción de otras proteínas pro-apoptóticas como la survivina (60).

E6 se puede unir a componentes de la maquinaria apoptótica de las células infectadas, como la molécula adaptadora FADD (Fas-associated death domain) y la pro-caspasa 8, específicamente E6 se une a los dominios de muerte DEDs de ambas proteínas y media su degradación, lo que evita que estas proteínas participen en la transmisión de la señal apoptótica (61).

### **Contribución de E6 en la pérdida de la organización epitelial y diferenciación celular**

La organización epitelial es muy importante en control del crecimiento y la proliferación en células normales y la pérdida de esta, en células infectadas por los VPHs de alto riesgo, favorece la duplicación del genoma viral. La oncoproteína E6 de HPV de alto riesgo, se une e inactiva varias proteínas involucradas en preservar la estructura epitelial, como la paxilina (62). Esta proteína que forma parte de las uniones de adhesión focal, participa en la organización de las fibras de actina y en la organización del citoesqueleto. La unión de E6 a esta proteína induce la pérdida de la integración epitelial, lo cual contribuye a la transformación viral (63). Además E6 tiene la capacidad de interactuar y evitar la función

de proteínas que se unen a calcio, ERC-55 o E6-BP (64), lo cual evita que las células epiteliales sufran una diferenciación terminal. La unión de E6 a este grupo de proteínas en su conjunto, reduce la habilidad de las células infectadas para adherirse a la matriz extracelular, desarrollar una morfología normal, incrementar su capacidad duplicativa y por lo tanto su transformación.

### **La proteína E6 como mediadora de la respuesta inmune**

La proteína E6 interfiere con el sistema inmune para evitar el reconocimiento de células infectadas y con esto facilitar la supervivencia del virus, así como evitar su eliminación. E6 interactúa con el factor regulador de interferón (IRF-3) (53,65). Cuando las células infectadas son detectadas por el sistema inmune, el IRF-3 induce su progresión a apoptosis, cuando E6 se une al IRF-3, evita su activación y su capacidad para inducir la muerte celular. Por otro lado, se ha reportado que la oncoproteína E6 es capaz de inhibir la transcripción de genes que codifican para receptores involucrados en la transducción de señales inducidas por el reconocimiento de patógenos como son los TLR (toll-like receptors) (66). Estas interacciones de E6 con las diferentes proteínas del sistema inmune, dan como resultado en una inhibición de la apoptosis y una persistencia del virus en la célula huésped, aspecto importante en la tumorigénesis celular.

### **E6 como reguladora de la unión célula-célula, la polaridad y la proliferación celular**

El potencial oncogénico de los HPVs de alto riesgo ha sido vinculado a la capacidad de la oncoproteína E6 para unirse a proteínas que controlan la adhesión, la polaridad y la proliferación celular; un ejemplo de esto es la capacidad que posee E6 de VPHs de alto riesgo para unirse e inducir la degradación de proteínas de la familia MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) (67). Estas son proteínas andamio, que están localizadas en las regiones de contacto célula-célula como los sitios de unión entre células epiteliales. Se ha demostrado que estas proteínas son fundamentales para mantener la adhesión y polaridad celular, así como la estructura del cito-esqueleto, aspectos fundamentales en el control de la proliferación celular, la pérdida de estas características celulares puede contribuir al establecimiento de un proceso de carcinogénesis (50).

La oncoproteína E6 de los VPHs de alto riesgo es capaz de unirse y degradar a proteínas de la familia MAGUK como: MAGI-, MAGI-2, MAGI-3, hScrib (the human homolog of the *Drosophila* Scribble protein) y hDlg, (human homolog of the *Drosophila* disc large), ésta última es una proteína supresora de tumor, que controla la unión célula-célula, la polaridad y la proliferación celular (67,68).

La proteína hDlg está constituida por tres dominios PDZ, identificados a partir de la similitud de secuencia entre la proteína de densidades postsinápticas de mamíferos (PSD-95), Dlg y la proteína de uniones estrechas de vertebrados (Zonula occludens) (ZO-1); un dominio de homología src tipo 3 (SH3) y un dominio homólogo a guanilato cinasa (GUK) con baja o nula actividad cinasa. Esta se encuentra en la membrana en un gran número de estirpes celulares y está asociada al cito-esqueleto en las zonas de adhesión célula-célula (69).

El papel de hDlg en la proliferación se ha demostrado ampliamente en *Drosophila*, ya que la pérdida de la proteína causa un crecimiento invasivo de células epiteliales (Bilder *et al.*, 2000). En el humano se sabe que la proteína humana hDlg, co-localiza con E-caderina en las uniones adherentes en células epiteliales (71) e interactúa con proteínas del citoesqueleto y con la proteína supresora de tumor APC (adenomatous polyposis coli). La formación del complejo APC-hDlg, es capaz de inhibir la proliferación celular, bloqueando la progresión del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub> (70,71).

Los dominios PDZ de hDlg, se pueden unir al carboxilo terminal de diferentes proteínas como: a canales de K<sup>+</sup> (72) y a la proteína del cito-esqueleto 4.1 (73). Así mismo, esta proteína puede participar en diferentes vías de señalización, debido a que puede formar complejos multiproteicos a través de su amino terminal, el cual posee sitios de unión a dominios SH3 de otras proteínas (74).

Otro aspecto que apoya la función de hDlg como una proteína supresora de tumor es: que pueda unirse a través de sus dominios PDZ a numerosas oncoproteínas virales como: la proteína E4ORF1 del adenovirus 9, la proteína Tax del HTLV-1 y la oncoproteína E6 de



los VPH de alto riesgo (75). La proteína hDlg se une por sus dominios PDZ a una región en el carboxilo terminal de la oncoproteína E6 derivada del VPH de alto riesgo, dicha unión induce la degradación de hDlg y al parecer es responsable de la pérdida de adhesión y polaridad en las células cancerosas infectadas por este virus (50).

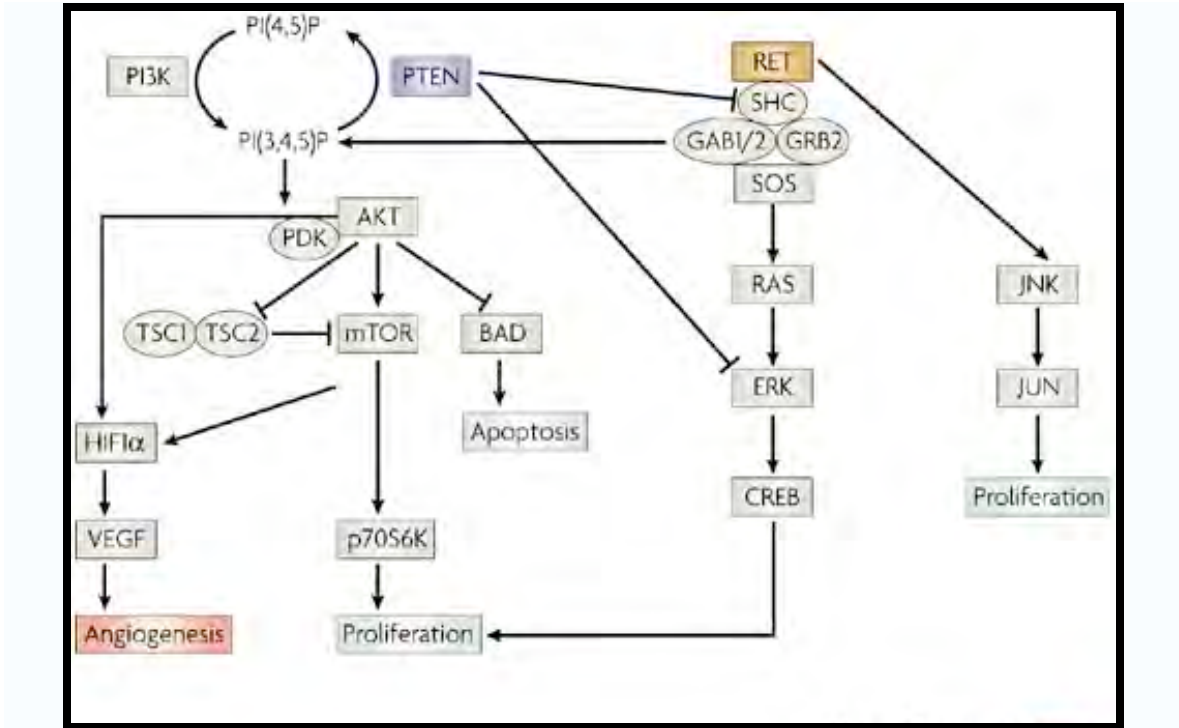
El dominio de unión a los sitios PDZ de hDlg es altamente conservado en la proteína E6 derivadas del VPH de alto riesgo, mientras que interesantemente, dicho dominio no se encuentra en la proteína E6 derivada de los virus de bajo riesgo y por lo tanto estos virus no son capaces de degradar a la proteína hDlg. (76).

La proteína E6 del VPH tipo 18 se une a hDlg con mayor afinidad que la E6 derivada del HPV tipo 16 (77) y por lo tanto, puede degradarla más eficientemente (77), lo cual podría correlacionar con el diferente potencial oncogénico del virus, ya que se ha reportado que los tumores cervicales asociados al VPH-18, son más invasivos y recurrentes que los causados por el VPH-16 (78).

hDlg regula la actividad de la proteína supresora de tumor PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)/MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers)/TEP-1 (TGF $\beta$ -regulated and epithelial cell enriched phosphatase), Las proteínas hDlg incrementan la habilidad de PTEN para suprimir la activación de PKB, probablemente a través del ensamblaje de un complejo multiproteico en la membrana celular (68,79-81). Esta proteína está constituida por un dominio fosfatasa, el cual corresponde al sitio activo y un dominio C2, que se une a los fosfolípidos de membrana (PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub>), en el sustrato para la actividad de esta enzima. En el dominio carboxilo terminal se encuentra el sitio de unión a los dominios PDZ (82).

PTEN es una proteína tirosina fosfatasa, cuyo sustrato principal es el fosfatidilinositol, trifosfato, esta enzima desfosforila en la posición 3 al inositol, bloqueando así la actividad de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI-3K).(83). La enzima PI3K al ser inhibida, detiene la señalización de la vía de la PKB/Akt, (Proteína cinasa B), encargada del control de procesos biológicos como la proliferación, la motilidad celular y la apoptosis (84,85) (Fig.

15). La desregulación tanto de la proteína PI3K como la de PKB ha sido ampliamente documentada en diferentes tipos de cáncer (86)



**Figura 15. Vías de señalización moduladas por la proteína supresora de tumor PTEN.** Las vías de señalización Akt/PKB y ERKs tienen un papel fundamental en efectos biológicos involucrados en el establecimiento del cáncer y PTEN representa uno de sus principales puntos de regulación negativa. Fuente: Lawlor, 2001 (87).

La proteína PTEN, se encuentra frecuentemente mutada en un gran número de cánceres (gliomas, melanomas, próstata, pulmón, cabeza y cuello, mama y endometrio), generalmente en estadios más avanzados (87-89). En contraste, raramente han sido reportadas mutaciones en esta proteína en cáncer de cervix; sin embargo, las pocas mutaciones reportadas, se encuentran significativamente en los estadios más avanzados de esta enfermedad (90). Existen otras evidencias que fundamentan el papel importante de esta proteína en el establecimiento del cáncer: como el hecho de que la sobre-expresión del sitio catalítico de PTEN en cáncer de endometrio, baja la tasa mitótica y la angiogénesis (91,92).

#### 4. Variantes de VPH

La variación en la secuencia en una ó más de las proteínas virales puede alterar su función biológica y afectar el resultado clínico de la infección. La caracterización de la variación en la secuencia nucleotídica dentro de los tipos de VPH representa un acercamiento para la identificación de las variantes, que tienen funciones biológicas diferentes (93).

Las variantes “intra-tipo” se definen como aquellos aislados de VPH que varían en menos del 2% con respecto al tipo viral de referencia en regiones conservadas del genoma (94). Las secuencias de DNA que codifican por dominios conservados en proteínas, permiten comparar a los tipos de VPH y analizar el proceso de especiación, dado que en la taxonomía de los VPH el término “tipo” se considera equivalente al término “especie”. Los estudios de variantes permiten entender parte de la historia evolutiva de los virus de papiloma y resultan ser un modo eficiente de conocer el origen y forma de diseminación de estos virus.

La gran especificidad y diversidad de tipos sugiere que estos virus están muy bien adaptados y que han estado en íntima asociación con su huésped por mucho tiempo. El pequeño grado de variación en regiones geográficas, comparado con la gran diversidad entre regiones, es consistente con la idea de una lenta acumulación de mutaciones en períodos de tiempo muy largos.

A través del análisis de una gran cantidad de aislados de VPH obtenidos de diversas partes del mundo, se han definido cuales son las variantes de los tipos virales más frecuentes; en particular, de VPH-16 (95), VPH-18 (96), VPH-6 y VPH-11 (97), además de otros tipos menos frecuentes (98).

Dada la prevalencia de VPH tipo 16 en lesiones pre-invasivas y carcinomas cervicales, la heterogeneidad intratípica de VPH 16 es la más estudiada. El análisis de la secuencia de LCR, E6, L1 y L2 ha demostrado que las variantes de VPH 16 forman 5 ramas filogenéticas principales, las cuales varían en su distribución geográfica. Estas ramas se han clasificado como: Europea (E), Asiática (As), Asiática-americana (AA), Africana-1

(Af-1), y Africana-2 (Af-2). Se han identificado ramas menores, como la Norteamericana-1 (NA1). Cabe mencionar que el genoma del VPH-16 de referencia es un aislado alemán y es miembro de la rama Europea (95). Estos árboles filogenéticos se basan en la secuencia del LCR del VPH-16.

La diversidad intra-tipo de VPH-18 guarda muchas similitudes con VPH-16. Actualmente se han detectado 3 ramas filogenéticas principales para VPH-18 (Europea, Africana y Asiática/Amerindia) (96). Con estos estudios se ha observado que la diversidad viral no se correlaciona con la ubicación geográfica, sino más bien con la composición étnica de las poblaciones y que la filogenia de las ramas principales de VPH-16 y VPH-18 se asocia con las ramas principales de la evolución de los grupos étnicos humanos (101).

En algunos trabajos se han reportado subtipos de HPV-18 con una oncogenicidad disminuida. Estos se encontraron asociados en un alto porcentaje a NIC (lesión intraepitelial cervical), pero no a los casos de cáncer. (102). En otros trabajos, se han encontrado asociaciones aparentemente exclusivas entre diferentes variantes del HPV-18 y tipos histológicos específicos. Esta asociación sugiere que existen algunos aislados que pueden estar asociados a un comportamiento biológico diferente (101).

Diversas publicaciones han determinado diferencias funcionales en regiones genómicas específicas y se ha especulado que éstas podrían repercutir en el potencial oncogénico de las variantes virales. En el caso de E6, se han identificado variantes (variante Asiático-Amerindia) con mayor capacidad que la de referencia (variante Europea) para suprimir la diferenciación de los queratinocitos en respuesta al suero y calcio (102). Con respecto a la capacidad para degradar a p53, se han encontrado variantes de E6 (variante Af -2 -z84<9), que tienen menor actividad, y que por lo tanto, se ha pensado podrían tener menor capacidad oncogénica (102,103).

Otros estudios se han enfocado en las diferencias de persistencia viral y progresión de las lesiones hacia estadios más avanzados que presentan las variantes virales. Se han identificado variantes de VPH 16 asociadas con persistencia viral y progresión de NIC 2 a

NIC 3 (104,105). Por otro lado, un cambio de un nucleótido resulta en un cambio del aminoácido leucina a valina (L83V). Este cambio estuvo presente en variantes tanto de la rama Europea como Asiática–Americana (104) y esta variante estuvo más asociada con carcinoma invasor que con NIC en una población de mujeres suecas (105).

En otro estudio realizado por M. Grodzki y col, un grupo de pacientes francesas con la variante de E6–350G de VPH 16 mostraron riesgo de progresión a lesiones de alto grado 4 veces mayor que aquellas con la variante prototipo, es decir, E6 – 350T (106).

Se han encontrado también diferencias en los mecanismos de procesamiento alternativo entre variantes virales del HPV-18, para el producto del gen E6. La variante Af presentó en mayor proporción el transcrito de E6 que corresponde a una proteína pequeña llamada E6\*1, mientras que el transcrito de E6 de tamaño completo se halló en mayor proporción para la variante AsAi. Esto indica que las variantes AsAi y Af podrían diferir en su potencial oncogénico al poseer proteínas E6 con propiedades biológicas diferentes (107). Todos estos estudios, proponen diferencias funcionales entre las variantes de E6.

## JUSTIFICACIÓN

En países en vías de desarrollo como el nuestro el CaCU representa un problema de salud pública. Se sabe que el principal factor de riesgo para el desarrollo de CaCU es la infección persistente por el VPH de alto riesgo, sólo una pequeña proporción de las lesiones cervicales infectadas con el virus de alto riesgo avanzan a cáncer, lo cual indica la necesidad de factores adicionales para la génesis del tumor. El mejor entendimiento de los eventos moleculares que ocurren en las fases tempranas del establecimiento y progresión de la infección redundará en la posibilidad de lograr a largo plazo un tratamiento más eficiente.

Se sabe que la expresión de la oncoproteína E6 es uno de los eventos tempranos más importantes en la historia natural de la infección por VPH, y dada la importancia de las variantes virales como un factor de riesgo diferencial para el desarrollo del CaCU, resulta importante comprender los mecanismos implicados en la activación de las vías de señalización desencadenadas por E6 de las variantes del VPH-18, mecanismos que hasta el momento no se han descrito claramente y aún es más importante lograr correlacionar la activación de estas vías con efectos biológicos implicados en el establecimiento del cáncer: Por todo esto el objetivo de este trabajo es determinar la participación de la oncoproteína E6 de las variantes del VPH-18 en las vías de señalización de Akt/PKB y MAPKs ambas implicadas en procesos carcinogénicos.

Por otro lado, este trabajo no solo nos permitirá conjuntar la información necesaria para dilucidar una de las vías de señalización de la oncoproteína E6, sino que además permitirá entender mejor el comportamiento biológico de algunas variantes virales del HPV-18 que pudiera estar relacionado con una capacidad oncogénica diferencial.

**HIPÓTESIS**

Se sabe que la proteína E6 del VPH-18 se une y degrada a la proteína hDlg, por lo tanto, esto resultará en una desregulación de algunos componentes de la vía de señalización de Akt/PKB como: las proteínas PI3K, PTEN y PKB implicando cambios en la proliferación celular.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la participación de la oncoproteína E6 de los diferentes aislados del VPH-18 en la vía de señalización Akt/PKB y MAPKs, así como su repercusión en la proliferación celular.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Cuantificar la expresión y la actividad de las proteínas hDlg y PTEN, en las líneas celulares MCF-7 y C33-A transfectadas con vectores de expresión que contienen al gen E6 de las variantes del VPH-18.
- Evaluar la unión de la proteína hDlg con PTEN en células MCF-7 transfectadas con los diferentes aislados de E6 del VPH-18.
- Evaluar la actividad y la expresión de proteínas involucradas en la vía Akt/PKB y MAPKs, en las líneas celulares transfectadas con las variantes de la proteína E6 del HPV-18.
- Determinar la participación específica de la oncoproteína E6 de las variantes del VPH-18 en la expresión de las proteínas hDlg, PI3K, PTEN, PKB y MAPKs.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### I. Cultivo Celular

Se utilizaron líneas celulares MCF-7 y C33-A (adenocarcinoma de mama y carcinoma de cérvix, respectivamente). Ambas líneas son negativas para DNA y RNA del VPH, sin embargo, en el caso de C33-A tiene a p53 mutado en el codón 273. En este trabajo, se emplearon otras líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix como: Siha, Caski (contiene el genoma del VPH-16) Calo y HeLa (con el genoma del VPH-18). Finalmente como control de células normales se utilizó la línea celular HaCaT (queratinocitos humanos normales). Estas líneas celulares, se crecieron en medio de cultivo (DMEM, GIBCO, BRL, Gaithersburg, MD, USA), suplementado con 8% de Suero Bovino Fetal (SBF, GIBCO, BRL, Gaithersburg, MD, USA). Los cultivos celulares se mantuvieron en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> y a una temperatura de 37°C.

### 2. Transfección Celular

Las líneas celulares MCF-7 y C33-A se transfectaron con plásmidos de expresión que contienen un fragmento de DNA de 495 pb (de los nucleótidos 105 al 581) del gen de la oncoproteína E6 de referencia (AsAi) y sus variantes (E y Af). Las secuencias de estos aislados, fueron clonados en el vector de expresión pcDNA 3.1(invitrogene). El vector pcDNA contiene un promotor de citomegalovirus y genes de resistencia a geneticina para la selección estable.

La secuenciación de los genes clonados se realizó por medio del ensayo de secuenciación Termosequenase y en un secuenciador automático. Una vez secuenciados los plásmidos con los genes de E6 de referencia y sus respectivas variantes, se transfectaron en las líneas celulares con el empleo de liposomas (Lipofectina. Como control positivo de la transfección se usó la proteína verde fluorescente “GFP”, cuya fluorescencia en la célula transfectada puede observarse en microscopio de fluorescencia.

### **2.1. Extracción de RNA y ensayos de expresión**

Con el fin de determinar si los genes de E6 se expresaban en las líneas celulares transfectadas, se extrajo el RNA total de las células mediante el empleo de Trizol (Invitrogen Life Technologies). Las muestras de RNA se trataron con DNasa libre de RNasa para remover restos de DNA celular. La concentración del RNA se determinó mediante espectrofotometría. La calidad del RNA se verificó por electroforesis en geles de agarosa con tinción de bromuro de etidio. Se utilizaron 2 µg de RNA total para transcripción inversa a DNAc, usando hexameros de oligonucleótidos aleatorios con el sistema de síntesis de la primera cadena para RT-PCR: Superscript (Invitrogen Life Technologies). El DNAc se amplificó con oligonucleótidos específicos para el gen E6 del VPH-18.

### **3. Modificación del DNA con bisulfito de sodio**

El tratamiento del DNA genómico con bisulfito de sodio, tiene por finalidad convertir las citocinas no metiladas en uracilo, las que serán convertidas a timina durante la reacción de cadena de la polimerasa (PCR). Usando iniciadores específicos para secuencias metiladas (M) y no metiladas (U), es posible discriminar entre citosinas metiladas y no metiladas en las diferentes muestras analizadas.

El estado de metilación del promotor del gen PTEN fue determinado en las líneas celulares Caski, HeLa, SiHa, y MCF7, por el método de modificación del DNA con bisulfito de sodio y posteriormente se realizó el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica para metilación, como lo describe Herman (1992) (108) Brevemente se diluyó 1 µg de DNA genómico en 100 µl de agua, y se desnaturizó durante 20 min, con NaOH 2M a 42 °C.

Posteriormente el DNA fue incubado en la oscuridad durante 13 h a 55 °C en una mezcla de reacción que contenía 30 µl de hidroquinona 10 mM y 520 µl de bisulfito de sodio 3 mM pH 5,0. El DNA modificado fue purificado en una resina Wizard (Promega, ), se desnaturizó con 5 µl de NaOH 3M durante 5 min a 37° C, inmediatamente se neutralizó y se precipitó con 5 µl de acetato de amonio 3M y 500 µl de etanol absoluto durante 2 h a -20 °C. Finalmente se

centrifugó 30 min a 13 000 rpm, se lavó con etanol al 70 %, se secó por vacío, y se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasa, conservándose a -20 °C.

### 3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica para metilación:

El DNA modificado por bisulfito fue sometido a reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica para metilación. La mezcla de la reacción contenía 100 ng de DNA modificado, 2 µl de buffer 10X, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µL de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) (10 pM), 0,2 µl de cada iniciador de la reacción para PTEN desmetilado (UM) y PTEN metilado (M), cuya secuencias se indican en el cuadro 3 y 0,1 µl de la enzima DNA polimerasa *TaqGold* (1 units; Applied Biosystems), para un volumen final de reacción de 20 µl. Como control positivo de metilación se utilizó DNA genómico metilado de linfocitos.

**Cuadro 3. Secuencias de los iniciadores de la reacción empleados para determinar el estado de metilación del promotor de PTEN.** Fuente: Zysman, 2002 (109)

Iniciadores de la reacción	Secuencias
PTEN Metilado	5'TTTTTTCGGTTTTTCGAGGC3' (sense), 5'CAATCGCGTCCCAACGCCG 3'(antisense)
PTEN No metilado	5'TTTTGAGGTGTTTGGGTTTTTGGT3' (sense), 5'CACAATCACATCCCAACACCA 3' (antisense)

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial 94 °C durante 10 min, seguido por 35 ciclos de amplificación (40 s a 94 °C, 40 s a 58 °C y 40 s a 72 °C), y una elongación final de 7 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2%.

Para corroborar el papel de la metilación en la expresión de PTEN, los niveles de esta proteína fueron analizados en las líneas Caski, HeLa, SiHa, y MCF7, comparando a las células tratadas y no tratadas con un agente desmetilante. Las células se sembraron en placas de 6/pozos a una

densidad de  $1 \times 10^6$  cel/pozo en DMEM-F12 y después de 24 h, estimuladas con 5-Aza-2'-deoxicitidina al  $0.75 \mu\text{M}$  por 48 h. Los lisados de estas células fueron analizados por western blot con un anticuerpo específico para PTEN.

#### 4. Análisis tipo western blot.

Para determinar si existe una presencia diferencial de las proteínas involucradas en la vía de PKB/akt y MAPKs en las células MCF-7 y C-33A transfectadas con la proteína E6 de las variantes del HPV-18, las células se sembraron en cajas de  $25 \text{ cm}^2$  a una densidad de  $1 \times 10^6$ , en DMEM al 8% SBF durante 48 hr, hasta alcanzar un 75% de confluencia. Al término del experimento la monocapa celular, se lavó con un buffer de fosfatos (PBS pH=7.4) y se agregaron  $500 \mu\text{l}$  de una solución de lisis (RIPA, 3 mM tris pH 8, 50 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1% aprotinina 1mM PMSF). El lisado celular se pasó varias veces por una jeringa de insulina y se centrifugó a  $10\,000 \text{ xg}$ , 10 min a  $4^\circ\text{C}$ .

La cuantificación de las proteínas totales se realizó mediante el método de Bradford (110), el cual se basa en el uso del colorante azul brillante de coomasie G-250 (CB G-250, BioRAD, México). Este colorante reacciona con las proteínas formando un complejo estable que tiene una absorbancia máxima a 595 nm.

Las proteínas se separaron en geles de acrilamida-SDS a una concentración de 9 al 12%, dependiendo del tamaño de la proteína y se electro-transfirió (60 min a 200 mA) a membranas de nylon-nitrocelulosa (Hybond-C Amersham, LIFE Science, Chalfont, Buckinghamshire, England). La eficiencia de la transferencia se comprobó por la tinción del gel con una mezcla de azul de coomasie R-250 (0.1% p/v metanol, 50% v/v metanol y ácido acético). Posteriormente se bloquearan los sitios no específicos de la membrana con una solución bloqueadora, para detectar a las proteínas, se emplearon anticuerpos específicos (hDIg, PTEN, pPTEN, PI3K, pPI3K, Akt/PKB, pAkt, Actina, ERK1/2 and peras) (Santa Cruz Biotechnology, California. CA). Las membranas se incubaron 24 hrs a  $4^\circ\text{C}$  con cada anticuerpo.

Para la detección del complejo antígeno-anticuerpo, se empleó una reacción de quimioluminiscencia (Amersham, LIFE Science, Chalfont, Buckinghamshire, England). Dicho sistema emplea luminol, compuesto que se oxida en presencia del anticuerpo secundario, que se encuentra conjugado con peroxidasa. La presencia del peróxido de hidrógeno genera la emisión de luz. La membrana previamente incubada con el anticuerpo secundario, se incubó por 1 min con luminol y la emisión de luz se detectó, exponiendo la membrana a placas de rayos X (Hyper film ECL, Amersham, LIFE Science, Chalfont, Buckinghamshire, England).

Los experimentos se repetirón por triplicado y el control negativo correspondió a las células MCF-7 sin el genoma de E6 del HPV-18 y las transfectadas unicamente con el vector, mientras que como control positivo se empleó la línea celular HeLa.

### **5. Ensayos de unión proteína-proteína (Inmunoprecipitación)**

Las células MCF-7 transfectadas con las variantes de E6 o el vector vacío, fueron lavadas dos veces con PBS frío y lisadas con buffer RIPA. Los lisados celulares fueron pre-inmunoprecipitados con 2 µg de anticuerpo anti-ratón embebido en agarosa por 2 h (Santa Cruz Biotechnology, CA. USA). Los anticuerpos: anti-PTEN, anti-hDIg o anti-borrego (control), a una concentración final de 20 µg fueron incubados por 2h a 4°C, con 40 µl de perlas de Proteína G-Agarosa (Santa Cruz Biotechnology, CA. USA). 100 µl del lisado celular (500 µg/ml) fueron incubados con el complejo anticuerpo-proteína G, durante toda la noche a 4°C. posteriormente, el complejo fue lavado dos veces con buffer de lisis, centrifugado por 2 min a 12 000 rpm y resuspendido en 50 µl de buffer de carga (Tris 2M pH=6.8, SDS 2.5%, β-mercaptoetanol al 10%, glicerol al 20% y azul de bromofenol) 10 µl de la mezcla, fueron sometidos a un análisis por western blot con los anticuerpos anti-hDIg o PTEN.

### **6. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo**

Para poder analizar el ciclo celular se empleó la técnica basada en detergente y enzima proteolítica, la cual consiste en aislar y teñir núcleos (DNA) con el colorante yoduro de propidio, esta técnica fue descrita por Vindelov en 1994 (111).

Para esta técnica, se sembraron  $2 \times 10^5$  células (MCF-7 y C-33A) transfectadas con las variantes de la oncoproteína E6 en placas de 6 pozos, después de 24 h de cultivo se retiró el medio con suero y se agregó medio sin suero por 24 h, 48 y 72 h las células son cosechadas con tripsina y recuperadas mediante centrifugación (1500 rpm). Posteriormente se determinó la cantidad de DNA nuclear de las diferentes líneas celulares: La monocapa celular fue lavada con PBS en dos ocasiones y se le agregaron 100  $\mu$ l de la solución A (citrato de sodio 3.4 mM, 500  $\mu$ l, Nonidet P-40, tetracloruro de espermita 1.5 mM y tris 0.5 mM, a 100 ml de esta solución concentrada se agregaron 30 mg de tripsina y se ajustó a pH=7.6) e incubó 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 100  $\mu$ l de la solución B (a 100 ml de la solución concentrada se agregan 50 mg de inhibidor de tripsina, 10 mg de Ribonucleasa y ajustar a pH=7.6) y se incubaron 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 500  $\mu$ l de la solución C (a 100 ml de la solución concentrada agregar 41.6 mg de yoduro de propidio), se incubó por 10 min en hielo.

El contenido de DNA nuclear fue evaluado en un Facsorter (Becton Dickinson), con el programa CellQuest. Cada experimento se realizó por duplicado, teniendo como control las células MCF-7 sin transfectar y las transfectadas solamente con el vector (pcDNA). Los resultados se expresaron como el promedio del porcentaje de células en fase S.

### **7. Síntesis de RNAs de interferencia (siRNAs) contra E6 and hDlg**

La introducción de RNA de doble cadena (dsRNA) en una célula inicia una compleja cascada de eventos, los cuales culminan con la degradación del mRNA de secuencia homóloga al dsRNA originalmente introducido (112). Utilizando este principio natural, se construyeron los siRNA, contra las proteínas E6 del HPV-18 y hDlg, para determinar la participación específica de estas proteínas en las vías de señalización Akt y MAPKs. Para la síntesis de estos siRNAs, se utilizó el ensayo de The Silencer siRNA Construction Kit (Ambion, The RNA Company). Los oligonucleótidos empleados se muestran en la cuadro 4.

**Cuadro 4. Secuencias de iniciadores de la reacción para la síntesis de siRNAs contra las proteínas E6 HPV-18 y hDlg.**

siRNA	Secuencia de oligonucleótidos	Referencia
E6 HPV-18	5'-GAG GTA TTT GAA TTT GCA TTT CCT GTC TC-3' (antisense). 5'- ATG CAA ATT CAA ATA CCT CTT CCT GTC TC-3' (sense).	Yamato et al., 2006 (113)
E6 HPV-16	5'-GAA TGT GTG TAC TGC AAG CTT CCT GTC TC-3' (antisense), 5'-GCT TGC AGT ACA CAC ATT CTT CCT GTC TC-3' (sense)	Jeong et al., 2007 (114)
hDlg	5' - AAA TTC TCA ATC TCT GAT AAG CCT GTC TC- 3'(antisense) 5'- AAC TTA TCA GAG ATT GAG AAT CCT GTC TC-3' (sense)	Laprise, 2004 (115)

El primer paso en la síntesis de los siRNAs, es la hibridación de los 200  $\mu$ M de cada uno de los iniciadores con la secuencia de iniciación del promotor de la T7 RNA polimerasa en presencia de 6  $\mu$ l buffer de hibridación, la mezcla se incubó a 70°C por 5 min. A partir de estos oligonucleótidos hibridados, se realizó la síntesis de los iniciadores de cada uno de los siRNAs, con el empleo de la enzima Exo-Klenow (Ambion Inc, The RNA Company) y una mezcla de dNTPs, esta mezcla se mantuvo a 37°C por 30 min.

Para eliminar una posible competencia entre los iniciadores para su transcripción se realizó la síntesis de cada una de las hebras (sentido y antisentido) de los siRNAs por separado, empleando la enzima T7, durante 2 h a 37°C. Al término de este tiempo, las dos reacciones (sentido y antisentido) se mezclaron y se incubaron toda la noche a 37°C.

Los siRNAs sintetizados *in vitro* poseen una secuencia en el extremo 5' que tienen que ser removidas antes de que éstos sean transfectados a las células, para la digestión de esta secuencia se utilizó una ribonucleasa, en la misma reacción el iniciador de DNA es eliminado con la digestión con DNasa. Finalmente el siRNA es purificado con el empleo de una columna y cuantificado por espectrofotometría para su transfección.

### **7.1. Transfección del siRNA**

Las líneas celulares HeLa y MCF-7, fueron sembradas a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/pozos y transfectadas a una concentración de 100 nM de cada uno de los siRNA (HPV-18, HPV16-E6 o hDlg). La transfección se realizó en placas de 6 pozos, con el empleo de liposomas (Lipofectamine Plus, Gibco-BRL). Después de 48 h, las células fueron procesadas para obtener RNA y proteína. La inhibición de los niveles y la expresión de las proteínas se evaluó mediante ensayos de western blot, mientras que la expresión de E6 se cuantificó mediante ensayos de RT-PCR.

### **8. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico, se empleó la prueba paramétrica de t de "Student" tomando una  $p < 0.05$  como significativa.



## RESULTADOS

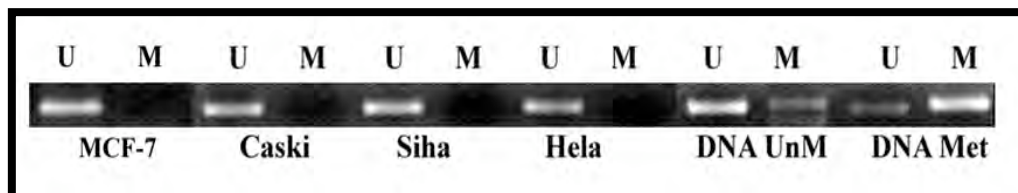
### I. La actividad de PTEN no se regula por la metilación de su promotor.

PTEN es una proteína supresora de tumor que posee altas tasas de mutación en distintos tipos de cáncer (87,88). Por otro lado, en cáncer cérvico uterino se ha detectado sólo un bajo porcentaje de mutaciones en este gen. Por otra parte, si se ha reportado una disminución en la actividad y la expresión de esta proteína (116,117).

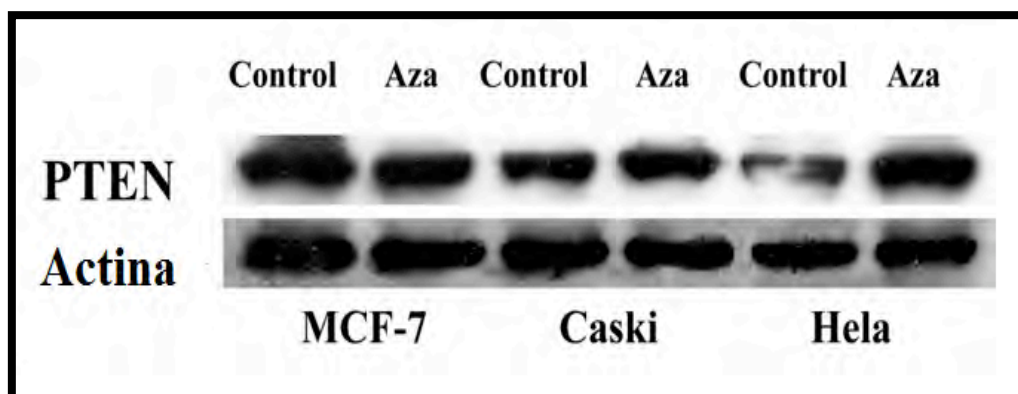
En la literatura se ha propuesto que la actividad de PTEN en algunos tipos de cáncer podría regularse por mecanismos epigenéticos, ya que el promotor del gen de esta proteína se ha visto metilado, sin embargo esta información resulta controversial, Zisman et al. (2002) (109) propone que existen pseudogenes de PTEN que poseen una alta homología con el promotor de esta proteína, tal es el caso de *psiPTEN* que serían los que realmente estarían siendo detectados como metilados. Para corroborar si la metilación representa un mecanismo importante en la regulación de la actividad de PTEN en cáncer de cervix, se realizaron ensayos de MSP, empleado los iniciadores específicos propuestos por Zisman para amplificar la región 5' del promotor de PTEN, dentro de esta región se encuentran las secuencias que diferencian a esta proteína de los pseudogenes (109)

En la figura 16A, se muestra que en ninguna de las líneas celulares de cáncer de cervix ni en MCF-7, la región amplificada del promotor se encontró metilada, a diferencia del control positivo (DNA de linfocitos metilado *in vitro*) en el cual se observan niveles elevados de metilación. Para confirmar los resultados anteriores, las células fueron tratadas con 5-Aza-2'-deoxicitidina un agente desmetilante de DNA, ningún cambio significativo se encontró en los niveles de expresión de PTEN (Fig. 16B). Con estos resultados se logró determinar que la metilación de esta región del promotor de PTEN, no regula la expresión de esta proteína en estas líneas celulares.

A)



B)



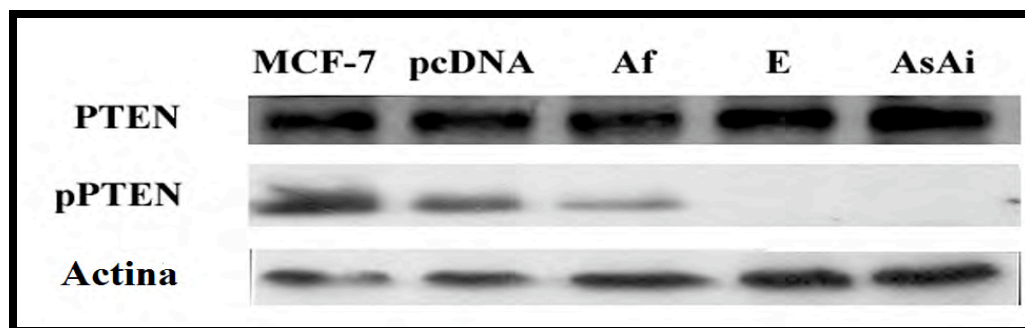
**Figura 16. El promotor de PTEN no está metilado en líneas celulares de cáncer de cervix.**

A) El nivel de metilación del promotor de PTEN fue determinado mediante el ensayo de MSP en células MCF-7, Caski, SiHa y HeLa. El DNA modificado por bisulfito fue amplificado por PCR con iniciadores específicos para DNA metilado (M) o no metilado (U). DNA de linfocitos metilado (Met) y no metilado (UnM) *in vitro*, fue usado como control- B) El tratamiento con 5-Aza-2'-deoxicitidina no modifica la expresión de PTEN. Las células fueron tratadas con este agente desmetilante a una concentración 0.75 mM por 48 h y sometidas al análisis por western blot. El control corresponde a las mismas células, pero sin tratamiento.

## **2. La oncoproteína E6 de las variantes del VPH-18 regula la actividad de PTEN mediante su unión con hDlg .**

Otro mecanismo que podría estar involucrado en la regulación de la actividad de PTEN, es la estabilización de esta proteína por hDlg, este mecanismo ya ha sido propuesto para otras proteínas miembros de la familia MAGUK (79-81). Se sabe que las oncoproteínas E6 de los HPV de alto riesgo, se unen a hDlg y promueven su degradación. Debido a lo anterior, se determinó la posible participación de E6 del HPV-18 en células MCF-7 transfectadas con las variantes de E6 (AsAi, Af y E) en la modulación de la actividad de PTEN, para lo cual, se realizaron ensayos de western blot con anticuerpos específicos, que nos permitieron evaluar los niveles totales de la proteína total y la activada (pPTEN).

Como se puede observar en la figura 17, los niveles totales de PTEN en las células transfectadas con las distintas variantes de E6, fueron diferentes. Sin embargo, se detectaron cambios significativos en los niveles de la proteína fosforilada (pPTEN) en estas mismas células. La fosforilación en esta proteína está directamente relacionada con su actividad, por lo tanto, los resultados muestran claramente una mayor actividad de PTEN en las células no transfectadas con respecto a las que poseen las secuencias de E6. A su vez, los niveles de actividad de PTEN fueron mayores en las células transfectadas con la variante Af, que en las que tenían los aislados AsAi y E.



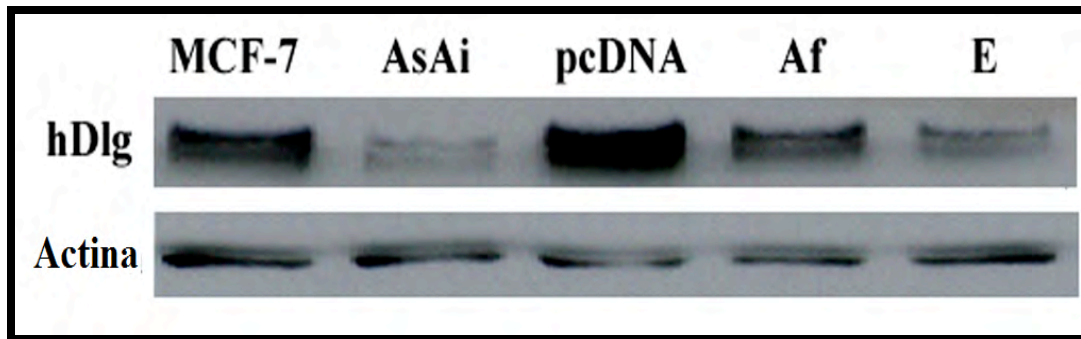
**Figura 17. Los niveles de pPTEN disminuyen en las células transfectadas con las variantes de E6 del HPV-18.** Los niveles de PTEN fueron analizados con ensayos de western blot en lisados de MCF-7 con las variantes de E6 HPV18 y con el vector vacío (pcDNA). Esto se realizó con anticuerpos anti-PTEN y anti-PTEN fosforilado (pPTEN). Como control de carga se empleó la actina.

Debido a que la unión directa entre E6 y PTEN no ha sido demostrada hasta ahora, los cambios encontrados en la proteína PTEN fosforilada en las células transfectadas con E6 y sus variantes podrían estar mediada por la unión entre E6 y hDlg. Para comprobar lo anterior, se analizaron mediante ensayos de western blot los niveles de esta proteína, en células MCF-7 y transfectadas con las variantes.

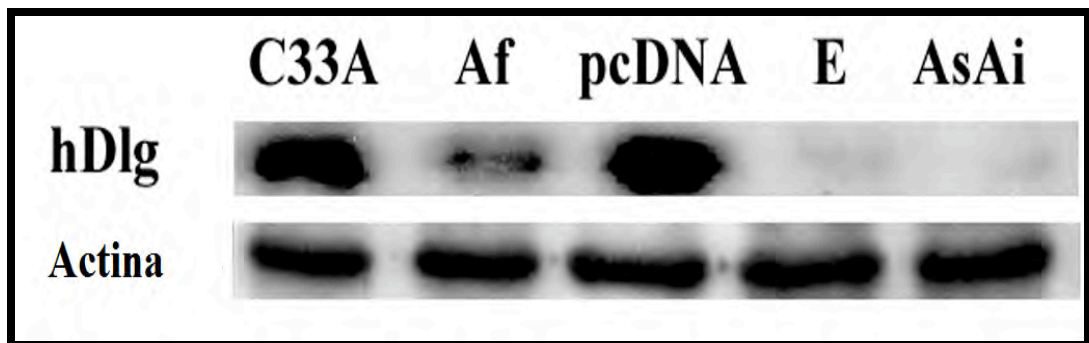
Estos ensayos mostraron que las células MCF-7 transfectadas con el vector vacío poseen mayores niveles de expresión de hDlg, comparadas con las células que contienen las variantes de E6, esto comprueba la capacidad de E6 para inducir la degradación de hDlg. Con respecto a las células transfectadas, las que tenían el aislado de E6-Af, mostraron mayores niveles de hDlg, con respecto a las células MCF-7 con E6-AsAi y E6-E (Fig. 18A). Esto correlaciona directamente con los niveles de actividad de PTEN evaluados anteriormente en estas mismas células (Fig. 17).

Para establecer si el efecto sobre la expresión de hDlg era independiente de la acción de E6 sobre p53, la actividad de hDlg se determinó también en la línea C33-A que tienen a p53 mutado, a diferencia de MCF-7 en donde esta proteína se encuentra en su estado silvestre. Los resultados fueron similares a los encontrados en la línea celular MCF-7 (Fig. 18B).

A)



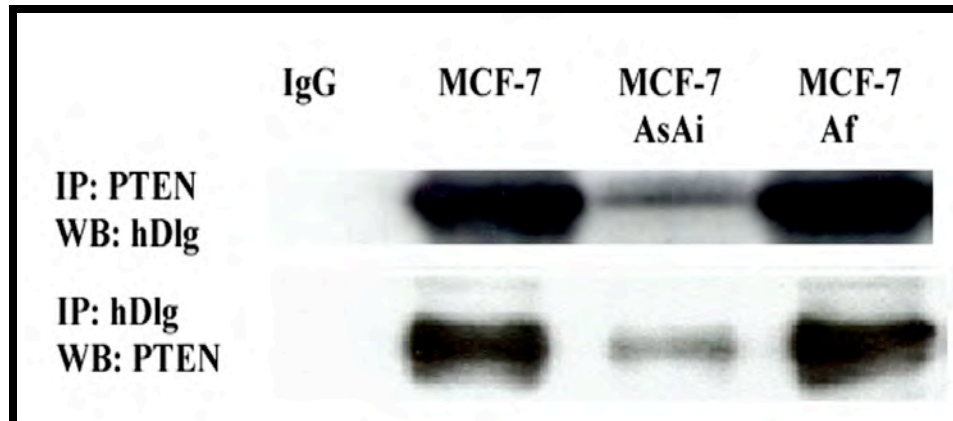
B)



**Figura 18. La expresión de las variantes de E6 del HPV-18 se asocia con niveles diferentes de hDlg.** Se realizaron ensayos de western blot con anticuerpo anti-hDlg en células MCF-7 (A) y C33-A (B) transfectadas con E6 y sus variantes (AsAi, Af y E).

La interacción entre hDlg y PTEN ha sido demostrada en otros sistemas (79), sin embargo, con el objetivo de determinar si en este sistema se lleva a cabo esta unión, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación, éstos demostraron la capacidad de ambas proteínas para unirse *in vitro*. Una menor cantidad del complejo hDlg/PTEN fue observada en las células con E6-AsAi (Fig. 19). Esta diferencia podría deberse a los bajos niveles de hDlg presentes en estas células (Fig. 18A).

Estos resultados sugieren, la posible participación de la oncoproteína E6 del VPH-18 en la regulación de la actividad de PTEN mediada por la degradación de hDlg.

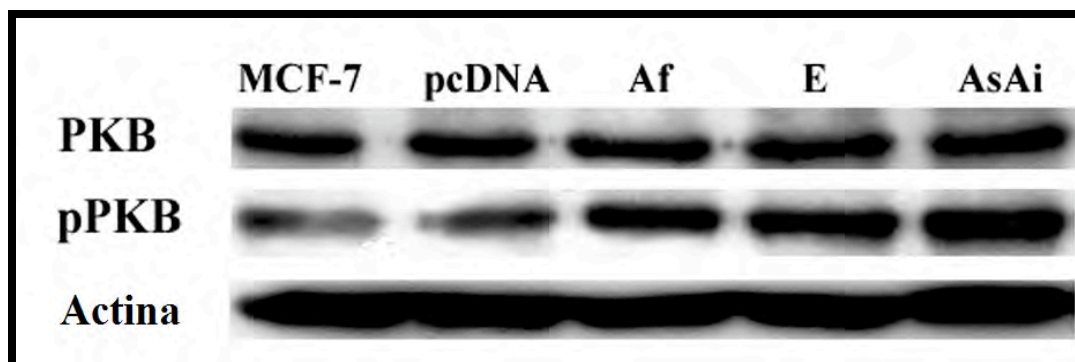


**Figura 19. hDlg y PTEN interaccionan en la línea celular MCF-7.** Los lisados de células sin transfectar o transfectadas con E-AsAi o E6-Af fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-PTEN o anti-hDlg. Los complejos fueron analizados por western blot con anti-hDlg o anti-PTEN respectivamente. Como control se emplearon lisados pre-inmunizados.

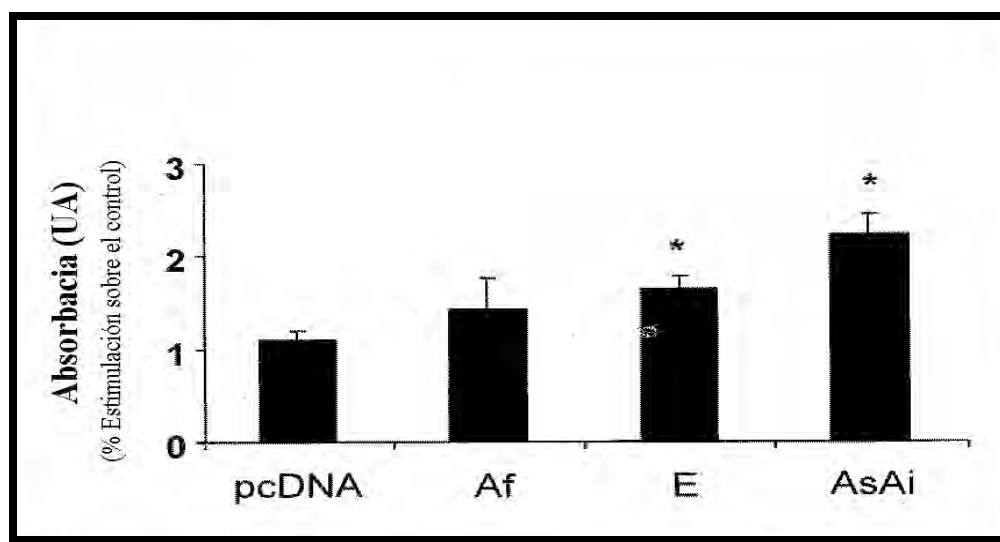
### **3. Las variantes de la proteína E6 del VPH-18 inducen aumento en la actividad de la vía de PI3K/Akt.**

Debido al importante papel de PTEN como regulador negativo de la vía PI3K/Akt (82), lo siguiente fue determinar si las diferencias observadas en la fosforilación de PTEN en las células transfectadas con los diferentes aislados de E6 repercutían en la actividad de la proteína PKB. Se realizaron ensayos de western blot con anticuerpos específicos para PKB total y para PKB fosforilada (pPKB). Los resultados mostraron que los niveles de PKB totales permanecen constantes, mientras que un aumento significativo ( $p < 0.001$ , t de "Student") se observó en los niveles de pPKB en las células transfectadas (Fig. 20A y 20B). Con respecto a las variantes, las células con el aislado AsAi y E presentaron mayores niveles de pPKB (Fig. 20A y 20B). Los niveles de pPKB en las células E6-Af fue menor, correlacionando con los mayores niveles de pPTEN y hDIg determinados previamente (Fig. 17 y 18A).

A)



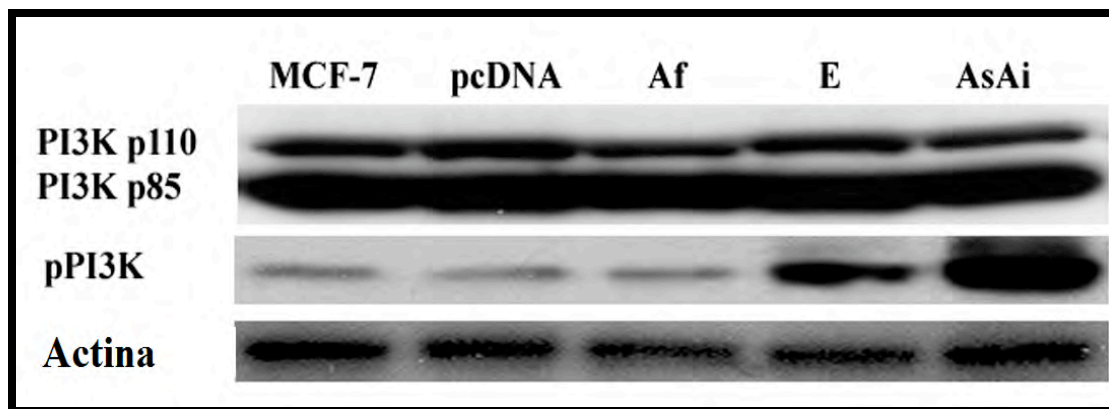
B)



**Figura 20. La expresión de las variantes de E6 correlaciona con niveles diferenciales de pPKB.** A) Análisis de la expresión de PKB. Los niveles de PKB total y pPKB fueron evaluados en las células MCF-7 transfectadas con las variantes (Af, E y AsAi), o el vector vacío (pcDNA), mediante ensayos de western blot con anticuerpos específicos. Como control de carga, se empleó el anticuerpo anti-actina. B) Análisis densitométrico de la expresión de pPKB. Este análisis se realizó con el programa NIH IMAGEN versión 1.62, la gráfica contiene el promedio de tres experimentos por separado  $\pm$  DS. Los resultados se expresaron como % de estimulación sobre el control (células MCF-7 transfectadas con el vector sólo). El asterisco (\*) indica diferencia significativa ( $p < 0.001$ , t de "Student") entre las células transfectadas con el vector sólo (pcDNA) y las transfectadas con los aislados AsAi y E.



Debido al importante papel de PI3K en la regulación de la vía de PKB, se analizaron los niveles de esta proteína, tanto totales como los de PI3K fosforilado (pPI3K) (Fig. 21). Los niveles totales de esta proteína permanecen constantes entre las células transfectadas y no transfectadas. Con respecto a los niveles de pPI3K fue muy evidente un incremento de esta proteína en las células transfectadas con los aislados AsAi y E, en contraste con las MCF-7 con la variante Africana en la que se observó una muy baja actividad de PI3K:



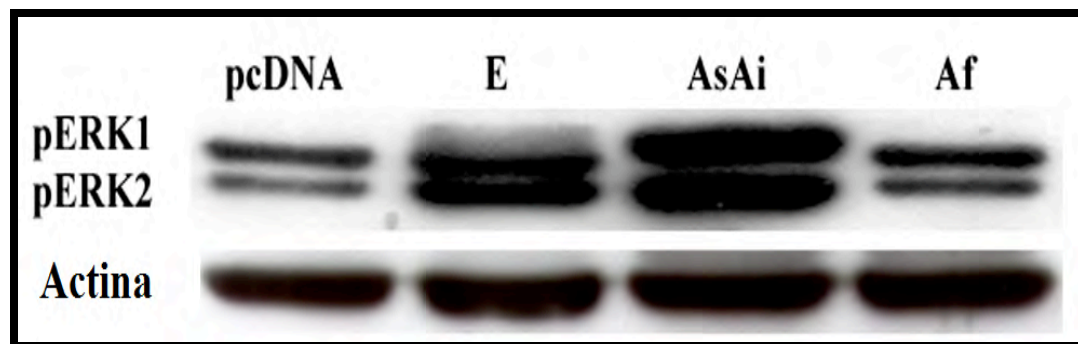
**Figura 21. La expresión de las variantes de E6 correlaciona con los niveles diferente de pPI3K.** Se analizaron por western blot los niveles de la proteína PI3K, en las células transfectadas con el vector vacío (pcDNA) y las variantes (AsAi, Af y E). Se emplearon dos anticuerpos: en el panel superior se utilizó un anti-PI3K que identifica a proteína total. En el panel inferior, se empleó un anticuerpo que reconoce a la subunidad p85 activa (pPI3K).

#### **4.- La oncoproteína E6 del VPH-18 induce un aumento en la activación de las MAPKs mediante la activación de la proteína PI3K**

La oncoproteína E6 del VPH-18 es capaz de activar a PI3K en gran proporción. Sin embargo, aún cuando PI3K es el regulador positivo más importante para la vía de PKB, los cambios significativos encontrados en la activación de la proteína PI3K en las células transfectadas con los aislados AsAi y E no se vieron proporcionalmente reflejados en la actividad de la proteína PKB (Fig. 19A, 19B y 20). Se sabe que PI3K participa en un sin número de actividades biológicas, tales como la quimiotaxis y la proliferación celular (118), y por lo tanto, participa en otras vías de señalización, además de la vía de PKB.

Debido a lo anterior, se analizó si otros blancos celulares de la proteína PI3K como son las MAPKs (ERK1 y ERK2) (119;120), se encontraban afectados por esta actividad diferencial de

PI3K encontrada en las células transfectadas con las variantes de E6 (Fig. 21). Como se observa en la Figura 22, las células con E6 AsAi y E muestran una evidente elevación en los niveles tanto de ERK1 como de ERK2 fosforiladas (pERK1 y pERK2) en relación a lo observado en las células con E6-Af y el vector vacío. Esto pudiera ser un reflejo del efecto del aumento de la forma activa de PI3K.



**Figura 22. La expresión de la variante AsAi de la oncoproteína E6 se asocia con una mayor actividad de las MAPKs.** Se realizaron ensayos de western blot, para evaluar los niveles de las MAPKs, en las células transfectadas con el vector vacío (pcDNA) y las variantes (AsAi, Af y E). Se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce a las proteínas ERK1 y ERK2 fosforiladas (pERK1 y pERK2). En el panel inferior se empleó como en todos los casos un anticuerpo anti-actina como control de carga de las proteínas.

Finalmente se determinó a través de ensayos de citometría de flujo, si las diferencias encontradas hasta el momento en la activación de las proteínas involucradas en las vías de señalización de PKB y MAPKs podrían estar relacionadas con efectos biológicos como la proliferación celular.

Diferencias significativas en la proliferación celular fueron encontradas en las células transfectadas con las variantes de E6 del HPV-18 (Fig.23). Los índices de proliferación celular (evaluados como número de células en fase S), fueron mayores en las células transfectadas con E6 que en las células no transfectadas ( $p < 0.05$ ). Cambios significativos, también se observaron entre las células transfectadas con las distintas variantes de E6 ( $p < 0.05$ ) (cuadro 5 y Fig.23).

Las células transfectadas con E6-Af, presentaron menores niveles de proliferación ( $25.1\% \pm 5.89\%$  de células en fase S), por lo anterior, las células con el aislado de E6-AsAi y E6-E, tuvieron índices mayores de proliferación celular ( $83.89 \pm 12.3\%$  y  $69\% \pm 10.46\%$  de células en fase S, respectivamente) (Cuadro 5 y Fig.23). Estos resultados en proliferación correlacionan con el aumento en la activación de las proteínas pPI3K y MAPKs (Fig. 21y 22).

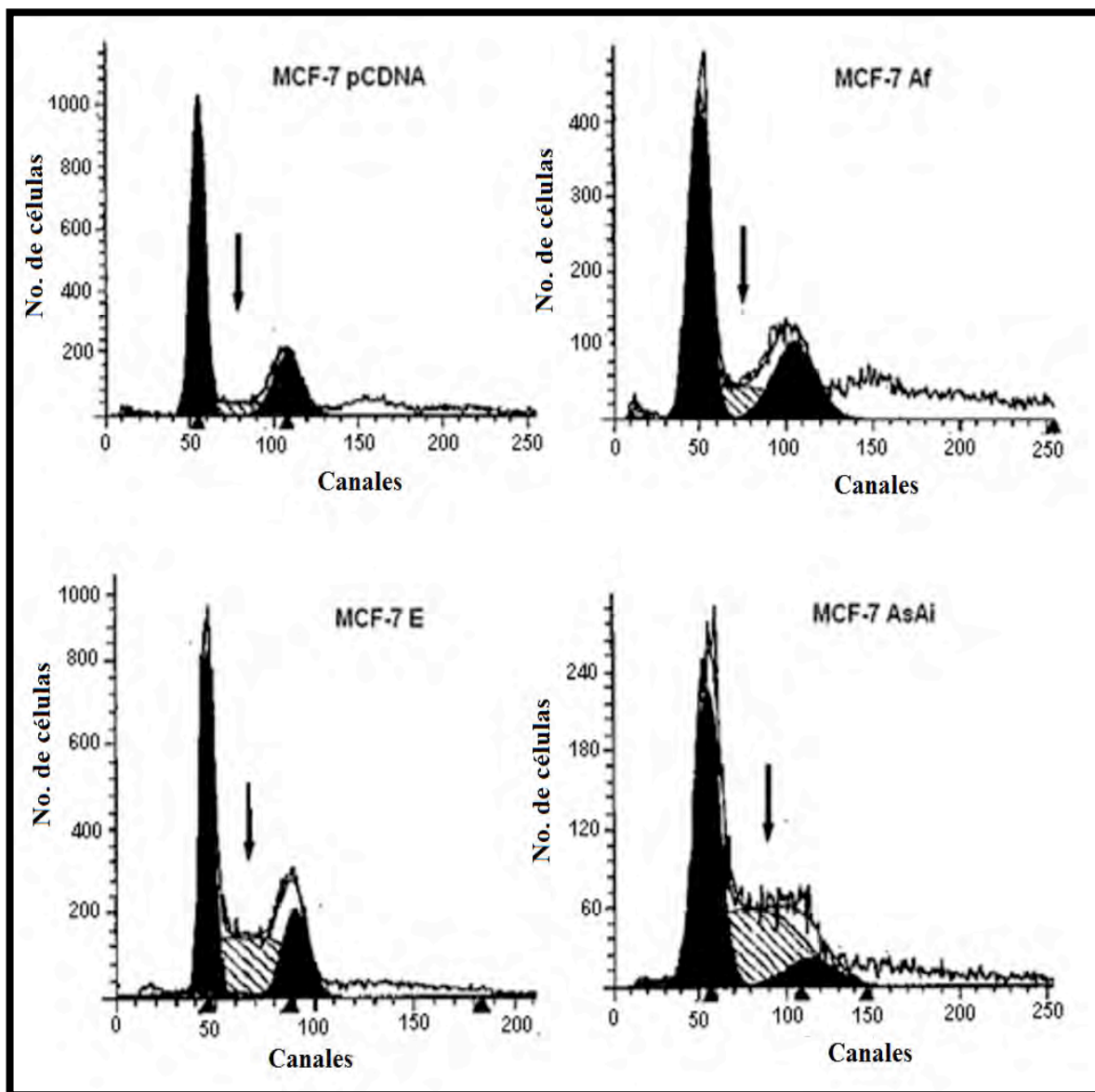
**Cuadro 5. Análisis del ciclo celular de MCF-7 transfectadas con las variantes de la concoproteína E6**

Contenido de E6	G0/G1	S	G2/M
MCF-7 pcDNA	63.14	12.56±2.7	24.29
MCF-7 Af	53.54±10.2	25.1±5.89*	21.36±2.8
MCF-7 E	23±3.1	69±10.46*·#	7.9±0.5
MCF-7 AsAi	12.31±2.1	83.89±12.3*·#	3.8±0.1

El cuadro 5, muestra el porcentaje de células MCF-7 transfectadas con las variantes (AsAi-, o Af), en cada fase del ciclo celular. Los datos se muestran como el promedio de tres experimentos realizados por separado  $\pm$  DS.

\*Diferencia significativa ( $P < 0.05$ , t de "Student") entre las células transfectadas con las variantes y el vector vacío (pcDNA).

# Diferencia significativa ( $P < 0.05$ , t de "Student") entre las células transfectadas con las variantes AsAi y E con respecto a las que poseen el aislado de E6-Af.



**Figura 23.** La expresión de la oncoproteína E6 del aislado Af está asociada a una menor proliferación en las células MCF-7. Se realizaron ensayos de citometría de flujo con el colorante yoduro de propidio a las 48 h, en las células MCF-7 transfectadas con las variantes de E6 (AsAi, E y Af) o el vector vacío (MCF-7 pCDNA). Se presenta un histograma representativo de los resultados mostrados en cuadro 5, en donde se muestra la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular (G<sub>0</sub>, S y G<sub>2</sub>/M). La flecha indica las células en fase S.

## **5. La oncoproteína E6 del HPV-18, regula la actividad de las proteínas PTEN y Akt/PKB a través de su unión con hDlg.**

Para confirmar la contribución específica de la proteína E6 del HPV-18 en las vías de señalización analizadas, se construyeron siRNAs contra las proteínas E6 del HPV-18 y del VPH-16, que fueron transfectados en la línea celular HeLa, la cual contiene el genoma del VPH-18. El efecto de los siRNAs en la expresión del RNAm de E6 fue evaluado por medio de un RT-PCR semi-cuantitativo (Fig. 24A).

En la figura 24A, se muestra que el siRNA de E6 del VPH-18 específicamente es el único que abate la expresión del RNAm de la proteína E6 en >70% aproximadamente en las células HeLa, mientras que el siRNA de E6 del VPH-16, no afecta la expresión del RNAm de esta proteína.

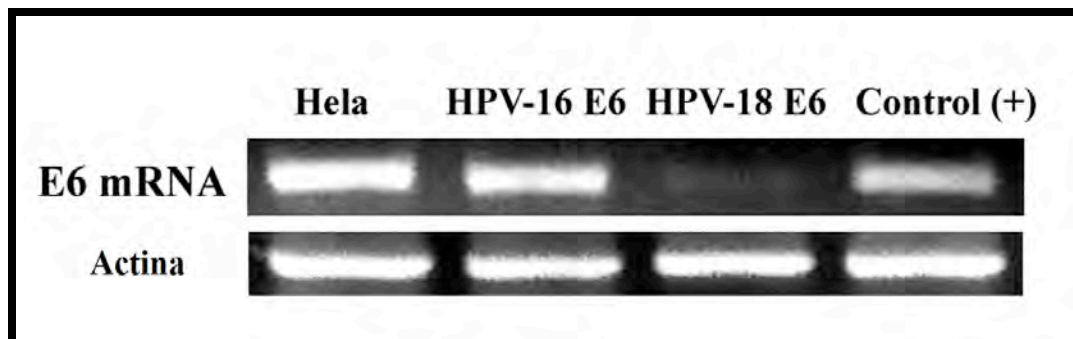
El siguiente paso, fue determinar si la disminución en la expresión del RNAm de la proteína E6 del VPH-18, repercutía en la expresión de las proteínas hDlg, PTEN, PKB y MAPKs, las cuales ya se había demostrado que se expresaban diferencialmente en las células transfectadas con las variantes de E6 (Fig. 17, 18A, 19, 20 y 21).

Como control, se usaron las células HaCaT, debido a que es una línea de queratinocitos no transformada. En estas células se encuentran elevados los niveles de las proteínas hDlg, pPTEN, y una disminución en la expresión de las MAPKs y PKB, con respecto a los niveles de estas proteínas encontrados en las células HeLa.

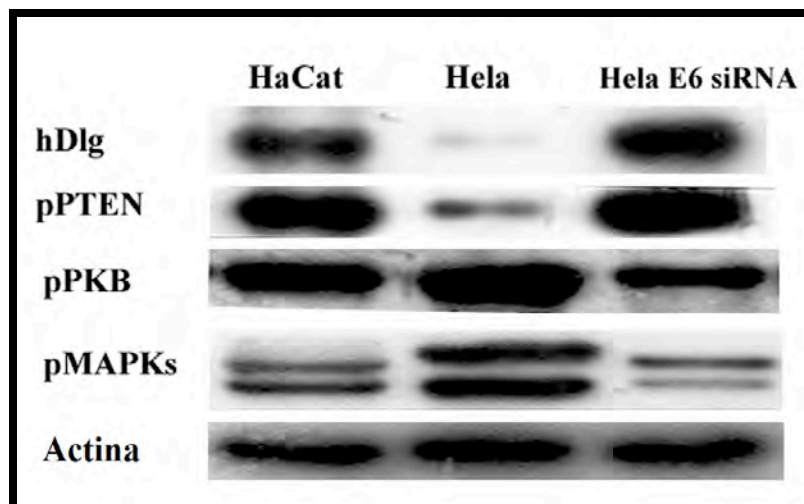
La figura 24B mostró que en las células HeLa no tratadas, los niveles de hDlg y pPTEN son menores, con respecto a los que expresan las células HaCaT. Pero cuando estas células son transfectadas con siRNA-E6, se restablecen los niveles de hDlg y la actividad de PTEN. En contraste los niveles de actividad de las proteínas PKB y ERKs (p42 and p44), los cuales se encuentran elevados en las células HeLa sin tratamiento, se reducen en las células transfectadas con siRNA de E6 del HPV-18.

Estos resultados demuestran la participación específica de la oncoproteína E6 en la regulación de la actividad de PTEN y en la activación de las vías Akt/PKB y MAPKs.

A)



B)

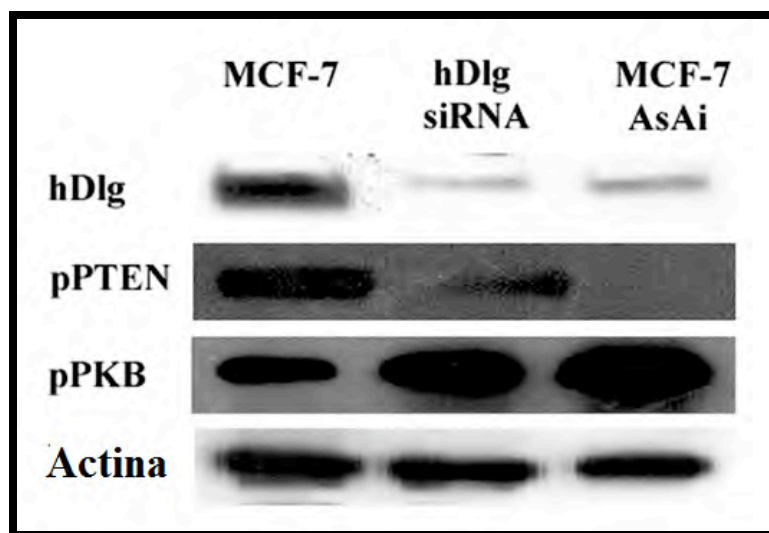


**Figura 24. La proteína E6 contribuye específicamente a la activación de las vías de señalización PKB y MAPKs.** A) Las células HeLa fueron transfectadas con siRNA para E6 del VPH-18 y posteriormente se analizó la expresión del RNAm de E6, con el empleo del ensayo de RT-PCR. Como control positivo se empleó DNA de células HeLa. La cantidad de cDNA fue normalizada con respecto a la actina. B) Efecto de la inhibición de la proteína E6 en las vías de señalización PKB y MAPKs. Los lisados celulares tratados con el siRNA de E6, fueron sometidos a un ensayo de western blot con anticuerpos específicos para hDlg, pPTEN, PKB y MAPKs en células HeLa. Como control se empleó la línea celular no inmortalizada HaCaT.

Para determinar la participación de hDlg en el efecto de la oncoproteína E6 del HPV-18 sobre las vías de señalización de PKB y MAPKs, se construyó un siRNA contra hDlg, para abatir la expresión de esta proteína en células MCF-7. Después de que las células MCF-7 fueron tratadas con este siRNA, fueron sometidas a un ensayo de western blot, para evaluar los niveles basales de las proteínas hDlg, PTEN y PKB (Fig. 25).

La figura 25, muestra que los niveles de la proteína hDlg claramente disminuyen en las células MCF-7 tratadas con el siRNA, con la consecuencia evidente de una disminución en la expresión de pPTEN y un incremento de pPKB. Estos resultados son muy similares a los que se encontraron en las células MCF-7 transfectadas con la variante AsAi, que fueron las células en las cuales se observaron menores niveles de hDlg

Estos datos sugieren que la función de la proteína E6 en la regulación de la vía de señalización Akt/PKB se basa en su capacidad para degradar a hDlg.



**Figura 25. Las variantes de E6 actúan sobre las vías de señalización PKB y MAPKs a través de su unión con la proteína hDlg.** Las células MCF-7, fueron transfectadas con el siRNA para hDlg, posteriormente los lisados celulares se analizaron por western blot con anticuerpos monoclonales para las proteínas hDlg, pPTEN y pPKB. Como control se emplearon las células transfectadas con el aislado AsAi. En general el nivel de expresión de las proteínas analizadas en las células tratadas con el siRNA fue muy semejante al observado en las células MCF-7 con E6 AsAi.

**DISCUSION**

En este estudio, se ha determinado un mecanismo diferencial de activación de las vías de señalización Akt/PKB y MAPKs inducido por las variantes de la oncoproteína E6. Se encontró que las células transfectadas con el aislado AsAi y E de E6, poseen menores niveles de la proteína hDlg, lo cual produce una disminución en la expresión de la proteína PTEN activa y un aumento en la activación de la proteína PKB.

Las células transfectadas con la variante de la proteína E6-Af, observaronn mayores niveles de hDlg, así como de PTEN activado, lo cual se traduce en menores niveles de proteína PKB. Por otro lado, las variantes AsAi y E de la oncoproteína E6, fueron capaces de activar significativamente a la proteína PI3K, dicha activación correlacionó con una aumento en la actividad de las MAPKs (ERK1 y ERK2). Estos hallazgos se suman a otros previos que apoyan la idea de una capacidad biológica diferencial para las variantes de la oncoproteína E6 del HPV-18.

La vía de señalización Akt/PKB juega un papel central en la regulación de la proliferación y sobrevida en estados fisiológicos normales. Así mismo, esta vía se ve alterada en numerosas enfermedades como el cáncer (121). Esta vía de señalización se regula a varios niveles, pero uno de los reguladores negativos más importantes es la proteína supresora de tumor PTEN.

El gen PTEN presenta altas tasas de mutación en una gran variedad de canceres (30-95%) (116). Estas mutaciones representan un evento temprano en la carcinogénesis (122). En cáncer cérvico uterino, el índice de mutaciones de este gen es muy bajo (123, 124). Por otro lado, la expresión de la proteína PTEN, se encuentra disminuída en alto porcentaje en muchos tipos de cáncer (122). Esta disminución en algunos casos se induce por las mutaciones en el gen de PTEN. Sin embargo, en el caso del CaCU, existe una regulación negativa de esta proteína (125), que no se ha podido asociar a mutaciones. Algunos autores, lo han explicado como el resultado de la metilación del promotor de PTEN (123). Sin embargo, estos resultados son controversiales, pues



también se ha propuesto que falsos positivos en la detección de regiones hipermetiladas de PTEN pueden ocurrir debido a la alta homología que existe entre la secuencia del gen de PTEN y otros pseudogenes como **psiPTEN** (109).

En este trabajo mediante el empleo de ensayos de MSP con iniciadores específicos, se amplificó una región del promotor de PTEN que no comparte con los pseudogenes (109), y se determinó que no existe metilación en el promotor de PTEN en las líneas MCF-7, ni en las células derivadas de CaCU (Caski, Siha y HeLa) (Fig.16A). Para descartar si la metilación en otras regiones de PTEN pudiera regular la actividad de PTEN, se empleó un agente desmetilante ampliamente probado que es la 5-Aza-2'-deoxicitidina (Fig.16B). El tratamiento de las células con este agente no tuvo efectos significativos en la expresión de la proteína PTEN en las líneas celulares MCF-7, Caski y HeLa. Con estos resultados descartamos que la metilación pudiera tener un papel importante en la regulación de la actividad de PTEN, en el CaCU.

Cabe mencionar que no se encontraron cambios en la expresión de la proteína PTEN que pudieran estar modulados por mecanismos epigenéticos, pero en cambio si se encontró una activación diferencial de esta proteína en las células transfectadas con los diferentes aislados de E6 del VPH-18 (Fig. 17). En este trabajo, se propuso que la oncoproteína E6, podría estar modulando la actividad de PTEN, por medio de su capacidad de unirse y degradar a hDlg, ya que se ha reportado previamente que esta proteína es capaz de unirse a PTEN (79); y como otros miembros de la familia MAGUK, hDlg podría estabilizar y promover la actividad de PTEN (79,80). La capacidad de unión de PTEN y hDlg fue comprobada en nuestro sistema mediante ensayos de inmunoprecipitación.

En este estudio, se identificó una clara influencia de la oncoproteína E6 sobre la actividad de PTEN, lo cual estuvo directamente relacionado con los niveles de la proteína hDlg presentes en las células transfectadas con las variantes de E6 del HPV18 (Fig.18). Altos niveles de hDlg y PTEN activo se observaron en las células transfectadas con el aislado Africano de E6, con respecto al que se observó en las células con los aislados de E6 AsAi y E.

Estos resultados podrían explicarse por los bajos niveles de E6 funcional que expresan las células transfectadas con el aislado Africano. De la Cruz, (2005) reportó que las células transfectadas con las variantes de E6, expresaban diferentes proporciones de los productos del procesamiento de la proteína E6. En el caso de las células transfectadas con E6Af, presentan mayores niveles del producto E6\*I, éste genera una proteína más corta que carece de los dominios de unión a PDZ, por medio de los cuales la proteína E6 completa es capaz de unirse a hDlg y promover su degradación (28). Esto explicaría los altos niveles de hDlg, presentes en las células transfectadas con el aislado Africano, comparados con los bajos niveles de esta proteína encontrados en las líneas con las variantes AsAi y E, las cuales expresan mayores niveles del producto E6 completo que de E6\*I.

Otra posible explicación es que la proteína E6 de la variante Africana, posea cambios en su secuencia con respecto al aislado de E6 AsAi, que pudieran estar influenciando su capacidad de unión a la proteína hDlg.

Se ha propuesto que las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo contribuyen a la sobre-activación de la vía PI3K/PKB (126,127), aunque el mecanismo por el cual lo hacen no ha sido dilucidado totalmente. La proteína E7 se ha propuesto como inhibidor de la fosfatasa PP2A (126), la cual es un regulador negativo de la proteína PKB. En el caso de E6 no se ha establecido claramente su vínculo con esta vía de señalización. En este trabajo, mostramos que las variantes de la oncoproteína E6 regulan la actividad de PTEN, lo cual repercute en la actividad de la proteína PKB.

Los resultados muestran que en las células transfectadas con los diferentes aislados de E6, no existen cambios en la expresión de la proteína PKB, sin embargo, un aumento en los niveles de esta proteína en su forma fosforilada se observó en las células transfectadas con las variantes con respecto a las células no transfectadas (Fig.20). Entre las células transfectadas las que contenían E6-AsAi presentaron niveles más altos de pPKB, en comparación a las células que contenían el aislado Africano. Estos resultados

correlacionan con los niveles de pPTEN. Con base en estos resultados, es posible que el efecto de E6 sobre la vía de PKB se deba al efecto de E6 sobre la proteína hDlg.

La proteína PI3K posee una función antagonista al papel de PTEN, genera fosfatidil inositol trifosfato, el cual activa a las PDK1/2 y éstas activan a la proteína PKB. En el cáncer cérvico uterino se ha reportado un aumento en la actividad de PI3K (88). Nair, (2003) (127) propuso que la sobre-activación de la proteína PI3K juega un papel fundamental en la transformación de las células infectadas con VPH. Este grupo determinó que la vía Notch-1 coopera con las oncoproteínas E6 y E7 del HPV16 para activar a PI3K, induciendo transformación de células infectadas con VPH. Sin embargo el mecanismo por el cual la proteína E6 pudiera estar influenciando la actividad de PI3K no es claro.

Los resultados obtenidos demuestran que las células transfectadas con los aislados E y AsAi de E6 poseen mayores niveles de pPI3K. En las células con el aislado Africano, no se observó ningún cambio en la fosforilación de PI3K, con respecto a las células no transfectadas (Fig.21), esto podría ser resultado de los bajos niveles de la proteína E6 que estas células expresan. Estos resultados sugieren que la proteína E6 es capaz de regular la vía de PKB, no solo por la disminución de la actividad de PTEN, sino posiblemente también por la activación de PI3K. Sin embargo, los mecanismos por los cuales E6 modula positivamente la actividad de PI3K no son claros.

En las células transfectadas con los aislados AsAi y E se observaron niveles elevados de pPI3K y bajos niveles de pPTEN, conjuntando ambos resultados se esperaría que los niveles de activación de PKB hubieran sido más elevados de los que se encontraron. Sin embargo, se debe considerar que la actividad de PKB se regula de una forma compleja que incluye fosforilaciones y defosforilaciones. Esta proteína es fosforilada en los residuos Thr-308 y Ser 473, por las cinasas dependientes de fosfolípidos (PDKs), que son serinas/treoninas cinasas que se activan por el producto de la enzima PI3K. Recientemente se demostró que para que las PDKs lleven a cabo su función no solo requieren la presencia de fosfatidil inositol trifosfato, sino también de los péptidos PRK2 (128), lo cual pudiera estar limitando la actividad de las PDKs, específicamente la

PDK1, aún en presencia abundante del producto de la enzima PI3K.

Por otro lado, la fosforilación de PKB, es el resultado del balance entre la actividad de las cinasas, y la acción de un grupo de fosfatasas como PP2A y STAT3 (126,129), que están encargadas de desfosforilar a PKB y que finalmente modulan los niveles de activación de la proteína PKB.

Las PDK1 es una cinasa que no solo fosforila a PKB, sino que es capaz de activar otras proteínas como: la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa G (PKG) y la proteína cinasa C (PKC) (130), esta última involucrada en la activación de proteínas que regulan la proliferación celular como las MAPKs, específicamente las ERK1 y ERK2 (131). La relación entre la activación de PI3K y la función de las MAPK, ha sido ampliamente comprobado (132-135).

Estos antecedentes, podrían explicar que si bien la actividad aumentada de PI3K observada en las células transfectadas con los aislados AsAi y E, no se vió reflejada totalmente en la actividad de PKB, esta proteína podría estar regulando otras vías de señalización como la de las MAPKs. Así mismo, se demostró una activación diferencial de las MAPks (ERK1 y ERK2) por variantes de E6 del HPV-16, el mecanismo por el cual se lleva a cabo dicha activación no es muy claro, pero podría involucrar a una proteína de la familia de Ras, llamada Rap-1, como propusieron Chakrabarti y col (2004) (136). En el caso de las variantes de E6 del VPH-18, no existe a la fecha ningún reporte de la actividad de esta proteína sobre las MAPKs. En este trabajo, se evaluó la actividad de ERK1(p42) and pERK2 (p44), encontrando un aumento considerable, en las células transfectadas con E6 del aislado AsAi y E (Fig.22), lo cual correlacionó claramente con la activación de PI3K en estas células (Fig.21). Sin embargo y debido a que no se evaluaron los intermediarios propuestos por Chakarabarti et al. (2004) (136), para el caso de las variantes del HPV-16, la participación de proteínas como Rap-1, en la activación de las MAPKs inducida por la oncoproteína E6 de nuestras variantes no se puede descartar.

La activación diferencial de la proteína PI3K y las MAPKs, por las variantes de E6 del VPH-18, correlaciona con los niveles de proliferación celular observados en las células transfectadas con los diferentes aislados de la oncoproteína E6 del VPH-18. Las células con el aislado Africano, que mostraron menores niveles de activación de las MAPKs y PI3K, también mostraron una proliferación celular menor, que la que presentaron las células transfectadas con E6 del aislado AsAi y E, en las cuales los niveles de pMAPKs y pPI3K también fueron mayores.

La capacidad de transformación e inmortalización que ejercen los HPV de alto riesgo, se ha atribuido a la actividad conjunta de las oncoproteínas E6 y E7. El efecto de la oncoproteína E6 sobre la proliferación y la apoptosis, se basa en su capacidad para unirse y en algunos casos degradar a un sin número de proteínas involucradas en el control del ciclo celular (50). Una de las interacciones de E6 más caracterizada en su papel como regulador de la proliferación celular, es la que realiza con p53; sin embargo, existen evidencias que apoyan un papel de E6 independiente a p53, en la proliferación celular (137).

La proteína E6 es capaz de unirse y marcar para su degradación a numerosas proteínas de la familia MAGUK, las cuales están involucradas en la regulación de la arquitectura y proliferación celular (50). hDlg forma un complejo con la proteína supresora de tumor APC (adenomatous polyposis coli). La formación del complejo APC-hDlg, es capaz de inhibir la proliferación celular, bloqueando la progresión del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub> (70,71).

En este trabajo, demostramos una degradación diferencial de hDlg por las variantes de E6 del HPV-18, lo cual correlacionó con los elevados niveles de proliferación celular evaluados en las variantes. Por otro lado, la proliferación celular inducida por las variantes de E6 (Fig. 23) también correlaciona con un aumento en la actividad de las proteínas PI3K y MAPKs, las cuales están directamente involucradas en el control de la proliferación celular. Por lo tanto, las variantes de la oncoproteína E6, son capaces de inducir un aumento en la proliferación celular, mediante la modulación de

intermediarios de las vías PKB y MAPKs.

Con el fin de determinar el efecto específico de E6 en estas vías de señalización, y que además ésto ocurre a través de su interacción con hDlg, se construyeron siRNAs para la proteína hDlg y E6. La transfección de las células HeLa que contienen HPV18 integrado, con el siRNA contra E6 del HPV-18, demostró claramente la participación de E6 en la activación de las vías Akt/PKB y MAPKs, dado que al disminuirse la expresión de E6, aumentaron los niveles de hDlg, PTEN activado, pPKB y pMAPKs (Fig.24). Por otro lado, con el empleo del siRNA de hDlg, se determinó claramente la participación de esta proteína como el intermediario, por el cual E6 ejerce su efecto sobre la vía de Akt/PKB (Fig.25).

En este trabajo, se encontró que las variantes de la oncoproteína E6 del VPH-18 regulan diferencialmente a proteínas involucradas en las vías de señalización Akt/PKB y MAPKs. Con base en los resultados obtenidos, proponemos que la interacción de E6 con la proteína hDlg, juega un papel fundamental en la modulación de la supervivencia y la proliferación celular inducida por la oncoproteína E6. Por otro lado, estos resultados se suman a evidencias que apoyan la teoría de que los cambios intra-tipo de los VPH de alto riesgo podrían ser fundamentales en la carcinogénesis cervical. Esfuerzos futuros estarán encaminados a determinar el papel de estas variantes en otros efectos biológicos involucrados en el establecimiento del cáncer, como la apoptosis y las vías de señalización que modulan dichos efectos.

## CONCLUSIONES

- La metilación del promotor del gen de PTEN, no resultó ser un mecanismo importante de regulación de esta proteína en células MCF-7 y de carcinoma de cérvix.
- La proteína hDlg se expresa en menores niveles en la línea MCF-7 transfectada con el aislado de E6 AsAi, lo cual induce una disminución en la actividad de la proteína PTEN y un aumento en pPKB.
- La proteína PI3K presenta mayor actividad en las células MCF-7 transfectadas con el E6 AsAi y E, ésto correlaciona con un aumento en la actividad de las ERKs (p42 y p44) y un aumento en los índices de proliferación celular.
- Este trabajo propone que una de las formas en que E6 regula la vía de Akt/PKB es a través de la modulación de la actividad de PTEN mediante su interacción con hDlg.
- Las variantes de la oncoproteína E6, poseen un comportamiento biológico diferencial. Este comportamiento, puede deberse a los diferentes niveles de E6, que presentan cada una de las variantes o a diferencias funcionales de las variantes de E6.

## REFERENCIAS

1. U.S. Cancer Statistics Working Group. United States Cancer Statistics: 2004 Incidence and Mortality. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and National Cancer Institute; 2007
2. World Health Organization. Human papillomavirus infection and cervical cancer. [en línea] [fecha de Consulta: 29-V-2007]. Disponible en [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/hpv/en/](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/hpv/en/)
3. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J. Cancer incidence in five continents, vol VII. International Agency for Research on Cancer, Scientific Publications number 143. Lyon; IARC, 1997
4. Ferlay J, Bray P, Pizani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase No 5, Version 2.0 IARC Press, Lyon, 2004 Available at: <http://www.iarc.fr>
5. Salud México 2006 Información para rendición de cuentas. (INEGI, 2007) Cálculos con base en INEGI. Consulta interactiva de datos de las estadísticas de Mortalidad general, <http://www.inegi.gob.mx/>
6. [www.cancerquest.org/index.cfm?page=4086&lang=...](http://www.cancerquest.org/index.cfm?page=4086&lang=...)
7. Dexeus S, López-Marín L, Labastida R, Cararach M. Tratado y atlas de patología cervical. Masson – Salvat Medicina. Barcelona 1993.
8. Picconi M, Alonio L, Garcia Carranca A, Lizano Soberón M, Cervantes G, Distefano J, Bazan A, teyssie A. 2000. Variantes moleculares de Virus Papiloma Humano (HPV) tipos 16 y 18 en adenocarcinomas de cérvix. *Medicina (Buenos Aires)*. **60**:889-894
9. zur Hausen H. 1977. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol*. **78**:1-30.
10. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. **189**:12-19.
11. Rubin MA, Kleter B, Zhou M. 2001. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol*. **159**:1211-8.
12. Daling JR, Madeleine MM, Schwartz SM. 2002. A population – based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors. *Gynecol Oncol*. **84**:263-70.
13. Trimble CL, Hildesheim A, Brinton LA. 1996. Heterogeneous etiology of squamous carcinoma of the vulva. *Obstet Gynecol*. **87**:59-64.



14. Clark MA, Hartley A, Geh JL. 2004. Cancer of the anal canal. *Lancet Oncol.* **5**:149–57.
15. Stone RS, Shope RE, Moore DH. 1959. Electron microscope study of the development of the papilloma virus in the skin of the rabbit. *J Exp Med.* **110**:543-6.
16. Morgan HR, Balduzzi PC. 1964. Propagation of an intranuclear inclusion-forming agent from human condyloma acuminatum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **52**:1561-4.
17. zur Hausen H. 1982. Human genital cancer: synergism between two virus infections and/or synergism between a virus infection and initiating events? *Lancet.* **II**:1370–1372.
18. zur Hausen H. 1996. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys Acta.* **1288**:55–78.
19. zur Hausen H. 1999. Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians.* **111**:581–587.
20. Bosch FX, Muñoz N. 2002. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res.* **89**:183-90.
21. <http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Papovaviruses.html>
22. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology.* **324**:17-27.
23. Pfister H, Nürnberger F, Gissmann L, zur Hausen H. 1981. Characterization of a human papillomavirus from epidermodysplasia verruciformis lesions of a patient from Upper-volta. *Int J Cancer.* **27**:645-50.
24. The health professional's HPV handbook 1: Human papillomavirus and cervical cancer. Walter Prendiville and Philip Davies. Taylor & Francis Group.
25. Muñoz N, Bosch X, Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K, Sviders P, Meejer. 2003 Epidemiologic Clasification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* **348**:518-527.
26. Prendiville W, Davies P. The Human Papillomavirus. In: Prendiville W, Davis P, eds. The Health Professionals HPV Handbook: Human papillomavirus and cervical cancer. Oxford: Taylor and Francis, 2004b:11-26.
27. McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. 2001. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol.* **82**:15-33.

28. De la Cruz E., Mohar A, Lizano Soberón M. 2004. Elementos víricos y celulares que intervienen el proceso de replicación. *Rev Oncología*.**6**:263-71.
29. Alison M, Gerald M. The E2 proteins.Human papillomavirus.1997.Los Alamos National Laboratory,p.III-54 - III-72.
30. Rashmi S. Hegde T. 2002. The papillomavirus E2 proteins: Structure, function and biology. *Annu Rev Biomol Struct*. **31**:343–60.
31. Lefebvre O, Steger G, Yaniv M. 1997. Synergistic transcriptional activation by the papillomavirus E2 protein occurs after DNA binding and correlates with a change in chromatin structure. *J Mol Biol*.**266**:465–78.
32. Demeret C, Desaintes M, Yaniv. 1997. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J Virol*. **71**:9343–9349.
33. Desaintes C, Demeret C, Goyat S. 1997. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J*.**16**:504-14.
34. Desaintes C, Goyat S, Garbay S. 1999. Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells.*Oncogene*.**18**:4538-45.
35. Clare E,Deborah J. Jackson J. 2002. Identification of a G2 Arrest Domain in the E1<sup>^</sup>E4 Protein of Human Papillomavirus Type 16. *J Virology*. **76**:9806–9818.
36. Sorathia, C. Dav J.Regulation of E2-mediated transcription by 16 E4. Study ongoing.
37. Stubenrauch F, Laimins LA. 1999. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol*.**9**:379–86.
38. Doorbar J, Foo C, Coleman N. 1997. Characterisation of events during the late stages of HPV 16 infection in vivo using high affinity synthesis fabs to E4. *Virology*.**238**:40–52.
39. Martin P, Vass WC, Schiller JT. 1989. The bovine papillomavirus E5 tranforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1 receptors. *Cell*. **59**:21–32.
40. Hwang ES, Nottoli T, DiMaio D.1995.The HPV 16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology*. **211**:227–233.
41. Petti L, Nilson L, Dimaio D. 1991. Activation of the platelet–derived growth factor receptor by the bovine papillomavirus E5 transforming protein. *EMBO J*.**10**:845–855.

42. Valle G, Banks L. 1995. The human papillomavirus HPV-6 and HPV-16 E5 proteins co-operate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells. *J General Virology*. 76:1239-1245.
43. Conrad M, Bubb VJ, Schlegel R. 1993. The human papillomavirus type 6 and 16, E5 proteins are membrane associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol*.67:6170-6178.
44. Leechanachi P, Banks L, Moreau F. 1992. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene*.7:19-25.
45. Bouvard V, Matlashewski G, Gu ZM. 1994. The human papillomavirus type 16, E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology*. **203**:73-80.
46. Boyer SN, Wazer DE, Band V. 1996. E7 protein of human papillomavirus 16 induces degradation of the retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteosome pathway. *Cancer Res*. **56**: 4620-4.
47. Munger K, Basile JR, Duensing S. 2001. Actividades biológicas y blancos moleculares de la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano. *Oncogene*. **20**:7888-98
48. Burd EM. 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*.**16**:1-17.
49. Mantovani F, Banks L. 2001. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. **20**:7874-87
50. Tungteakkhun SS, Duerksen-Hughes PJ. 2008. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol*. **153**:397-408.
51. Thomas M, Pim D and Banks L. 1999. The role E6-p53 in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* **18**:7690-7700.
52. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. 2002. *Virus Res*. **89**:213-28.
53. Chakrabarti O, Krishna S. 2003. Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J Biosci*.**28**:337-348.
54. Guille J, Swerlick R, Caughman S. 1997, Transforming growth factor-induced-transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) genes requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation. *EMBO J*.**16**:750-759.

55. Lopez O, Vilorio PA, Bequet RM, Mukhopadhyay D, Rak J, Kerbel R. 2000. Oncogenes and tumor angiogenesis: The HPV 16 E6 oncoproteins activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene*. **19**:4611-4620.
56. Werness B, Levine A, Howley B. 1990, Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53; *Science*. **248**:76-79.
57. Mantovani F, Banks L. 1999. Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical cancer derived cell lines. *Oncogene*.**18**:3309–3315.
58. Thomas M, Banks L, 1998, Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV 18 E6. *Oncogene*.**17**:2943-2954.
59. Kinoshita T, Shirasawa H, Shino Y, Moriya H, Desbarats L, Eilers M, Simizu B. 1997. Transactivation of prothymosin alpha and c-myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein. *Virology*. **232**:53–61.
60. Borbely AA, Murvai M, Konya J, Beck Z, Gergely L, Li F, Veress G. 2006. Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *J Gen Virol*. **87**:287–294.
61. Filippova M, Parkhurst L, Duerksen J. 2004. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem*. **279**:25729–25743.
62. Tong X, Howley PM. 1997. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA*. **94**:4412–4417.
63. Degenhardt YY, Silverstein S. 2001. Interaction of zyxin, a focal adhesion protein, with the e6 protein from human papillomavirus type 6 results in its nuclear translocation. *J Virol*. **75**:11791–11802.
64. Chen JJ, Reid CE, Band V, Androphy EJ. 1995. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science*. **269**:529–531.
65. Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. 1998. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*. **12**:2061–207
66. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, Mansour M, Vincent I, Gissmann L, Iftner T, Sideri M, Stubenrauch F, Tommasino M. 2007. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*. **178**:3186–3197.

67. Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M. 1997. Biding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Sci USA*. 94:11612-11616.
68. Lee SS, Weiss RS, Javier RT. 1997. Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. **94**:6670–6675.
69. Gaudet S, Branton D, Lue R. 2000. Characterization of PDZ-binding kinase a mitotic kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**:5167-72.
70. Reuver S, Garner C. 1998. E-cadherin mediated cell adhesion recruits SAP97 into the cortical cytoskeleton. *Cell Sci*.111:1071-80.
71. Ishidate T, Matsumine A, Toyoshima K. 2000.The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase.2000. *Oncogene*. **20**:365-72.
72. Kim, E, DeMarte S, Sheng M. 1998. Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase isoform 4b binds to membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) proteins via their PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domains..*J Biol Chem*. **273**:1591-5.
73. Matsumine A, Ogai A, Senda T. 1996. Binding of APC to the human homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Science*. **17**:1020-3.
74. Bilder D, Li M, Perrimon N. 2000. Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science*. **289**:113-116.
75. Miranda T, Glaunsinger B, Pim D. 2001. HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific recognition and degradation. *Oncogene*. **20**:5431-5439.
76. Gardiol D, Kuhne C, Glaunsinger B. 1999. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*.**18**:5487-96.
77. Pim D, Thomas M, Javier R. 2000. HPV E6 targeted degradation of the discs large protein: evidence for the involvement of a novel ubiquitin ligase .*Oncogene*. **19**:719-25.
78. Zhang J, Rose BR, Thompson CH. 1995. Associations between oncogenic human papillomaviruses and local invasive patterns in cervical cancer. *Gynecol Oncol*. **57**:170-7.
79. Adey NB, Huang L, Ormonde PA, Baumgard ML, Pero R, Byreddy DV, Tavtigian SV, Bartel PL. 2000. Threonine phosphorylation of the MMAC1/PTEN PDZ binding domain both inhibits and stimulates PDZ binding. *Cancer Res*. **60**:35-7.

80. Thomas M, Glaunsinger B, Pim D, Javier R, Banks L. 2001. HPV E6 and MAGUK protein interactions determination of the molecular basis for specific protein recognition and degradation. *Oncogene*. **20**:5431-5439.
81. Valiente M, Andres-Pons A, Gomar B, Torres J, Gil A, Tapparel C, Antonarakis SE, Pulido. R. 2005. Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by 21 microtubule-associated serine/threonine kinases. *J Biol Chem*. **280**:28936-28943.
82. Tamura M, Gu J, Tran H, Yamada KM. 1999. PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst*. **3**:1820-8.
83. Gottschalk AR, Doan A, Nakamura JL, Stokoe D, Haas-Kogan DA. 2005. Inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase causes increased sensitivity to radiation through a PKB-dependent mechanism. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. **63**:1221-7.
84. Basila D, Wong M. 2001. p27Kip1 is required for PTEN-induced G1 growth arrest. *Cancer Res*. **61**:2105-11.
85. Leslie RN, Bennett D, Gray A. 2001. Targeting mutants of PTEN reveal distinct subsets of tumor suppressor functions. *Biochem J*. **357**:427-435.
86. Yamada MK, Araki M. 2000. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J of Cell Science*. **114**:2375-2382.
87. Lawlor MA, Alessi RD. 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?. *J of Cell Science*. **114**:2903-2910.
88. Bertelsen BI, Steine SJ, Sandvei R, Molven A, Laerum OD. 2006. Molecular analysis of the PI3K-AKT pathway in uterine cervical neoplasia: frequent PIK3CA amplification and AKT phosphorylation. *Int J Cancer*. **118**:1877-1883.
89. Haluska FG, Tsao H, Wu H, Haluska ES, Lazar A, Goel V. 2006. Genetic alterations in signaling pathways in melanoma. *Clin Cancer Res*. **12**:2301s-2307s.
90. Li JC, Yen D, Liaw K, Podsypanina S, Bose SL, Wang J, Puc C, Miliareis L, Rodgers R, McCombie SH, Bigner BC, Mittmann G, Tycko H, Hibshoosh MH, Parsons R. 1997. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene 1 mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. **275**:1943-1947.
91. Tsugawa K, Jones M, Sugimachi K, Sarfeh J, Tarnawski AS. 2002 Biological role of phosphatase PTEN in cancer and tissue injury healing. *Front Biosci*. **7e**:245-51.
92. Harima Y, Sawada S, Nagata K. 2001. Mutation of the PTEN gene in advanced cervical cancer correlated with tumor progression and poor outcome after radiotherapy. *Int J Oncol*. **18**:493-7.

93. Bernard HU, Chan MM, Manos CK. 1994. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis.* **170**:1077-1085.
94. Itzel E, Calleja-Macias A, Kalantari M, Huh J. 2004. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology.* **319**:315–323.
95. Ho L, Chan SY, Burk RD. 1999. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol.* **67**:6413-6423.
96. Ong CK, Chan SY, Campo MS. 1993. Evolution of human papillomavirus type 18 an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol.* **67**:6424-6431.
97. Heizel PA, Chan S-Y, Ho L. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 ge Heizel PA, Chan SY, Ho L. 1995. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled through the world. *J Clin Microbiol.* **33**:1746-1754.
98. Stewart AC, Erickson AM, Manos MM. 1996. Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol.* **70**:3127-3136.
99. Cavalli-sforza LL, Minch E, Mountain JL. 1992. Coevolution of genes and languages revisited. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**:5620-5624.
100. Hecht JL, Kadish AS, Jiang G. 1995. Genetic Characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int J Cancer.* **60**:369-376
101. Lizano M, Berumen J, Guido MC. 1997. Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Can Inst.* **89**:1227-1231
102. Conrad-Stöppler MC, Ching K, Stöppler H. 1996. Natural variants of the HPV 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol.* **70**:6987–6993.
103. Giannoudis, A, Herrington CS, 2001. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol.* **193**:295 302.
104. Londesborough P, Ho L, Terry G. 1996. HPV genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer.* **69**:364–368.

105. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. 1998. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* **58**:829–833.
106. Grodzki M, Besson G, Tommasino M. 2006. Increased risk for cervical disease progression of french women infected with the human papillomavirus 16 E6–350 G variant. Study ongoing.
107. De la Cruz E, García–Carrancà A, Lizano-Soberón M. 2005. Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *J of General Virology.* **86**:2459–2468.
108. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SD. 1992 Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**:9821-9826.
109. Zysman MA, Chapman B, Bapat I. 2002. Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor WB suppressor gene. *Am J Pathol.* **160**:795-800.
110. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**:248-54.
111. Vindelov L, Christensen I. 1994. Flow cytometric analysis of DNA and its use in clinical and experimental oncology. *Gematol Transfuziol.* **39**:8-12.
112. Denli AM, Hannon GJ. 2003. RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends Biochem Sci.* **28**:196-201.
113. Yamato K, Fen J, Kobuchi H, Nasu Y, Yamada T, Nishihara T, Ikeda Y, Kizaki M, Yoshinouchi M. 2006. Induction of cell death in human papillomavirus 18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. *Cancer Gene Ther.* **13**:234-41.
114. Jeong KW, Kim HZ, Kim S, Kim YS, Choe J. 2007. Human papillomavirus type 16 E6 protein interacts with cystic fibrosis transmembrane regulator-associated ligand and promotes E6-associated protein-mediated ubiquitination and proteasomal degradation. *Oncogene.* **25**:487-99.
115. Laprise P, Viel A, Rivard N. 2004. Human homolog of disc-large is required for adherens junction assembly and differentiation of human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* **279**:10157-66.
116. Harima Y, Sawada S, Nagata, K, Sougawa, M, Ostapenko V, Ohnishi T. 2001. Mutation of the PTEN gene in advanced cervical cancer correlated with tumor progression and poor outcome after radiotherapy. *Int J Oncol.* **18**: 493–49.



117. Kurose K, Zhou X, Araki T, Eng C. 2000. Biallelic inactivating mutations and an occult germline mutation of PTEN in primary cervical carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. **29**:166-172.
118. Graness A, Adomeit A, Heinze R, Wetzker R, Liebmann CA. 1998. Novel mitogenic signaling pathway of bradykinin in the human colon carcinoma cell line SW-480 involves sequential activation of a Gq/11 protein, phosphatidylinositol 3-kinase beta, and protein kinase C epsilon. *J Biol Chem*. **273**:32016-20.
119. Chai B, Li JY, Zhang W, Ammori JB, Mulholland MW. 2007, Melanocortin-3 receptor activates MAP kinase via PI3 kinase. *Regul Pept*. **139**:115-121.
120. Wells V, Downward J, Mallucci L. 2007. Functional inhibition of PI3K by the betaGBP molecule suppresses Ras-MAPK signalling to block cell proliferation. *Oncogene*. **26**:7709-14.
121. Knobbe CB, Reifenberger G. 2003. Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidyl-inositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Path*. **13**:507-518.
122. Parsons R. 2004. PTEN and the PI-3 kinase pathway. *Semin Cell Dev Biol*. **15**:171-
123. Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Chan LK, Heung MS, Chan CS, Cheung AY, Chung TH, Wong YF. 2004. Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol*. **93**:621-627.
124. Tashiro H, Blazes MS, Wu K, Cho R, Bose S, Wang S, Li J, Parsons R, Ellenson L. 1997. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res*. **57**:3935-1940.
125. Zhao XL, Cheng SX, Kong XD. 2007. Expression and significance of P16INK4A and PTEN in high-risk human papillomavirus-related cervical cancer. *Ai Zheng*. **26**:480-3.
126. Pim D, Massimi P, Dilworth SM, Banks L. 2005. Activation of the protein kinase B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A. *Oncogene*. **24**:7830-7838.
127. Nair P, Somasundaram K, Krishna S. 2003. Activad Notch inhibits p53-induced apoptosis and sustains transformation by human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes through a PI3K-PKB/Akt1 dependent pathway. *J Virol*. **77**:7106-7112.
128. Persad S, Attwell S, Gray V, Mawji N, Deng JT, Leung D, Yan J, Sanghera J, Walsh MP, Dedhar S. 2001. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J Biol Chem*. **276**:27462-9

129. Sun S, Steinberg MB. 2002. PTEN is a negative 1 regulator of STAT3 activation in human papillomavirus-infected cells. *J Gen Virol.* **83**:1651-3.
130. Dancey JE. 2004. Epidermal growth factor receptor and epidermal growth factor receptor therapies in renal cell carcinoma: do we need a better mouse trap?. *J Clin Oncol.* **1**:2975-7.
131. Jorda, M, Vinyals A, Marazuela A, Cubillo E, Olmeda D, Valero E, Cano A, Fabra A. 2007. Id-1 is induced in MDCK epithelial cells by activated Erk/MAPK pathway in response to expression of the Snail and E4 transcription factors. *Exp Cell Res.* **313**:2389-403.
132. Chai B, Li JY, Zhang W, Ammori JB, Mulholland MW. 2007. Melanocortin-3 receptor activates MAP kinase via PI3 kinase. *Regul Pept.* **3**:115-121.
133. Kranenburg, O, Verlaan L, Hordijk PL, Moolenaar WH. 1997. Gi-mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway involves a 100 kDa tyrosine-phosphorylated Grb2 SH3 binding protein, but not Src nor Shc.10. *EMBO J.* **16**:3097-4105.
134. Roymans, D, Slegers H. 20001. Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *Eur J Biochem.* **268**:487-498.
135. Wennstrom, S, Downward J. 1999. Role of phosphoinositide 3-kinase in activation of ras and mitogen-activated protein kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol.* **19**:4279-4288.
136. Chakrabarti O, Veeraraghavalu K, Tergaonkar V, Liu Y, Androphy EJ, Stanley MA, Krishna S. 2004. Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic. *Res Virol.* **78**:5934-5945
137. Song S, Gulliver GA, Lambert PF. 1998. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes abrogate radiation-induced DNA damage responses in vivo through p53-dependent and p53-independent pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* **3**:2290-5.

# **ANEXO 1**

Artículo publicado



## E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway

Adriana Contreras-Paredes, Erick De la Cruz-Hernández, Imelda Martínez-Ramírez, Alfonso Dueñas-González, Marcela Lizano\*

Unit of Biomedical Research in Cancer, National Cancer Institute (INCan)/Biomedical Research Institute (IIBM), National Autonomous University of Mexico (UNAM), Av. San Fernando No. 22, Col. Seccion XVI, Tlalpan, 14080 Mexico City, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 June 2008

Returned to author for revision 21 July 2008

Accepted 25 September 2008

Available online 12 November 2008

#### Keywords:

HPV variants

hDlg

E6

Akt/PKB

MAPK

PI3K

### ABSTRACT

Intra-type genome variations of high risk Human papillomavirus (HPV) have been associated with a differential threat for cervical cancer development. In this work, the effect of HPV18 E6 isolates in Akt/PKB and Mitogen-associated protein kinase (MAPKs) signaling pathways and its implication in cell proliferation were analyzed. E6 from HPV types 16 and 18 are able to bind and promote degradation of Human disc large (hDlg). Our results show that E6 variants differentially modulate hDlg degradation, rebounding in levels of activated PTEN and PKB. HPV18 E6 variants are also able to upregulate phospho-PI3K protein, strongly correlating with activated MAPKs and cell proliferation. Data was supported by the effect of E6 silencing in HPV18-containing HeLa cells, as well as hDlg silencing in the tested cells. Results suggest that HPV18 intra-type variations may derive in differential abilities to activate cell-signaling pathways such as Akt/PKB and MAPKs, directly involved in cell survival and proliferation.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

High-risk Human Papilloma Virus (HPV) is the major etiological agent of cervical cancer. It is well known that only a small number of cervical lesions infected with high risk HPVs evolve to higher grade lesions or cervical cancer (Bosch et al., 2002; zur Hausen, 2002). HPV type and persistence of infection are critical factors involved in cervical cancer progression. Intra-type variation could be an important factor influencing cervical cancer development (Dalstein et al., 2003; Hildesheim et al., 2001; Lizano et al., 1997). It has been shown that variations in E6 viral oncogene could affect HPV biological behavior (Kammer et al., 2002; Stoppler et al., 1996). Different E6 splicing patterns within HPV18 variants have been proposed to affect the final cellular concentration of full-length E6 (De la Cruz et al., 2005).

E6 and E7 are the main viral proteins involved in human epithelial cell immortalization and transformation (Mantovani and Banks, 2001). A rather large number of cellular targets of E6 and E7 oncoproteins have been identified and several of these interactions are assumed to participate in deregulation of cellular processes, such as cell proliferation and apoptosis (Malanchi et al., 2004; Motoyama et al., 2004). Nevertheless, some cellular pathways that HPV oncogenes affect are not well dissected. *In vitro* assays as well as results obtained through cervical cancer cell line analysis, have demonstrated that E6

proteins from high risk HPV, bind to a PDZ-2 domain of hDlg (Postsynaptic synaptic density–Discs large–Zona occludens) (Lee et al., 1997; Thomas et al., 2001; Zhang et al., 2007) promoting its degradation via the ubiquitin proteasome pathway (Grm and Banks, 2004; Mantovani et al., 2001b; Massimi et al., 2004).

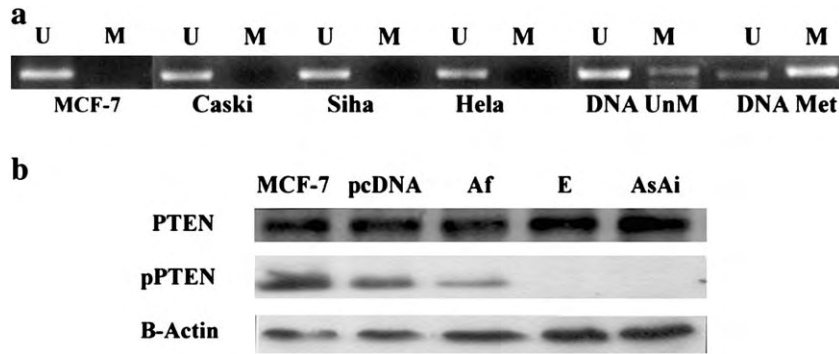
hDlg, is a member of the membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family of proteins, involved in the inhibition of cell cycle progression. It has been reported that cellular hDlg levels are greatly reduced or absent in high grade cervical neoplasia, as well as in cervical squamous cell carcinomas, (Watson et al., 2002). hDlg expression is also diminished in transformed cell types (Lin et al., 2004).

It has been shown that various members of the MAGUK family bind and modulate PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) activity through formation of multicomponent protein complexes (Adey et al., 2000; Thomas et al., 2001; Valiente et al., 2005). hDlg is also able to bind PTEN tumor suppressor protein, through its PDZ domains (Adey et al., 2000).

PTEN phosphatase is a negative regulator of the Serine/threonine kinase/Protein kinase B (Akt/PKB) survival pathway (Sansal and Sellers, 2004). Activation of this pathway in cervical cancer has been explained by PTEN levels reduction (Tak-Hong et al., 2004). Nevertheless, diminished PTEN expression has only been found in a minor proportion of invasive cervical cancers (Lee et al., 2006; Mei et al., 2005). PTEN mutations are common in many human cancers (Haluska et al., 2006; Li et al., 1997; Mei et al., 2005; Pedrero et al., 2005; Tashiro et al., 1997), but are infrequent in cervical cancer (Harima et al., 2001; Kurose et al., 2000; Su et al., 2000; Yaginuma et al., 2000). Reduction of PTEN expression in

\* Corresponding author. Fax: +52 55 56280432.

E-mail addresses: [adrycont@yahoo.com.mx](mailto:adrycont@yahoo.com.mx) (A. Contreras-Paredes), [lizano@servidor.unam.mx](mailto:lizano@servidor.unam.mx) (M. Lizano).



**Fig. 1.** (a) PTEN promoter is unmethylated in cervical cancer cell lines. Methylation status of PTEN promoter was determined through MSP in MCF-7, Caski, SiHa, and HeLa, cell lines. Bisulfite-modified DNA was PCR amplified with specific primers: Methylated primers (M) or unmethylated primers (U). DNA extracted from lymphocytes, untreated and *in vitro* methylated, was used as control. A PCR amplification product was obtained only with unmethylated primers in tested cervical cell lines, revealing the unmethylated status of PTEN promoter. Lymphocyte PTEN promoter is naturally found methylated; the proportion of methylated DNA increased in DNA methylated *in vitro*. (b) pPTEN is diminished in cell lines transfected with HPV18 E6 variants. Western blot analysis of PTEN protein levels was done in MCF-7 extracts with E-, AsAi-, and Af-HPV18 E6 and pcDNA vector alone. Analysis was performed with Anti-PTEN antibody (Upper panel); phosphorylated PTEN (pPTEN) levels were evaluated with antibodies recognizing 388 and 396 tyr (Middle panel). Lower panel: anti-Actin antibody, as protein loading control.

cervical neoplasia has been explained by promoter methylation-involved epigenetic mechanisms (Cheung et al., 2004).

Diverse elements in the Akt/PKB pathway are critical in cell survival and proliferation (Lawlor and Alessi, 2001). It is well known that Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) is a positive regulator of the Akt/PKB pathway, which in turn induces the expression of transcriptional factors involved in proliferative and antiapoptotic signals (Downward, 2004). The PI3K-triggered process is negatively regulated by PTEN (Haluska et al., 2006; Tsugawa et al., 2002).

Increased PI3K activity has been found in cervical cancer-derived tumors and cell lines (Bertelsen et al., 2006; Ma et al., 2000). This event has been explained by the frequent amplification of the region 3q24–29, where PI3K gene is located (PIK3CA), which is also linked with an increase in Akt activated forms.

PI3K has also been related with activation of Mitogen-Associated Protein Kinase (MAPKs), a family of proteins acting downstream in mitogenic signaling (Chai et al., 2007; Wells et al., 2007). It has been shown that an HPV16 variant E6, is able to enhance MAPKs signaling in transfected cell lines, by means of its cooperation with the Notch signaling pathway (Chakrabarti et al., 2004).

The aim of this study was to determine the role HPV18 E6 isolates in the modulation of elements involved in the akt/PKB and MAPKs signaling pathways. It was found that E6 variants differentially modulate hDlg degradation, rebounding in levels of pPTEN and activated PKB. HPV18 E6 variants were also able to upregulate activated PI3K protein, strongly correlating with activated MAPKs and cell proliferation. Results suggest that functional differences within HPV18 variants may be also due to a differential ability to activate cell-signaling pathways such as Akt/PKB and MAPKs, which are directly involved in cell survival and proliferation.

**Results**

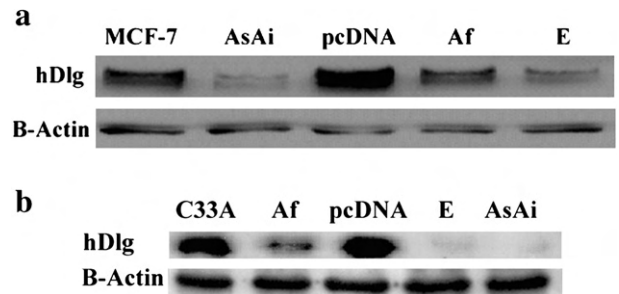
*PTEN promoter methylation status in cervical cell lines*

PTEN is a negative Akt/PKB pathway regulator. It has been proposed that PTEN promoter activity may be regulated by epigenetic mechanisms, because methylated PTEN has been detected in cervical cancers (Cheung et al., 2004; Yang et al., 2006). A controversy exists concerning such methylation. Zysman et al. (2002) reported that certain primers could be detecting PTEN pseudogenes rather than PTEN promoter. Therefore, in order to determine PTEN methylation status in several cell lines, including cervical cancer, we used specific primers that amplify PTEN promoter 5' region, that discriminate between PTEN and the pseudogene (Zysman et al., 2002). PTEN

promoter methylation was not detected in MCF-7, Caski, HeLa, and SiHa cell lines (Fig. 1a), while a proportion of methylated PTEN can be observed in DNA from normal lymphocyte, increasing in DNA methylated *in vitro*. Moreover, when the same cells were treated with the DNA demethylating agent 5-Aza-2'-deoxycytidine, no significant changes in PTEN protein levels were found (data not shown), discarding that methylation of other regions of PTEN promoter could be regulating PTEN expression.

*E6 modulates PTEN activity through interaction with hDlg*

Other mechanisms, such as PTEN stabilization by hDlg, may be involved in PTEN regulation, as occurs with other MAGUK family members (Adey et al., 2000; Valiente et al., 2005). Because it is known that E6 from HPV18 binds with high affinity to hDlg, promoting its degradation, we determined whether PTEN protein levels were modified within the E6-variant context. No differences in PTEN steady-state levels were observed in the presence of the distinct E6 variants (Fig. 1b). Nevertheless, different activated PTEN (pPTEN) levels appeared within E6 transfected cells. The results clearly show highly phosphorylated PTEN levels in cells lacking E6, whereas in cells harboring AsAi- and E-E6 variants no visible pPTEN were observed (Fig. 1b), while cells with the African E6 isolate presented a reduction in pPTEN over basal levels. To verify if changes in pPTEN levels could be due to differences in E6 expression, RT-PCR of E6 expression analysis in transfected cells was performed. This analysis showed similar transcriptional patterns as those previously reported for the same variants (De la Cruz et al., 2005), where cells with E6 African variant had a minor proportion of full-length E6 in relation to the



**Fig. 2.** HPV18 E6 variants promote hDlg degradation. Western blot analysis with anti-hDlg antibody shows different amounts of hDlg total protein in MCF7 cells (a), or C33 cells (b) transfected with the E6 isolates (Af, E, or AsAi). Anti-actin antibody was used as protein-loading control.

splicing product E6\*1 (data not shown). In contrast, cells with E and AsAi-E6 showed a higher proportion of full-length E6. Therefore, when no pPTEN is found, a higher proportion of the full-length E6 transcript is present.

Because a direct interaction between E6 and PTEN has not been demonstrated, to date, the previously cited observations could be the result of differences in hDlg protein levels. Thus, we analyzed hDlg protein steady-state levels in the presence of the different E6 variants. Examination of E6 variant-transfected MCF-7 and C33A cell lines by Western blot showed that control cells maintained higher hDlg levels, than cells harboring the different E6 isolates, which suggests efficient hDlg-degradation promotion by E6 in both cell lines (Figs. 2a and b). Nonetheless, reduction in hDlg levels is higher in AsAi and E-E6 harboring cells, than in cells with the African E6. hDlg levels directly correlated with the proportion of activated PTEN. A decline in pPTEN took place in Asian-Amerindian or European E6-containing MCF-7 cells (Fig. 1b) as well as in C33A cells containing the same E6 variants (not shown), which could be a consequence of the lower hDlg levels observed in these cell clones (Figs. 2a and b).

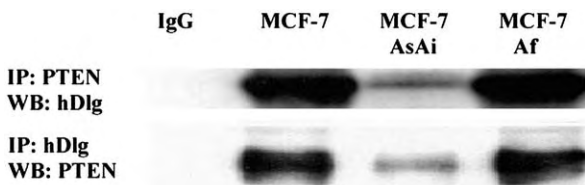
hDlg and PTEN interaction has already been demonstrated (Adey et al., 2000), hence, we continued to verify whether this interaction occurred in our system. Immunoprecipitation confirmed *in vivo* PTEN and hDlg interaction. A relative minor hDlg/PTEN amount was observed in cells with AsAi-E6 (Fig. 3). This difference could be due to the smaller amount of hDlg present in these cells, compared with cells with E6-Af or without E6 (Figs. 1b and 2a).

#### E6 affects the Akt/PKB pathway through PTEN and PI3K modulation

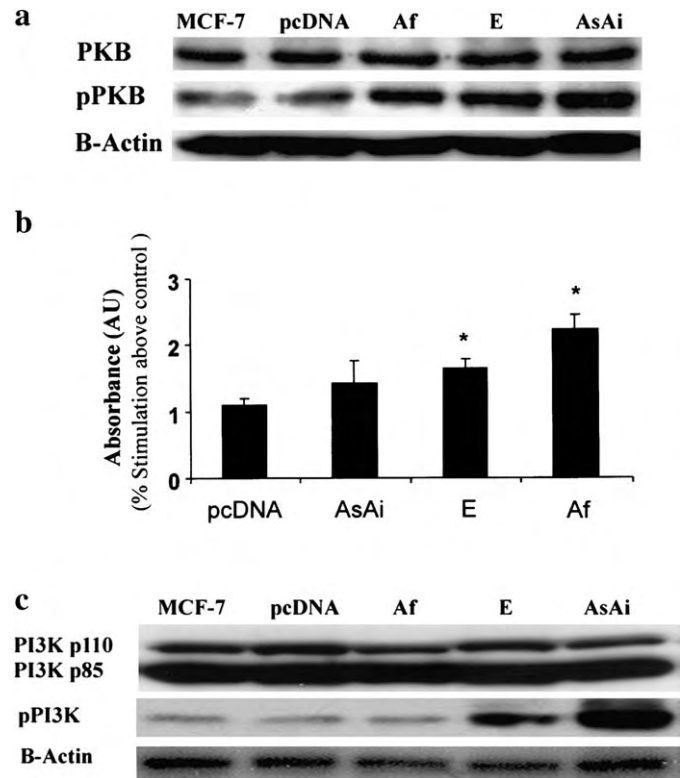
Because PTEN is a negative regulator of the Akt/PKB pathway, we proceeded to determine whether differences observed in PTEN phosphorylation within E6 transfected cells could affect phosphorylated Akt/PKB levels. Analysis with the antibody recognizing p-Akt1/2/3(Ser 473) isoforms, showed that while Akt/PKB cellular levels remained constant, phosphorylated Akt/PKB (pPKB) was increased in E6-harboring cells (Fig. 4a). Significant differences were found in AsAi and E-E6-harboring cells, as compared with control cells (Fig. 4b). Lower pPKB levels were observed for the E6 African isolate, concordant with a detectable amount of pPTEN also observed in these cells.

Because the main positive Akt/PKB is PI3K regulator, we also analyzed phosphorylated PI3K levels. As shown in Fig. 4c, PI3K steady-state levels are maintained constant among transfected cells. Meanwhile, the PI3K phosphorylated form (pPI3K) is evidently increased in Asian Amerindian and European E6-containing cells, in contrast with cells with the empty pcDNA vector or the African E6, in which PI3K activation appears not to occur.

PI3K participates in biological processes such as chemotaxis and cellular proliferation (Graness et al., 1998). An association between PI3K and MAPKs activation has also been reported (Chai et al., 2007; Wells et al., 2007). Therefore, we analyzed whether differences in pPI3K observed within E6 transfected cells, could vary MAPK down-



**Fig. 3.** PTEN and hDlg interaction. Western blot analysis of cellular immunoprecipitates from MCF-7 cells lines transfected with pcDNA vector alone, AsAi-, or Af-E6. Lysed extracts were immunoprecipitated with anti-PTEN antibodies, anti-hDlg, antibodies, or preimmuniserum of sheep. Complexes were analyzed in Western blot with anti-hDlg or anti-PTEN antibodies.



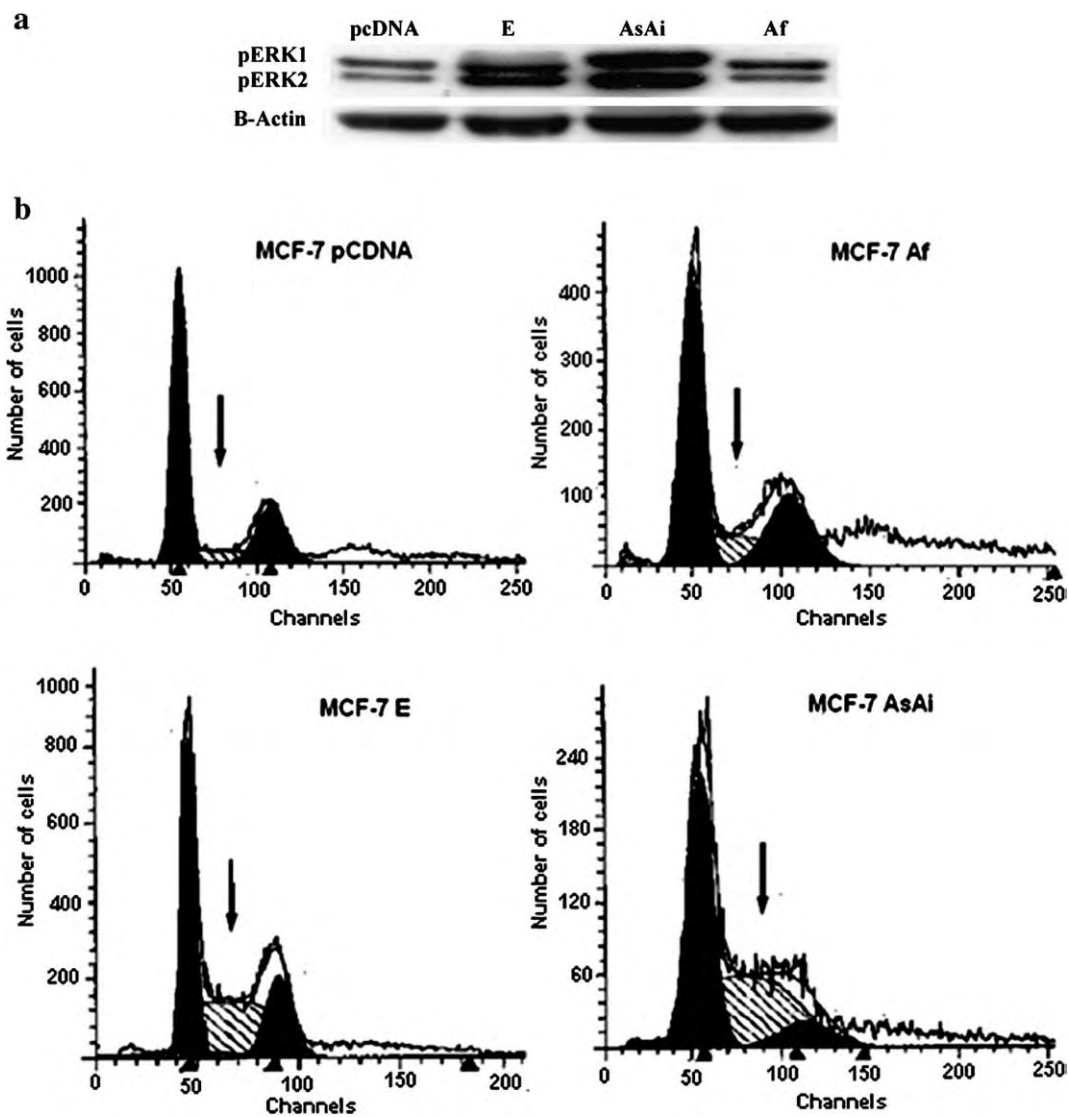
**Fig. 4.** (a) HPV18 E6 variants modulate differentially PI3K/Akt pathway. A) PKB levels were compared within MCF-7 cells and those transfected with the HPV18 E6 isolates (Af, E, and AsAi), or the pcDNA vector. Upper panel shows equivalent quantities of total PKB protein within all cells analyzed by Western blot; Middle panel shows an increase in pPKB (anti-pAkt1/2/3(Ser 473) in E6 variants-harboring cells. Lower panel: anti-actin as loading control. (b) Densitometric analysis of previously mentioned data. A graph with mean  $\pm$  SD of three independent western blot experiments was drawn by measuring the band intensities with NIH IMAGEN version 1.62. Results are expressed as a percentage of increase above control cells (MCF-7 cells), in which the asterisk (\*) indicates significant differences related to cells containing pcDNA vector ( $p < 0.001$  Student's *t*-test). (c) Western blot analysis of PI3K expression. Upper panel shows homogeneous levels of PI3K total protein (anti-PI3-kinase p110) in tested cell lines. Middle panel confirms presence active PI3K (anti-p-PI3K p85 $\alpha$ ) in E- and AsAi-E6 containing cells.

stream targets. As depicted in Fig. 5a, we demonstrated that AsAi and E-E6-transfected cells clearly presented an increase in p44 (pERK2) and p42 (pERK-1) levels, which were related to pPI3K levels (Fig. 4c).

Finally, we investigated whether differential PI3K and MAPKs activation could be related to proliferative rates. Significant proliferation rate differences within E6 variants-transfected cells could be observed (Fig. 5b). Proliferation rate (evaluated as number of cells in S phase) was higher in cells harboring the different E6 variants than in cells without E6 ( $p < 0.05$ ). Significant differences were also observed between cells with Af-E6 and cells with European or AsAi-E6 variants ( $p < 0.05$ ) (Table 1). Cells with the Af-E6 variant, presented the lowest proliferation rate ( $25.1 \pm 5.89\%$  of cells in S phase) within E6 containing cells, while cells with AsAi- and E-E6 had higher proliferation rates ( $83.8 \pm 12.3\%$  and  $69\% \pm 10.46\%$  of cells in S phase, respectively), in which elevated pPI3K and activated MAPKs levels were also found (Figs. 4c and 5a).

#### HPV18-E6 activates akt/PKB through its effect on hDlg

To confirm the contribution of E6 in the analyzed pathways, HPV18 E6 depletion was induced through small interfering RNA (siRNA) in HPV18 genome-containing HeLa cervical cancer cell line. The effect of E6 siRNAs on endogenous E6 mRNA expression was tested through a semiquantitative Reverse transcription (RT)-Polymerase chain



**Fig. 5.** (a) HPV18 E6 variants differentially modulate the MAPKs pathway. Levels of activated MAPKs (pERK1 and pERK2) were determined in MCF7 E6 transfected cells in Western blot. Lower panel shows immunoblots of the same membranes with anti-actin antibodies as protein-loading control. (b) A significant increase in proliferation rate is induced by Asian Amerindian and European E6. Representative histograms of DNA content show the effect on cell cycle distribution of E6 variant transfection (AsAi, E and Af), 48 h after cell cycle arrest. Arrows indicate S phase of the cell cycle.

reaction (PCR) method. We found that 18E6 siRNA specifically downregulated E6-encoding mRNA in HPV18-positive cells, while the 16 E6 siRNA had no effect on E6 expression (Fig. 6a). 18E6 siRNA decreased E6 mRNA levels in >70%. Next, we determined whether E6 depletion modified PKB and MAPKs pathways. The keratinocyte-immortalized cell line HaCaT was used as control in Western blot assay because it demonstrated high levels of the tested proteins. Fig. 6b shows that while both hDlg and pPTEN are maintained at low levels in HeLa untreated cells, 18E6 siRNA transfected cells restore hDlg and

activated PTEN proteins. In contrast, pPKB and ERKs (p42 and p44), which are highly expressed in HeLa untreated cells, were reduced in 18E6 siRNA transfected cells. These data directly correlate with our findings in E6 transfected cells. To evaluate the possible contribution hDlg on the regulation of these pathways by E6, impact on hDlg silencing on MCF7 cell line was evaluated through siRNA. The outcome of hDlg siRNA on endogenous hDlg expression was tested through the analysis of protein levels. Fig. 6c shows that hDlg-siRNA transfection clearly decreased hDlg levels in MCF-7 cells, with the consequence of a reduction of pPTEN and an increment in pPKB. These data suggest that the function of E6 on akt/PKB pathway modulation may be due, at least in part, to its ability to decrease the amount of hDlg.

**Table 1**  
Cell Cycle analysis of MCF-7 E6 transfected cells

E6 content	G0/G1	S	G2/M
MCF-7 pcDNA	63.14	12.56±2.7	24.29
MCF-7 Af	53.54±10.2	25.1±5.89*	21.36±2.8
MCF-7 E	23±3.1	69±10.46*,**	7.9±0.5
MCF-7 AsAi	12.31±2.1	83.89±12.3*,**	3.8±0.1

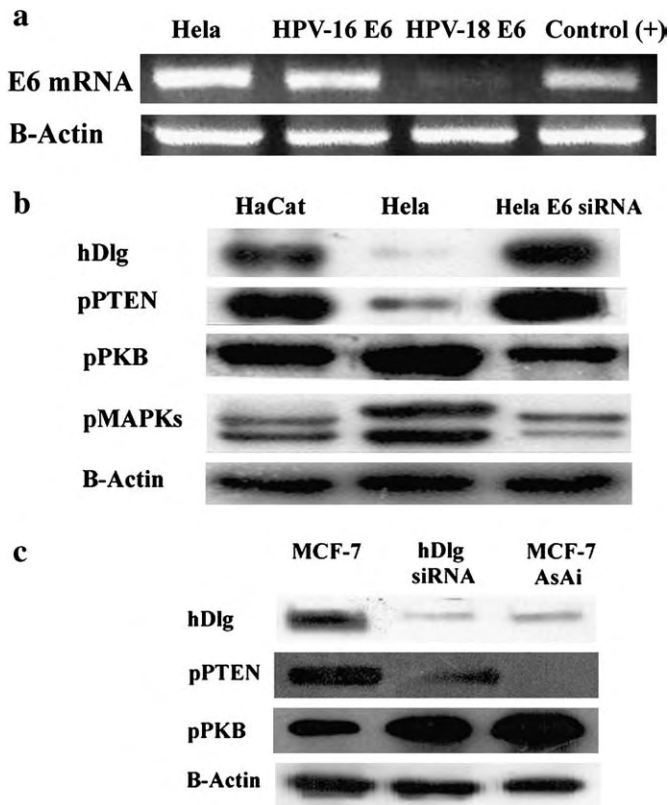
Percentage of cells in each phase of the cell cycle of MCF7 transfected with AsAi-, E-, or Af-E6. Data are shown as means±SE of 3 experiments per transfection.

\*  $P < 0.05$  (Student's *t*-test) as compared with MCF7-pcDNA.

\*\*  $P < 0.05$  (Student's *t*-test) as compared with MCF7-Af.

## Discussion

Akt/PKB comprises a cardinal node in diverse signaling cascades, participating in normal cellular physiology, as well as in various disease states including cancer. Different oncoproteins and tumor suppressors intersect in the Akt/PKB pathway (Knobbe and Reifemberger, 2003). PTEN, a tumor suppressor gene, is a critical controller of this pathway.



**Fig. 6.** Effect of HPV18 E6 siRNA in HeLa Cells. (a) mRNA E6 expression is downregulated by HPV18 E6-siRNAs. HeLa cells were transfected with the indicated siRNA. After 2 days of incubation, RNA was extracted and reverse-transcribed. cDNA samples were subjected to PCR. As positive control, HeLa DNA was PCR amplified; negative control is the PCR mixture without DNA. Intensities of E6 bands from E6 siRNA-treated cells were normalized to the  $\beta$ -actin band. (b) Impact of E6 silencing on PKB and MAPKs signaling pathways. Cell lysates of HPV18 E6-siRNA treated and untreated cells were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane. Western blots demonstrate that E6 silencing augments hDlg and phosphorylated PTEN in HeLa cells, while pPKB and pMAPKs levels are reduced. (c) Impact of hDlg silencing on PKB signaling pathway in MCF-7 cells. Western blots show that hDlg-siRNA transfection unambiguously reduces hDlg protein levels decreasing pPTEN; contrarily, pPKB is increased. Data is compared with MCF-7 cells transfected with AsAi-E6.

Although no PTEN mutations have been reported in cervical cancer, in some cases a downregulation has been observed in PTEN protein (Cheung et al., 2004; Tashiro et al., 1997). Some authors have explained this as a possible consequence of PTEN promoter methylation (Cheung et al., 2004). It was previously demonstrated that certain PTEN directed primers were also capable of amplifying pseudogenes (Zysman et al., 2002), with the possible consequence of overestimation of PTEN methylation. In this study, through the use of PTEN specific primers that amplify a region specific to PTEN promoter that is not homologous to the pseudogene, the absence of PTEN methylation in HPV genome-containing cervical cell lines was demonstrated. Furthermore, no differences in PTEN protein expression were found between cells treated and untreated with the DNA demethylating agent 5-Aza-2'-deoxycytidine, discarding regulation by methylation of other regions of PTEN promoter. This suggests that promoter methylation may be not a main PTEN-regulating mechanism in cervical cancer.

It has been proposed that high risk HPV E6 and E7 proteins contribute to Akt/PKB pathway activation, although a clear mechanism has not been elucidated (Pim et al., 2005). In this work, we proposed that one way in which E6 could regulate this pathway is through modulating PTEN, by means of its interaction with hDlg.

It is known that hDlg can bind PTEN (Adey et al., 2000); therefore, as a MAGUK family member hDlg could also be acting as a scaffold protein, stabilizing and promoting PTEN activation. In this study we

found a clear influence of E6 on activated PTEN levels, correlating with the proportion of hDlg protein observed in HPV18 E6 transfected cells. Higher amounts of hDlg and activated PTEN were observed in African E6 variant-harboring cells, compared with cells with AsAi or E-E6. This finding may be attributed to a lower amount of functional E6 protein present in cells with Af-E6. De la Cruz et al. (2005) reported that differences in E6 levels could be due to the presence of distinct proportions of splicing products; describing a higher proportion of E6\*I splicing product, compared with full-length E6 transcript, in African E6-transfected cells. Similar E6 transcriptional patterns were confirmed in this work. It is noteworthy that E6\*I spliced product would generate a shortened protein without the original PDZ binding domains, necessary for hDlg binding. Therefore the data obtained, regarding differences observed within variants particularly E6-Af, may be explained by a diminished proportion of full-length E6 protein or else by different interactions of Af-E6 protein.

A role of HPV18 E7 protein in Akt/PKB pathway activation has been proposed and is explained through a direct PP2A phosphatase inhibition (Pim et al., 2005). Nevertheless, a link between E6 and this pathway has not been described to date. This work shows that E6 effect on PTEN activation can reflect a direct outcome on Akt/PKB. Results show that while E6 variants did not affect total PKB levels, an increment in its phosphorylated form was observed in E6-harboring cells, compared to cells without E6. Moreover, slight differences are appreciated within variants, in which AsAi-E6 containing cells appear to present a higher amount of pPKB, followed by cells with the E isolate, with a lesser amount in Af-E6 containing cells. These findings correlate with the distinct proportions observed of phosphorylated PTEN. Thus, it is possible that E6 effect on Akt/PKB is due in part to its effect on hDlg.

PI3K reverses PTEN process, generating inositol phospholipids that trigger Akt/PKB phosphorylation. In cervical cancer, enhanced PI3K activation has been reported (Bertelsen et al., 2006). Nair et al. (2003) recognized that PI3K may possess a key role in transformation of HPV-infected cells, proposing that HPV16 E6 and E7 could be cooperating with PI3K for cell transformation, through the Notch-1 pathway activation. However, there are no previous evidences relating a straight E6 effect on PI3K activity. The results obtained in this work show that cells with E and AsAi-E6 variants presented a substantial increase in pPI3K. No effect on this enzyme was observed in cells with Af-E6, which may be the result of a minimal amount of E6 protein, or that amino acid variations contained in such an E6-variant, render it deficient for such activation. Therefore, we suggest that E6 is not only capable of modulating Akt/PKB through PTEN regulation, but that it may also exert an influence through PI3K activation. However, it is not clear which E6 mechanism could be acting on PI3K regulation.

With the large increase in pPI3K, together with the absence of activated PTEN occurring in cells with E and AsAi-E6, a higher proportion of activated PKB than the one observed in our system was expected. The answer to this query may be found in that the proportion of pPKB may be a result not only of activating kinases (PDK1, PDK2), but also of inactivating phosphatases (PP2A, STAT3) (Pim et al., 2005; Sun and Steinberg, 2002) that may be modulating the final proportion of activated pPKB.

It is widely known that a main target of PI3K is PKB. Nevertheless, PI3K may also activate other pathways independently. ERKs are the most importantly characterized MAPKs proteins in cell proliferation (Jorda et al., 2007). It has been shown that PI3K pathway disturbances block MAPK activation, suggesting a role for PI3K in MAPK function (Chai et al., 2007; Kranenburg et al., 1997; Roymans and Slegers, 2001; Wennstrom and Downward, 1999).

A link between HPV16 E6 and an increase in the activity of MAP kinases, specifically ERK1 and ERK2, has been previously established, with a differential effect for E6 variants (Chakrabarti et al., 2004). Such an E6 outcome was explained by means a Ras independent effect, involving Rap-1. Data presented here support an effect of HPV18 E6 on MAPKs that in contrast, may be due to PI3K modulation. In this work,



we specifically observed pERK1 (p42) and pERK2 (p44) upregulation in the presence of AsAi-E6 and E-E6, possibly owing to PI3K activation. Notwithstanding this, the participation of another pathway such as that proposed by Chakarabarti et al., (2004), is not discarded.

Even at the lowest rate, cells with Af-E6 showed an increment in proliferation above control cells. In these cells, no differences in pMAPKs or pPI3K levels were observed; therefore, while MAPKs may be participating in the observed increase in proliferation, other proliferative pathways may be affected by E6.

It is known that all HPV types are able to induce hyperproliferative lesions. This effect has been attributed to E6 and E7 proteins. Evidences that support a main role of E6 in cell proliferation highlights the effect of this protein on p53 degradation. Nevertheless, E6 is able to bind to a variety of proteins critical in cell cycle regulation, independently of p53, causing a shortening in G1 phase. For instance, it has been reported that E6 is able to release E2F1 due to the induction of pRB phosphorylation, inducing an increase in DNA synthesis (Malanchi et al., 2004). On the other hand, hDlg can form a complex with the adenomatous polyposis coli (APC) suppressor protein that stops cells in G1 (Ishidate et al., 2000). This checkpoint can be eliminated when E6 targets hDlg for its degradation. It is now shown that E6 also promotes a downregulation of PTEN activity, whose role is critical in controlling important proliferative pathways. In addition, we demonstrate that some HPV18 E6 variants can upregulate PI3K activity, which correlates with differences found in activated MAP kinases. Thus, the observed proliferative rates may be the result of several converging E6-altered pathways.

Correlations found in this work were confirmed through E6 silencing in HeLa cells. 18E6-siRNA treated HeLa cells, containing HPV18 genome, increased phosphorylated hDlg and pPTEN levels, at the same time as pPKB and activated MAPKs decreased. This result confirms the specific participation of E6 in modulating such pathways. Furthermore, siRNA-hDlg silencing in MCF-7 cell line resulted also in a decline of pPTEN and an increase pPKB, so is highly suggestive that E6 is modulating such pathways in part by its interaction with hDlg.

Differential regulation of members involved in Akt/PKB and MAPKs pathways due to HPV18E6 isolates, was found in this work. We now propose that hDlg interaction with E6 plays an important role in proliferative and survival pathway modulation. Future efforts should be carried out in order to establish variant oncoprotein dynamics with cellular proteins involved in other biological effects, including apoptosis. These data add to evidences disclosing that HPV intra-type variations can rebound in viral biological behavior.

## Materials and methods

### Cell cultures and transfection

C33A, and MCF-7 cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-F12, GIBCO-BRL) supplemented with 8% fetal bovine serum (FBS). Stable transfections were carried out in MCF-7 and C33A cell lines with 4 µg DNA from either vector alone (pcDNA3.1) or vectors harboring E6 variant genes from African (Af), European (E) and Asian Amerindian (AsAi) HPV18 isolates (De la Cruz et al., 2005). For stable selection, cells were treated 24 h after transfection with 0.8 mg ml<sup>-1</sup> of G418 in DMEM-F12 for 3 weeks to initiate analysis and resistant clones were cultured permanently with G418. E6 integrity and expression was analyzed in stable transfected cells by PCR amplification, sequencing, and RT-PCR.

### Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP)

The methylation status of PTEN promoter was determined in MCF-7, Caski, HeLa and SiHa cell lines, by DNA bisulfite modification followed by methylation-specific PCR, as previously described by Herman et al. (1996). Briefly, 1 µg of DNA in 100 µl of each sample was

denatured with freshly prepared NaOH at a final concentration of 0.2 M for 20 min at 42 °C. Freshly prepared 10 mM hydroquinone (Sigma) and 520 µl of 3 mM sodium bisulfite at pH=5 (Sigma), were both added and mixed. The sample was incubated at 55 °C for 16 h. Modified DNA was purified using Wizard DNA purification resin according to manufacturer (Promega) instructions and eluted in 50 µl of water. Modification was completed by NaOH treatment (final concentration 0.3 mM) for 10 min at room temperature, followed by ethanol precipitation. DNA was resuspended in water and used immediately or stored at -20 °C.

Bisulfite modified DNA (100 ng) was PCR-amplified with the following gene-specific primers (Zysman et al., 2002): Methylated PTEN promoter: 5'-TTTTTTCGGTTTTTCGAGGC-3' (sense), 5'-CAATCGCGTCCCAACGCCG-3' (antisense); unmethylated PTEN Promoter: 5'TTTGAGTGTTTGGGTTTTTGGT3' (sense), 5'CAACAATCATCCCAACACCA 3' (antisense).

The PCR amplification mixture contained 1× PCR buffer, dNTPs at 1.28 mmol each: primers (10 pmol Invitrogen), *TaqGold* polymerase (1 U; Applied Biosystems), and bisulfite-modified DNA (100 ng) or unmodified DNA (100 ng) in a final volume of 20 µl. DNA was amplified with the following steps for both amplification reactions: an initial 10 min denaturation at 94 °C, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 59 °C for 30 s, and 72 °C for 35 s, and a final elongation step of 7 min at 72 °C. Products were visualized in 2% agarose gel under Ultraviolet (UV) light. A gene was expected to be methylated whenever a band was present after amplification with the methylated set of primers, or with both methylated and unmethylated set of primers. Contrariwise, a gene was deemed unmethylated when a band was present after amplification with the unmethylated set in the absence of a band with the methylated set.

Influence of methylation in PTEN expression was analyzed by cell treatment with 0.75 µM of the methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine for 48 h. Treated and untreated cell lysates were analyzed by western blot with specific anti-PTEN antibodies.

### Western blot analysis

Total cellular proteins were extracted from transfected cells harvested from 75 cm<sup>2</sup> flask. Cell proteins from C33A and MCF-7 cell lines were extracted with 300 µl of RIPA lysis buffer [100 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1% aprotinin, and 1 mM PMSF (Sigma)]. Proteins were boiled for 5 min in sample buffer [125 mM Tris/HCl pH 6.8, 1% SDS, 2%-mercaptoethanol and 0.01% bromophenol blue], and then 40 µg of cell lysates were loaded onto SDS-PAGE gels (8–12%). After electrophoresis, proteins were transferred onto Hybond-C nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences) in a wet chamber for 1 h at 100 V. Membranes were then blocked with 1× TBS (1% skimmed milk and 0.1% Tween 20), followed by incubation with the respective primary antibody [hDlg, PTEN, pPTEN, PI3K, pPI3K, Akt/PKB, pAkt, Actin, ERK1/2 and pERKs (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)]. Membranes were incubated with Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and the levels of the corresponding proteins were visualized utilizing the ECL system (Amersham, Biosciences). Western blots were performed three times each to assure result reproducibility. Next, densitometric analysis of Western blots was carried out with NIH IMAGEN version 1.62. Means ± standard deviation (SD) are shown.

### Immunoprecipitation

MCF-7 cells transfected with E6 expression vector or the vector alone, were washed twice with ice-cold PBS and lysed with RIPA cold buffer (containing protease inhibitors). Afterwards, the supernatant was pre-cleaned with anti-mouse IgG/agarose for 2 h (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Anti-PTEN antibodies, anti-hDlg antibodies or anti-sheep control antibodies were incubated for 2 h at 4 °C with

Protein G-Agarose beds (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). 100  $\mu$ l of cell lysates (500  $\mu$ g/ml) were incubated with the antibody mixtures overnight at 4 °C. The immunoprecipitates were washed twice with lysis buffer, resuspended in Laemmli sample buffer, and submitted to Western blot with anti-hDlg or PTEN antibodies.

#### Flow cytometer

For cell cycle arrest, cells were grown in minimum essential medium (DMEM) plus fetal calf serum at a final concentration of 2% (400  $\times$  10<sup>3</sup> cells/well in a 6-well plate) for 12 h. After adding fresh medium with 10% SBF, the analysis was performed 48 h later. Cells were harvested by trypsinization and fixed in 70% ethanol overnight. Cells were then stained with 10 mg/ml propidium iodide (PI) for 1 h and analyzed for DNA content on a FACScan flow cytometer (Calibur Beckton Dickinson). Debris and aggregates were gated out during data acquisition, and 10,000 gated events were collected for each sample. Cell cycle analyses were performed for duplicate samples employing Cell QUEST software (Tree Star, Inc.). Results are expressed in percentage of cells in S-phase.

#### E6 and hDlg siRNA synthesis

The following desalted oligonucleotide were purchased from Invitrogen: HPV-18 E6 antisense 5'-GAG GTA TTT GAA TTT GCA TTT CCT GTC TC-3'; sense 5'-ATG CAA ATT CAA ATA CCT CTT CCT GTC TC-3' as reported by Yamato et al. (2006); and HPV-16 E6 antisense 5'-GAA TGT GTG TAC TGC AAG CTT CCT GTC TC-3'; sense 5'-GCT TGC AGT ACA CAC ATT CTT CCT GTC TC-3' (Jeong et al., 2007). hDlg antisense 5'-AAA TTC TCA ATC TCT GAT AAG CCT GTC TC-3'; sense 5'-AAC TTA TCA GAG ATT GAG AAT CCT GTC TC-3' (Laprise et al., 2004). Oligonucleotide-directed production of small RNA transcripts with T7 RNA polymerase has been previously described (Donzé and Picard, 2002). For each transcription reaction, 10 mmol template oligonucleotide was hybridized to the T7 promoter primer in DNA hybridization buffer, the mixture was incubated at 70 °C for 5 min. The template was filled in with Exo-Klenow (Ambion Inc, The RNA Company) in a 20  $\mu$ l reaction mixture and incubated at 37 °C for 30 min. For each siRNA template, two independent reactions were carried out to synthesize sense and antisense RNA strands. Independently synthesized sense and antisense transcription reactions were mixed together in a single tube and followed by incubation at 37 °C overnight. The resulting dsRNA carried 5' overhanging leader sequences that required removal prior to transfection, with a single-strand specific ribonuclease.

#### siRNA transfections

1  $\times$  10<sup>6</sup> HeLa cells were transfected with 100 nM of each siRNA (HPV-18 or HPV16-E6). Transfections were performed in 3 cm diameter dishes with Lipofectamine Plus (Gibco-BRL) according to manufacturer instructions. After 48 h of transfection, cells were processed to obtain RNA or protein. E6 transcript Integrity was tested by RT-PCR amplification. The same protocol was followed for hDlg siRNA transfection in MCF7 cell line save for using 150 nM of the respective siRNA.

#### RNA extraction and expression analysis

Total RNA was obtained from transfected cells by using TRIzol (Invitrogen Life Technologies) according to manufacturer's instructions. Samples were treated with 1 U DNase I (Gibco-BRL). The amount of RNA was determined by UV spectrophotometry and quality was assessed in 2% agarose gels. For cDNA preparation, 2  $\mu$ g total RNA was reverse-transcribed with random hexamers utilizing the Gene-Amp RNA PCR Kit system for RT-PCR (Applied Biosystems, ROCHE).

#### Statistical analysis

Data showing the effects of E6 variation of HPV18 in cell proliferation were expressed as means  $\pm$  SD, and significant differences were determined using Student's *t*-test.

#### Acknowledgments

This work was partially supported by grants from CONACYT Mexico (SALUD-2004-01-067 and Salud-2002-C01-6579/A1). We thank the Instituto Nacional de Cancerología, SS, Mexico City, for its continuous and valuable support. ADG is recipient of ICF-PUIS UNAM. A. C thanks CONACYT-México for supporting doctoral studies (grant 176656).

#### References

- Adey, N.B., Huang, L., Ormonde, P.A., Baumgard, M.L., Pero, R., Byreddy, D.V., Tavtigian, S.V., Bartel, P.L., 2000. Threonine phosphorylation of the MMAC1/PTEN PDZ binding domain both inhibits and stimulates PDZ binding. *Cancer Res.* 60, 35–37.
- Bertelsen, B.I., Steine, S.J., Sandvei, R., Molven, A., Laerum, O.D., 2006. Molecular analysis of the PI3K-AKT pathway in uterine cervical neoplasia: frequent PIK3CA amplification and AKT phosphorylation. *Int. J. Cancer* 118, 1877–1883.
- Bosch, F.X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C.J., Shah, K.V., 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol.* 55, 244–265.
- Chai, B., Li, J.Y., Zhang, W., Ammori, J.B., Mulholland, M.W., 2007. Melanocortin-3 receptor activates MAP kinase via PI3 kinase. *Regul. Pept.* 139, 115–121.
- Chakrabarti, O., Veeraraghavalu, K., Tergaonkar, V., Liu, T., Androphy, E.J., Stanley, M.A., Krishna, S., 2004. Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic Res. *J. Virol.* 78, 5934–5945.
- Cheung, T.H., Lo, K.W., Yim, S.F., Chan, L.K., Heung, M.S., Chan, C.S., Cheung, A.Y., Chung, T.K., Wong, Y.F., 2004. Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasms. *Gynecol. Oncol.* 93, 621–627.
- Dalstein, V., Riethmuller, D., Pretet, J.L., Le Bail, C.K., Sautiere, J.L., Carbillat, J.P., Kantelip, B., Schaal, J.P., Mouglin, C., 2003. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int. J. Cancer* 106, 396–403.
- De la Cruz, E., Mohar, A., Garcia-Carranca, A., Dueñas, A., Contreras-Paredes, A., Pérez-Cárdenas, E., Herrera, R., Lizano-Soberon, M., 2005. Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *J. Gen. Virol.* 86, 2459–2468.
- Donzé, O., Picard, D., 2002. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucl. Ac. Res.* 15, 30, e46.
- Downward, J., 2004. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 177–182.
- Granes, A., Adomeit, A., Heinze, R., Wetzker, R., Liebmann, C.A., 1998. Novel mitogenic signaling pathway of bradykinin in the human colon carcinoma cell line SW-480 involves sequential activation of a Gq/11 protein, phosphatidylinositol 3-kinase beta, and protein kinase Cepsilon. *J. Biol. Chem.* 273, 32016–32022.
- Grm, H.S., Banks, L., 2004. Degradation of hDlg and MAGIs by human papillomavirus E6 is E6-AP-independent. *J. Gen. Virol.* 85, 2815–2819.
- Haluska, F.G., Tsao, H., Wu, H., Haluska, E.S., Lazar, A., Goel, V., 2006. Genetic alterations in signaling pathways in melanoma. *Clin. Cancer Res.* 12, 2301s–2307s.
- Harima, Y., Sawada, S., Nagata, K., Sougawa, M., Ostapenko, V., Ohnishi, T., 2001. Mutation of the PTEN gene in advanced cervical cancer correlated with tumor progression and poor outcome after radiotherapy. *Int. J. Oncol.* 18, 493–497.
- Herman, J.G., Graff, J.R., Myohanen, S., Nelkin, B.D., Baylin, S.B., 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9821–9826.
- Hildesheim, A., Schiffman, M., Bromley, C., Wacholder, S., Herrero, R., Rodriguez, A., Bratti, M.C., Sherman, M.E., Scarpidis, U., Lin, Q.Q., Terai, M., Bromley, R.L., Buetow, K., Apple, R.J., Burk, R.D., 2001. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 315–318.
- Ishidate, T., Matsumine, A., Toyoshima, K., Akiyama, T., 2000. The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase. *Oncogene* 19, 365–372.
- Jeong, K.W., Kim, H.Z., Kim, S., Kim, Y.S., Choe, J., 2007. Human papillomavirus type 16 E6 protein interacts with cystic fibrosis transmembrane regulator-associated ligand and promotes E6-associated protein-mediated ubiquitination and proteasomal degradation. *Oncogene* 26, 487–499.
- Jorda, M.A., Vinyals, A., Marazuela, A., Cubillo, E., Olmeda, D., Valero, E., Cano, A., Fabra, A., 2007. Id-1 is induced in MDCK epithelial cells by activated Erk/MAPK pathway in response to expression of the Snail and E47 transcription factors. *Exp. Cell. Res.* 3, 2389–2403.
- Kammer, C., Tommasino, M.M., Syrjanen, S., Delius, H., Hebling, U., Warthorst, U., Pfister, H., Zehbe, I., 2002. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *Br. J. Cancer* 86, 269–273.

- Knobbe, C.B., Reifemberger, G., 2003. Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Pathol.* 13, 507–518.
- Kranenburg, O., Verlaan, I., Hordijk, P.L., Moolenaar, W.H., 1997. Gi-mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway involves a 100 kDa tyrosine-phosphorylated Grb2 SH3 binding protein, but not Src nor Shc. *EMBO J.* 16, 3097–3105.
- Kurose, K., Zhou, X.P., Araki, T., Eng, C., 2000. Biallelic inactivating mutations and an occult germline mutation of PTEN in primary cervical carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 29, 166–172.
- Laprise, P., Viel, A., Rivard, N., 2004. Human Homolog of Disc-large is required for Adherens junction assembly and differentiation of human intestinal Epithelial cells\*. *J. Biol. Chem.* 279, 10166–19157.
- Lawlor, M.A., Alessi, D.R., 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses. *J. Cell Sci.* 114, 2903–2910.
- Lee, S.S., Weiss, R.S., Javier, R.T., 1997. Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6670–6675.
- Lee, J.S., Choi, Y.D., Lee, J.H., Nam, J.H., Choi, C., Lee, M.C., Park, C.S., Kim, H.S., Min, K.W., 2006. Expression of PTEN in the progression of cervical neoplasia and its relation to tumor behavior and angiogenesis in invasive squamous cell carcinoma. *J. Surg. Oncol.* 93, 233–240.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.L., Puc, J., Miliaris, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H., Parsons, R., 1997. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943–1947.
- Lin, H.T., Steller, M.A., Aish, L., Hanada, T., Chishti, A.H., 2004. Differential expression of human Dlg in cervical intraepithelial neoplasias. *Gynecol. Oncol.* 93, 422–428.
- Lizano, M., Berumen, J., Guido, M., Casas, L., Garcia-Carranca, A., 1997. Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 1227–1231.
- Ma, Y., Wei, Y.S.J., Lin, Y.C., Lung, J.C., Chang, T.C., Whang-Peng, J., Liu, J.M., Yang, D.M., Yang, W. K., Shen, C.Y., 2000. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene* 19, 2739–2744.
- Malanchi, I., Accardi, R., Diehl, F., Smet, A., Androphy, E., Hoheisel, J., Tommasino, M., 2004. Human papillomavirus type 16 E6 promotes retinoblastoma protein phosphorylation and cell cycle progression. *J. Virol.* 78, 13769–13778.
- Mantovani, F., Banks, L., 2001. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20, 7874–7887.
- Mantovani, F., Massimi, P., Banks, L., 2001b. Proteasome-mediated regulation of the hDlg tumour suppressor protein. *J. Cell. Sci.* 114, 4285–4292.
- Massimi, P., Gammoh, N., Thomas, M., Banks, L., 2004. HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 23, 8033–8039.
- Mei, Q.I., Ann, E., Anderson, D.C., Shishinn, S., Auburn, K.J., 2005. Indole-3-carbinol prevents PTEN loss in cervical cancer *in vivo*. *Mol. Med.* 11, 59–63.
- Motoyama, S., Ladines-Llave, C.A., Villanueva, L.S., Maruo, T., 2004. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J. Med. Sci.* 50, 9–19.
- Nair, P., Somasundaram, K., Krishna, S., 2003. Activated Notch1 inhibits p53-induced apoptosis and sustains transformation by human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes through a PI3K-PKB/Akt-dependent pathway. *J. Virol.* 77, 7106–7112.
- Pedrero, J.M., Carracedo, D.G., Pinto, C.M., Zapatero, A.H., Rodríguez, J.P., Nieto, C.S., 2005. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PKB/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 114, 242–248.
- Pim, D., Massimi, P., Dilworth, S.M., Banks, L., 2005. Activation of the protein kinase B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A. *Oncogene* 24, 7830–7838.
- Roymans, D., Slegers, H., 2001. Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *Eur. J. Biochem.* 268, 487–498.
- Sansal, I., Sellers, W.R., 2004. The biology and clinical relevance of the PTEN Tumor suppressor Pathway. *J. Clinical Oncol.* 14, 2963–2964.
- Stoppler, M.C., Ching, K., Stoppler, H., Clancy, K., Schlegel, R., Icenogle, J., 1996. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J. Virol.* 70, 6987–6993.
- Su, T.H., Chang, J.G., Perng, I.I., Chang, C.P., Wel, H.J., Wang, N.M., Tsai, C.H., 2000. Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 76, 193–199.
- Sun, S., Steinberg, B.M., 2002. PTEN is a negative regulator of STAT3 activation in human papillomavirus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 83, 1651–1658.
- Tak-Hong, C., Wing-Kit, L.K., So-Fan, Y., Kit-Ying, L.C., Mei-Sze, H., Chun-Sing, C., Yu-Kiu, A.C., Kwok-Hung, T.C., Yick-Fu, W., 2004. Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecol. Oncol.* 93, 621–627.
- Tashiro, H., Blazes, M.S., Wu, R., Cho, K.R., Bose, S., Wang, S.L., Li, J., Parsons, R., Ellenson, L.H., 1997. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res.* 57, 1940–1935.
- Thomas, M., Glaunsinger, B., Pim, D., Javier, R., Banks, L., 2001. HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific protein recognition and degradation. *Oncogene* 20, 5431–5439.
- Tsugawa, K., Jones, M.K., Sugimachi, K., Sarfeh, I.J., Taarnawski, A.S., 2002. Biological role of phosphatase PTEN in cancer and tissue injury healing. *Front. Biosci.* 7e, 245–251.
- Valiente, M., Andres-Pons, A., Gomar, B., Torres, J., Gil, A., Tapparel, C., Antonarakis, S.E., Pulido, R., 2005. Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases. *J. Biol. Chem.* 280, 28936–28943.
- Watson, R.A., Rollason, G.T.P., Reynolds, M., Murray, P.G., Banks, L., Roberts, S., 2002. Changes in expression of the human homologue of the *Drosophila* discs large tumour suppressor protein in high-grade premalignant cervical neoplasias. *Carcinogenesis* 23, 1791–1796.
- Wells, V., Downward, J., Mallucci, L., 2007. Functional inhibition of PI3K by the bGBP molecule suppresses Ras-MAPK signaling to block cell proliferation. *Oncogene* 26, 7709–7714.
- Wennstrom, S., Downward, J., 1999. Role of phosphoinositide 3-kinase in activation of ras and mitogen-activated protein kinase by epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4279–4288.
- Yaginuma, Y., Yamashita, T., Ishiya, T., Morizaki, A., Katoh, Y., Takahashi, T., Hayashi, H., Ishikawa, M., 2000. Abnormal structure and expression of PTEN/MMAC1 gene in human uterine cancers. *Mol. Carcinog.* 27, 110–116.
- Yamato, K., Fen, J., Kobuchi, H., Nasu, Y., Yamada, T., Nisishihara, T., Ikeda, Y., Kizaki, M., Yoshinouchi, M., 2006. Induction of cell death in human papillomavirus 18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. *Cancer Gene Ther.* 13, 234–241.
- Yang, H.J., Liu, V.W., Wang, Y., Tsang, P.C., Ngan, H.Y., 2006. Differential DNA methylation profiles in gynecological cancers and correlation with clinico-pathological data. *BMC Cancer* 6, 212.
- Zhang, Y., Dasgupta, J., Ma, R.Z., Bankuman, S.L., Thomas, M., Chen, X.S., 2007. Structures of a human Papillomavirus (HPV) E6 polypeptide bound MAGUK Proteins: mechanisms of targeting tumor suppressors by a high risk HPV oncoprotein. *J. Virol.* 81, 3618–3626.
- zur Hausen, H., 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2, 342–350.
- Zysman, M.A., Chapman, W.B., Bapat, B., 2002. Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor suppressor gene. *Am. J. Pathol.* 160, 795–800.