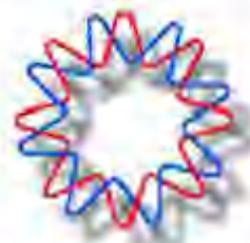


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**INFLUENCIA DE LA ONCOPROTEÍNA E5 DE
PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16 SOBRE LA
PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR Y SU
POSIBLE DEPENDENCIA CON EL RECEPTOR
AL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL EN
LA TRANSFORMACIÓN CELULAR.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

ADOLFO PEDROZA SAAVEDRA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MA. DE LOURDES GUTIÉRREZ XICOTENCATL

CUERNAVACA, MOR.

OCTUBRE , 2010



**Instituto Nacional de
Salud Pública**



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.

Dedicatorias

De entre las cosas que considero más valiosas en esta vida es la de tener una familia, ya que gracias a ella uno comienza el proceso de formación, además de constituir un apoyo incondicional en los momentos difíciles. Por lo anterior, me es pertinente dedicar esta tesis a mi familia, que ha estado siempre cerca de mi, en el pasado y/o en el presente y que de alguna manera ha influido en mi ser y hacer.

Con especial afecto y cariño para mis padres, Flavia Luisa y Adolfo (†),

a mis abuelos maternos, Roberto (†) y Lupe (†),

a mis abuelos paternos, Carmen (†) y Lorenzo(†),

a mis hermanos, Martha Patricia, Lorenzo y Fernando, y a sus correspondientes parejas, Rodolfo, Margarita y Esther.

a mis tíos, Paty(†), Beto, Alejandro(†), Paco y Celia(†),

A la nueva generación de la familia, mis sobrinos: Brandon Francisco, Areli Ethel, Carlos Fernando, Karen Beatriz, Alejandra, Alejandro Alberto, Luis Fernando, Ricardo Aarón y Sergio Adolfo.

Agradecimientos

Es justo hacer la aclaración de que el orden propuesto para estos agradecimientos no trata de establecer necesariamente una situación jerárquica, sino más bien hay que pensar en que todas las personas a quienes les agradezco, de alguna u otra forma me manifestaron siempre su apoyo y confianza.

A los integrantes de mi Comité Tutorial quiero agradecerles el haber cedido parte de su valioso tiempo y conocimientos para asesorarme en mi trabajo:

A la Dra. Ma. de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl, Tutor de esta tesis, en cuyo laboratorio 5 Planta Baja (L5PB) del Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública (CISEI-INSP) realicé todos los experimentos de esta tesis. Además, con los resultados de esta tesis y contando con su apoyo, tuve la oportunidad de asistir a eventos científicos nacionales e internacionales.

Al Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva, integrante de mi Comité Tutorial.

Al Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles, integrante de mi Comité Tutorial.

Al Dr. Fernando Esquivel Guadarrama y al Dr. Eric W.F. Lam por su apoyo en mi trabajo, por sus oportunos comentarios y por su coautoría en el artículo publicado.

A los Doctores que junto con los de mi Comité Tutorial, han formado parte del jurado en los exámenes tutorial ampliado y/o de titulación: Dra. Susana López Charreton, Dra. Isabel Soto Cruz, Dra. Leonor Pérez Martínez, Dr. José Efraín Garrido Guerrero y Dr. Jean Louis Charli Casalonga.

Al Dr. Agustín López Munguía Canales y al Dr. Jean Louis Charli Casalonga por su apoyo para titularme.

A Gloria Villa, Toño e Ing. Jalil del IBT.

A las autoridades del CISEI-INSP, en particular al Dr. Mario Henri Rodríguez López por el apoyo para la realización de mi trabajo de tesis en dicho Instituto.

A mis compañeros de laboratorio: Lilia Chihu, por su apoyo siempre incondicional; a Mine, Ana, Tanya, Juan, Ernesto, Humberto, Claudia, Prisma, Rita y Doris.

A los investigadores y todo el personal del CISEI-INSP que de alguna u otra forma se relacionaron con este trabajo.

A los financiamientos otorgados por CONACYT-SEP (38906-M) y la Fundación Miguel Alemán.

“Dios no juega a los dados”

“Lo más incomprensible del mundo es que sea comprensible”

“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir”

“Hay dos formas de vivir una vida, la primera es pensar que nada es un milagro; la segunda es pensar que todo es un milagro”

Albert Einstein (1879-1955).

RESUMEN

En México, el cáncer cérvico uterino ocupa el primer lugar como causa de muerte por neoplasias en la mujer. El principal agente etiológico asociado a este padecimiento es el grupo de los papilomavirus humanos (HPVs), siendo los tipos de alto riesgo 16 y 18 los más frecuentes. Los oncogenes **E6** y **E7** de HPV16 inmortalizan queratinocitos humanos y requieren de los oncogenes celulares **c-ras** y **c-fos** para transformar células primarias, además de interactuar con o alterar la actividad de varias proteínas como las implicadas en ciclo celular: p53, pRb, p21^{Waf1}, ciclina A, ciclina E y CDK2. Posteriormente se estableció que **E5** es otro oncogén de HPV16, cuyo poder transformante se asocia al factor de crecimiento epidermal (EGF) y su receptor (EGF-r), incrementando la vida media de este último, en parte debido a la interacción de E5 con la subunidad de 16 kDa de la ATPasa protónica localizada en endosomas. La presencia de E5 en las células también se asocia con una mayor actividad de MAPKs, mayor expresión de los protooncogenes relacionados con crecimiento y proliferación **c-fos** y **c-jun**, y con la disminución de la expresión del inhibidor de CDKs p21^{Waf1}, fenómenos que finalmente pueden favorecer la progresión del ciclo celular. Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular por el cual E5 regula el ciclo celular y si ello permite el inicio del proceso de transformación, por lo que en esta tesis se investigó si el oncogén **E5** de HPV16 altera la progresión del ciclo celular y si este proceso es dependiente de EGF y su receptor.

Para desarrollar esta tesis, se utilizaron células de ratón 3T3, EGFR (3T3 que sobreexpresan EGF-r humano), y EGFR transfectadas establemente con **E5** de HPV16. Con las líneas celulares obtenidas, se realizaron curvas de crecimiento, crecimiento en agar suave y análisis de ciclo celular por citometría de flujo (FACS) para determinar la capacidad transformante de **E5**. Los niveles de las proteínas asociadas a ciclo celular, como ciclinas A, D1, D2 y D3, los inhibidores de CDKs p21^{Waf1} y p27^{Kip1}, o de las proteínas pRb, Grb2, EGF-r y EGF-r activada (ésta última detectada con un anticuerpo anti-fosfotirosinas) se determinaron por Western blot. Específicamente, para la disección de las posibles vías por las que la proteína E5 ejerce su efecto sobre la proteína p27^{Kip1}, se emplearon los inhibidores tirfostina AG1478 (inhibidor específico de la autofosforilación de EGF-r) y LY294002 (inhibidor específico de PI3K) o cicloheximida para calcular la vida media de p27^{Kip1}.

Los resultados mostraron que las células que expresan a E5 y sobreexpresan al EGF-r (EGNE5) tuvieron una capacidad de transformación reducida en ausencia de EGF (razón 11 vs. 88 de las células control); sin embargo, en presencia de EGF se reestableció la capacidad transformante de **E5** (razón 128 vs. 54 de las células control). Por otro lado, las células con E5

pero sin EGF-r sobreexpresado, fueron incapaces de formar colonias en agar, tanto en presencia como en ausencia de EGF (5.5 y 1.5 colonias, respectivamente). Al calcular el tiempo de duplicación se observó que las células EGNE5 fueron las que tuvieron la mayor diferencia en su tiempo de duplicación, disminuyendo de 21.3 h (- EGF) hasta 18.5 h (+EGF), lo cual se relacionó con un incremento de hasta un 40% de células en fase S cuando se estimulan persistentemente con EGF, en comparación con las que no expresan E5.

Mediante el análisis de proteínas asociadas con ciclo celular se observó alteración de los niveles de la proteína p27^{Kip1}, que mostró una reducción en su vida media en presencia de E5 en comparación con células control (18.4 vs. 12.7 h) y este efecto se incrementó en presencia de EGF (12.8 vs. 3.6 h).

Las células EGNE5 mostraron niveles menores de receptor que las células control, pero éste se mantuvo activo por mayor tiempo, efecto que correlacionó con una mayor actividad de Grb2 (incremento de Grb2 fosforilada). La inhibición de la actividad del receptor causó también la inactivación de Grb2 y la inhibición de las señales a partir de E5 que regulan negativamente los niveles de p27^{Kip1}. Por otro lado, la inhibición de PI3K sugiere que la regulación de p27^{Kip1} por E5 está dada principalmente por la vía de las MAPKs y en la que la oncoproteína Ras tiene un papel importante.

Estos resultados sugieren que E5 y el EGF-r cooperan para incrementar la entrada de un número mayor de células al ciclo celular y su progresión, a través de regular los niveles de la proteína p27^{Kip1}, lo que pudiera ser un mecanismo por medio del cual E5 lleva a cabo su actividad oncogénica y prepare las condiciones idóneas para permitir la permanencia del papilomavirus en la célula y la expresión de sus principales oncogenes **E6** y **E7**.

ABSTRACT

Cervical cancer is the first cause of death by neoplasia in women in Mexico. The main aetiological agent associated to this illness is the human papillomaviruses (HPVs), being the high risk types 16 and 18 the most frequently present in this cancer. The **E6** and **E7** oncogenes from HPV16 immortalize human keratinocytes and require **c-ras** and **c-fos** oncogenes to transform primary cells. In addition these oncoproteins are able to interact with or altering the activity of several proteins important in cell cycle regulation such as p53, pRb, p21^{Waf1}, cyclin A, cyclin E and CDK2. Now, it has been established that **E5** from HPV16 is other oncogene, whose transforming activity is associated to the epidermal growth factor (EGF) and its receptor (EGF-r), increasing the half-life of the receptor through the interaction of the E5 protein with the 16-kDa subunit of the protonic ATPase located at the endosomes. The presence of E5 protein in the cells also is associated with high activity of MAPKs, increased expression of **c-fos** and **c-jun**, and to the decreased expression of p21^{Waf1} protein (CDKs inhibitor), phenomena that finally can favor the progression of the cell cycle. However, the molecular mechanism by which E5 regulates the cell cycle is not very well understood, although it seems that E5 allows the beginning of the transformation process. For this reason, in this thesis it was investigated the role of the **E5** oncogen from HPV16 in the progression of the cell cycle and if this process is dependent on EGF and its receptor.

To develop this thesis 3T3 and EGFR (3T3 that over-expresses human EGF-r) mouse cells were used and the EGFR cells transfected with **E5** from HPV16. To determine the transforming capacity of **E5**, the cell lines obtained were used to carry out cell growth curves, growth in soft agar and analysis of cell cycle by flow cytometry (FACS). The level of proteins associated to cell cycle, like cyclins A, D1, D2 and D3, the CDKs inhibitors p21^{Waf1} and p27^{Kip1}, or proteins pRb, Grb2, EGF-r and activated EGF-r (by tyrosin phosphorylation) were determined by Western blot. Specifically, to elucidate the pathways through which the E5 protein exerts its effect over the p27^{Kip1} protein, we used the inhibitors tyrfostin AG1478 (EGF-r autophosphorylation specific inhibitor) and LY294002 (PI3K specific inhibitor) or cycloheximide to calculate p27^{Kip1} protein half-life. Our results showed that the E5- and EGF-r-expressing cells (EGNE5) had a reduced capacity of transformation in the absence of EGF (ratio 11 vs. 88 of control cells); however, in the presence of EGF the transforming capacity of E5 was reestablished (ratio 128 vs. 54 of control cells). When calculating the duplication time, it was observed that EGNE5 cells presented the higher difference in their time of duplication when comparing in the absence (21.3 h) and in the presence (18.5 h) of EGF. This results correlated

with an increase of up to 40% of the cell cycle S phase when cells were stimulated persistently with EGF, in comparison to cells that do not express E5. Cell cycle protein analysis by Western blot showed alteration of p27^{Kip1} protein levels, which showed a reduce half-life in the presence of E5 in comparison with control cells (18.4 vs. 12.7 h) and this effect was increased in the presence of EGF (12.8 vs. 3.6 h). On the other hand, EGNE5 cells showed lower levels of receptor than control cells, but its activity was kept for longer time in the E5 expressing cells that in the controls. This E5 effect correlated with an increased activity of the Grb2 protein (measured by phosphorylation). Inhibition of EGF receptor activity by tyrfostin AG1478 also caused the inactivation of Grb2 and the inhibition of the signals from E5 that regulate negatively the levels of p27^{Kip1} protein. In contrast, the inhibition of PI3K suggests that the regulation of p27^{Kip1} by E5 is mainly through the MAPKs pathway, in which the Ras oncoprotein has an important role. These results suggest that E5 and the EGF-r cooperate to increase the entrance of cells to the cell cycle and its progression, through regulating the levels of p27^{Kip1} protein. This could be a mechanism by means of which **E5** carries out its oncogenic activity and prepares the suitable conditions to allow the permanence of papillomavirus in the cell and the main expression of **E6** and **E7** oncogenes.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
EL CÁNCER CERVICAL	1
1) EL CÁNCER CERVICAL EN EL MUNDO	1
2) EL CÁNCER CERVICAL EN MÉXICO.....	2
3) LOS PAPILOMAVIRUS HUMANOS (HPVs) Y EL DESARROLLO DE CÁNCER CERVICAL	2
4) LESIONES PRECURSORAS DE CÁNCER CERVICAL	4
5) GENÉTICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y CICLO DE VIDA DE LOS PAPILOMA- VIRUS.....	6
6) LAS PROTEÍNAS DE LOS HPVs	9
a) Las proteínas E1 y E2.....	9
b) La proteína E1 ^{E4}	9
c) La proteína E5	10
d) La proteína E6	13
e) La proteína E7	13
f) Las proteínas L1 y L2	15
7) MODELO DE ASOCIACIÓN ENTRE INFECCIÓN POR HPV Y DESARROLLO DE CÁNCER CERVICAL.....	15
BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR RELACIONADA A CÁNCER CERVICAL.....	17
1) RECEPTORES TIROSÍNA-CINASAS, RAS, MAPKs y PI3K	17
a) Receptores tirosina-cinasas (RTKs)	17
b) El receptor al factor de crecimiento epidermal (EGF-r).....	18
c) El papel de EGF-r en oncología.....	20
2) LAS PROTEÍNAS RAS	21
3) LA CASCADA DE LAS MAP CINASAS (MAPKs)	23
4) LA VIA DE LA PI3K.....	24
CICLO CELULAR Y SU REGULACIÓN.....	25
1) LA PROTEÍNA p27 ^{Kip1} Y SU REGULACIÓN	27

2) CARCINOGENÉESIS Y p27 ^{Kip1}	29
II. MARCO TEÓRICO	33
III. HIPÓTESIS.....	35
IV. OBJETIVO GENERAL.....	36
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	37
1) CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pcDNA3-E5	37
2) SECUENCIA PARCIAL DEL FRAGMENTO DE 1.22 kpb CLONADO EN pcDNA3	38
3) LÍNEAS CELULARES Y TRANSFECCIONES	39
4) PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL Y <i>NORTHERN BLOT</i>	40
5) ANÁLISIS DEL TRANSCRITO DE <i>E5</i> MEDIANTE RT-PCR	41
6) ENSAYO DE CRECIMIENTO EN AGAR SUAVE	41
7) ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR	42
8) ANÁLISIS DE CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	42
9) TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS CON CICLOHEXIMIDA (CHX)	43
10) CÁLCULO DE LA VIDA MEDIA DE p27 ^{Kip1} DEL EXPERIMENTO CON CHX	43
11) TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS CON TIRFOSTINA AG1478.....	44
12) TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS CON EL INHIBIDOR DE PI3K, LY294002..	44
13) ANÁLISIS MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i>	45
VII. RESULTADOS	47
1) ANÁLISIS DE LOS TRANSCRITOS DE <i>E5</i> DE HPV16 EN LAS CÉLULAS TRANSFECTADAS, MEDIANTE <i>NORTHERN BLOT</i> Y RT-PCR.....	47
2) ACTIVIDAD TRANSFORMANTE DEL ONCOGÉN <i>E5</i> DE HPV16	49
3) LA DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS EN LAS FASES DEL CICLO CELULAR ES ALTERADA POR LA PRESENCIA DE <i>E5</i> DE HPV16 Y EGF	51

4) E5 DE HPV16 ES CAPAZ DE MODIFICAR LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA p27 ^{Kip1} EN LAS CÉLULAS ESTIMULADAS CON EGF	52
5) E5 REGULA NEGATIVAMENTE LOS NIVELES DE p27 ^{Kip1} EN QUERATINOCITOS	54
6) E5 DE HPV16 MANTIENE BAJOS LOS NIVELES DE p27 ^{Kip1} EN ALTA CONFLUENCIA CELULAR Y EN PRESENCIA DE EGF	55
7) LA ONCOPROTEÍNA E5 DE HPV-16 MODULA NEGATIVAMENTE LOS NIVELES DE p27 ^{Kip1} A TRAVÉS DE LA REDUCCIÓN DE SU VIDA MEDIA	57
8) LA REGULACIÓN NEGATIVA DE LOS NIVELES DE p27 ^{Kip1} POR E5 DE HPV16 NO ESTÁ DADA A NIVEL TRANSCRIPCIONAL	58
9) LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA EGF-r SON REGULADOS NEGATIVAMENTE EN CÉLULAS QUE EXPRESAN E5, PERO LA ACTIVIDAD DE DICHO RECEPTOR Y LOS NIVELES BAJOS DE p27 ^{Kip1} SE MANTIENEN POR MUCHO MÁS TIEMPO	60
10) E5 MODIFICA LOS NIVELES DEL EGF-r Y MANTIENE ALTA LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR A LARGO PLAZO	61
11) LA REGULACIÓN POR E5 DE LOS NIVELES DEL RECEPTOR A EGF NO ES A NIVEL TRADUCCIONAL, SINO MÁS BIEN A UNO POSTRADUCCIONAL.....	62
12) LA ACTIVIDAD DE E5 SOBRE P27 ^{Kip1} DEPENDE ESPECÍFICAMENTE DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN A PARTIR DEL RECEPTOR A EGF.....	63
13) LA INHIBICIÓN DE PI3K FAVORECE LA DEGRADACIÓN DE p27 ^{Kip1} MEDIADA POR E5 DE HPV16.....	65
VIII. DISCUSIÓN	67
IX. CONCLUSIONES.....	72
DESCRIPCIÓN DEL MODELO	73
X. PERSPECTIVAS.....	79
XI. BIBLIOGRAFÍA	81
XII. ANEXO I.	
ARTÍCULO PUBLICADO DERIVADO DEL TRABAJO DE ESTA TESIS	97

I. INTRODUCCIÓN

EL CÁNCER CERVICAL

1) EL CÁNCER CERVICAL EN EL MUNDO.

El cáncer cervical (CC) es actualmente un problema de salud pública de alta prioridad. Internacionalmente, los casos de CC ocupan el 5.1% de todos los cánceres reportados anualmente. Según datos proporcionados por GLOBOCAN 2002, se diagnosticaron a nivel mundial aproximadamente 493,243 nuevos casos de CC, correspondiendo 409,404 casos nuevos a países subdesarrollados, por lo que se sitúa como el segundo cáncer más común entre mujeres que viven en esos países (Ferlay *et al.*, 2004; WHO-World, 2010).

En al menos un tercio de los países del mundo, el CC es el cáncer más común en las mujeres. En cerca del 60% de los países, principalmente en los subdesarrollados, el CC se sitúa entre el primer o segundo sitio. En contraste, en los países desarrollados, este tipo de cáncer se sitúa en el quinto lugar o más allá. Sin embargo, en mujeres menores de 45 años se ha identificado que hasta el 90% de todos los países, incluyendo desarrollados y subdesarrollados, el CC permanece como uno de los tres principales cánceres (Bosch, 2008; WHO-World, 2010). El CC tiene a nivel mundial una incidencia promedio estandarizada por edad que varía desde 10.3 por cada 100,000 mujeres en países desarrollados, hasta 19.1 por cada 100,000 mujeres en países subdesarrollados y un pico de incidencia de 42.7 por cada 100,000 mujeres en África oriental (Ferlay *et al.*, 2004).

En lo que respecta a Latinoamérica, el CC también ocupa el segundo lugar (sólo después del cáncer de mama) con un estimado en el año 2002 de 72,000 casos nuevos (16.6% de todos los cánceres) y 33,000 muertes (13.9% de las muertes por cáncer). Latinoamérica concentra el 14.6% de los casos nuevos de CC a nivel mundial y el 11.9% de las muertes por dicho cáncer. La tasa de incidencia promedio (29.2/100,000 mujeres) es casi el doble de la reportada a nivel mundial (16.2), aunque varios países sobrepasan dicha cifra como Haití (87.3), Bolivia (55.0), Paraguay (53.2) y Perú (48.2) o tienen una menor como Puerto Rico (8.8), Bahamas (16.7), Uruguay (18.8) Cuba (20.2) y Costa Rica (21.5). Brasil contribuye con el mayor número de casos (27.3% del total regional), seguido por México (17.4%) y Colombia (9.5%) (WHO-World, 2010).

2) EL CÁNCER CERVICAL EN MÉXICO.

En México, el CC es un grave problema de salud pública. México contribuye con el 17.4% de todos los casos reportados a nivel Latinoamérica, con una tasa de incidencia ajustada por edad de 29.5 (por 100,000 mujeres/año), muy por encima de la tasa a nivel mundial (16.5) (WHO-Mexico, 2010).

México tiene una población de 37.45 millones de mujeres con edades de 15 años o más que están en riesgo de desarrollar cáncer cervical. Los cálculos más recientes indican que cada año se diagnostican 12,516 mujeres con CC y que 5,777 mueren por esta enfermedad (equivalente a la muerte de una mujer cada hora y media), colocando al CC como el primer cáncer más frecuente entre mujeres mexicanas en general, y también el primero en mujeres en edad productiva, entre 15 y 44 años. Según predicciones, para el año 2025 se espera la duplicación de los casos diagnosticados (a 24,730) y de las muertes (a 12,225) de mujeres con cáncer cervical (WHO-Mexico, 2010).

Se calcula que en México, alrededor del 9.4% de las mujeres de la población general son portadoras de una infección por papilomavirus humano (HPV) cervical a un tiempo dado, y que el 67.5% de los cánceres cervicales invasivos se atribuyen a los HPVs 16 o 18 (WHO-Mexico, 2010).

La mortalidad y la alta tasa de incidencia de CC detectados en etapas tardías son evidencia indirecta del bajo impacto del Programa de Tamizaje de Cáncer Cervical Nacional Mexicano (CCSP), sobre todo porque el 90% de estos casos deberían ser detectados usando la prueba de Papanicolaou (Pap) (National Cancer Institute Workshop, 1989). La tendencia actual para el tamizaje es la de usar pruebas colaterales como confirmatorias o complementarias a la del Pap para diagnosticar un CC o lesiones precursoras, pruebas entre las que se encuentran la de tipificación de HPV (Flores *et al.*, 2003).

3) LOS PAPILOMAVIRUS HUMANOS (HPVs) Y EL DESARROLLO DE CÁNCER CERVICAL.

Actualmente existe gran cantidad de evidencia, que indica que la infección con los HPVs adquiridos sexualmente es el factor de riesgo primario para el desarrollo de CC y juega un papel central en la carcinogénesis cervical (Palefsky *and* Holly, 1995). La infección tanto en mujeres como en hombres está claramente relacionada a la actividad sexual (Bauer *et al.*, 1991; Ho *et al.*, 1998). Para las mujeres, los factores de riesgo más importantes para la infección por HPV y

el desarrollo de una patología detectable son el número de parejas sexuales a lo largo de la vida y el inicio temprano de la actividad sexual. Aunque las mujeres son las que llevan el peso de las displasias y el cáncer, los carcinomas relacionados a HPV de la mucosa anal son relativamente frecuentes en hombres que tienen sexo con hombres (Goldstone *et al.*, 2001), y el porcentaje parece estar incrementando. Un tercer grupo de riesgo para infecciones severas por HPV son los neonatos. En el nacimiento, los neonatos adquieren algunas veces los HPVs tipos 6 y 11 del canal de nacimiento infectado de la madre.

Los argumentos que apoyan esta asociación causal entre CC y HPV, son que entre el 85% y 100% de las muestras de CC y neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) II-III tienen DNA de HPV, y que la asociación entre la infección por HPV y CC es específica a un número limitado de tipos de HPVs oncogénicos encontrados en el tracto genital (Koutsky *et al.*, 1992). Ahora existe gran evidencia que demuestra que los HPVs tienen las herramientas moleculares necesarias para causar cáncer. Se han publicado asociaciones fuertes y consistentes entre la infección por HPV y CC a partir de estudios epidemiológicos realizados en todo el mundo. Los estudios prospectivos de la infección por HPV indican que las mujeres con infecciones persistentes con tipos de HPVs oncogénicos están en un riesgo significativamente mayor de desarrollar NIC comparado con las mujeres que fueron transitoriamente infectadas (Ho *et al.*, 1995; Schlecht *et al.*, 2001). Las mujeres que son persistentemente positivas a HPV tienen cuatro veces más probabilidad de tener una lesión persistente en el cérvix (Cuzick *et al.*, 1994). Finalmente, datos recientes han sugerido que la carga viral de HPV está relacionada a la progresión de una infección por HPV a NIC II-III (Franco, 1996; Ho *et al.*, 1995), y a la persistencia de estas lesiones premalignas (Cuzick *et al.*, 1994).

Por otro lado, una alta proporción (15-40%) de mujeres asintomáticas tienen una infección por HPV cervical detectable (International Agency for Research on Cancer, 1995; Schiffman *et al.*, 1993), y la prevalencia es más alta entre mujeres adolescentes y adultas jóvenes en comparación con mujeres de mayor edad. Sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de esas mujeres desarrollarán CC. Existen estudios que indican que el riesgo de progresión de una lesión cervical es significativamente mayor en aquellos pacientes infectados con tipos de HPV de alto riesgo (Schiffman, 1992).

Aunque las infecciones por papilomavirus comúnmente producen lesiones benignas, en ocasiones pueden progresar a lesiones malignas. Ciertos tipos de HPVs, tales como el HPV16, HPV18 y HPV31, pertenecientes al grupo de alto riesgo u oncogénico, han sido reconocidos como agentes causales de cánceres cervical y anal. Estos virus transmitidos sexualmente, están asociados con más del 95% de los cánceres cervicales. Entre los HPVs de alto riesgo, el

HPV16 solo es responsable del desarrollo del 58.9% del CC. Otros tipos de HPVs, designados como de bajo riesgo o no oncogénicos, tales como el HPV6 y el HPV11, inducen condilomas acuminata benignos y son raramente encontrados en cánceres genitales (Munoz *et al.*, 2003).

Los HPVs pueden infectar células basales epiteliales de la piel o el revestimiento (“*lining*”) interno de los tejidos y se han clasificado como tipos cutáneos y asociados a mucosas. Los tipos cutáneos de HPVs son epidermotrópicos y su blanco es la piel de manos, garganta y pies. Se han asociado con varias condiciones hiperplásicas cutáneas, incluyendo las verrugas comunes de las manos y pies (tipos 1,2 y 4). Los tipos asociados a mucosas infectan el recubrimiento celular de boca, garganta, tracto respiratorio o epitelio anogenital, encontrándose por ejemplo en verrugas genitales y papilomatosis respiratoria recurrente (tipos 6 y 11), epidermodisplasia verruciformis (tipos 5 y 8), y carcinomas y adenocarcinomas anales y cervicales (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 y 73). Aunque se conocen muchos tipos de HPVs, sólo unos pocos causan la gran mayoría de las enfermedades. Los HPVs tipos 16 y 18 son responsables de >70% de todos los cánceres cervicales, seguidos por tipos 31 y 45 (Bosch *et al.*, 2002), los cuales causan un 10% adicional de los casos. Los HPVs tipos 6 y 11, no son tipos de alto riesgo u oncogénicos, pero son responsables de más del 90% de todas las verrugas anogenitales en hombres y mujeres (Gissmann *et al.*, 1983). Los estudios epidemiológicos y virológicos que fundamentan al HPV como el agente causal de la enfermedad no descartan la intervención de otros posibles factores de riesgo o carcinógenos que pueden intervenir en la aparición de la lesión y/o en la progresión de la misma.

4) LESIONES PRECURSORAS DE CÁNCER CERVICAL.

El cáncer cervical se origina a partir de lesiones premalignas no invasivas preexistentes, denominadas neoplasias intraepiteliales cervicales (NICs) o lesiones intraepiteliales escamosas (SILs) (FIG.1). Estas lesiones premalignas se clasifican histológicamente en base a la atipia progresiva de las células epiteliales: NIC I corresponde a displasia leve, NIC II a displasia moderada y NIC III tanto a displasia severa como carcinoma *in situ*. NIC I también se clasifica como SIL de bajo grado (LSIL) y NIC II/III como SIL de alto grado (HSIL). Aún existe la controversia de si el CC se desarrolla a partir de un epitelio cervical normal infectado siguiendo una secuencia bien reconocible de lesiones NIC I-NIC II-NIC III o directamente vía una rápida inducción de una lesión NIC III (Steenbergen *et al.*, 2005). Es de notar que las lesiones NIC I y II a menudo muestran un patrón de expresión de oncoproteínas virales de una infección viral

productiva, mientras que las NIC III muestran un patrón de expresión indicativo de una transformación inducida por HPV (Steenbergen *et al.*, 2005).

La probabilidad de progresión de lesiones preneoplásicas a cáncer, depende de la severidad de la lesión. El NIC I tiene una alta tasa de regresión espontánea (~60%) y una baja tasa de progresión a carcinoma. En contraste, aproximadamente el 38% de las NIC II y NIC III, espontáneamente revertirán, mientras que el 16-36% progresarán a CC invasivo (Giuliano, 2003). Cuando las lesiones NIC I-III son detectadas efectivamente usando un frotis para Pap, pueden ser tratadas para prevenir el desarrollo de CC invasivo.

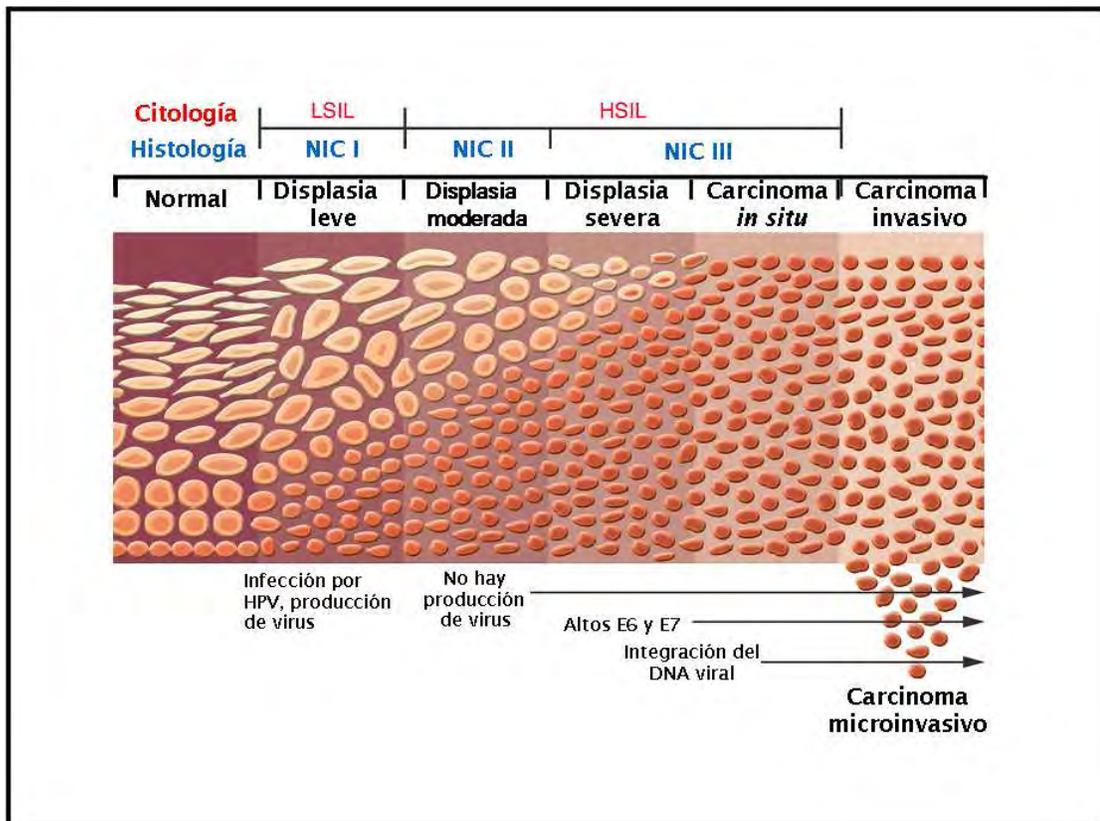


FIGURA 1.- PROGRESIÓN DE UNA LESIÓN CERVICAL BENIGNA A CÁNCER CERVICAL INVASIVO. La infección por HPVs oncogénicos, especialmente el HPV16, puede causar directamente una lesión condilomatosa benigna, una displasia de bajo grado o algunas veces una lesión temprana de alto grado. El carcinoma *in situ* raramente aparece sino hasta varios años después de la infección, y resulta de los efectos combinados de los genes del HPV, particularmente aquellos que codifican para las proteínas E6 y E7, las cuales son las dos oncoproteínas que son preferencialmente expresadas en cánceres cervicales; la integración del DNA viral al DNA del hospedero; y una serie de cambios genéticos y epigenéticos en genes celulares. HSIL, lesión intraepitelial escamosa de alto grado; LSIL, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; NIC, neoplasia intraepitelial cervical (Adaptación de Lowy and Schiller, 2006).

5) GENÉTICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y CICLO DE VIDA DE LOS PAPILOMAVIRUS.

Los HPVs son virus pequeños no envueltos (55 nm de diámetro) con genomas relativamente pequeños de DNA circular de doble cadena (~8 kpb) asociado con histonas (Favre, 1975). Actualmente, el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) ha agrupado a los papilomavirus en la familia *Papillomaviridae* (de Villiers *et al.*, 2004). El genoma de HPV codifica para solamente ocho proteínas y los correspondientes marcos de lectura abiertos (*ORFs*, *open reading frames*) están contenidos exclusivamente en una de las cadenas. El genoma está funcionalmente dividido en tres regiones (FIG. 2): (i) La primera es una región reguladora “*upstream*” no codificadora de 400 a 1000 pb, llamada región larga de control (LCR). Esta región contiene el promotor de los genes de E6 y E7, junto con unas secuencias “*enhancer*” y silenciadoras que regulan la replicación del DNA al controlar la transcripción de los *ORFs*. Esta región también contiene el mayor grado de variación en el genoma viral (Apt *et al.*, 1996); (ii) La segunda es una región temprana, que contiene los *ORFs* que codifican para las proteínas tempranas E1 y E2, responsables de la replicación y la transcripción virales, E4 parece auxiliar a la liberación del virus de las células infectadas

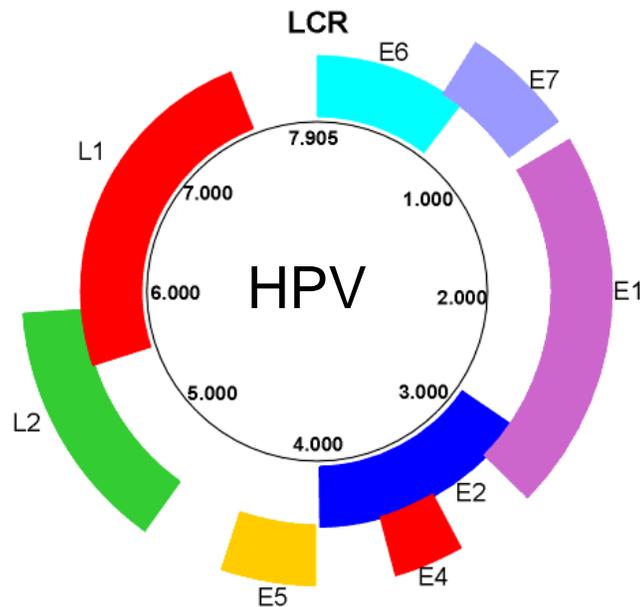


FIGURA 2.- MAPA GENÓMICO DE LOS HPVs DISTRIBUIDO EN TRES REGIONES. (i) La región larga de control (LCR) que contiene el promotor p97 junto con secuencias “*enhancer*” y silenciadoras que regulan la replicación del DNA al controlar la transcripción de los *ORFs*. (ii) Región temprana, que codifica para proteínas tempranas E1, E2, E4 y las oncoproteínas virales E5, E6 y E7. (iii) La tercera es la región tardía, la cual codifica las proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside viral.

(Bryan *and* Brown, 2001), y E5 el cual se ha propuesto como un tercer potencial oncogén por su asociación en el desarrollo temprano de un proceso canceroso a través de cooperar con factores de crecimiento (Bouvard *et al.*, 1994; Crusius *et al.*, 1997; Crusius *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1996a; Chen *et al.*, 1996b; Gu *and* Matlashewski 1995; Leptak *et al.*, 1991; Straight *et al.*, 1993; Tsai *and* Chen, 2003). En esta región también se codifican las proteínas oncogénicas clásicas del virus, que son E6 y E7, las cuales interfieren con la actividad de proteínas reguladoras de ciclo celular del huésped, tales como pRb y p53, entre otras. Las proteínas tempranas E6 y E7 de HPV inhiben o marcan para destrucción a proteínas celulares pRb y p53; (iii) La tercera es la región tardía, la cual codifica las proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside viral.

Los papilomavirus son ubicuos y han sido detectados en una amplia gama de animales, así como también en humanos y son específicos para sus respectivos huéspedes.

Más de 200 tipos de HPV se han reconocido en base a diferencias en sus secuencias de DNA. A la fecha se tienen bien caracterizados 85 genotipos de HPV. Adicionalmente se tienen otros 120 aislados parcialmente caracterizados que potencialmente pueden ser nuevos genotipos (zur Hausen, 1999).

La genotipificación de los HPVs está basada en las secuencias de DNAs de los genes de L1, E6 y E7. Una diferencia en la secuencia de L1 de al menos 10% con respecto a las cepas previamente establecidas es suficiente para definir un nuevo tipo de virus. A su vez, los HPVs también se han clasificado en subtipos, cuando éstos tienen del 90 hasta el 98% de similitud en secuencia en relación al tipo más cercano, o en variantes cuando éstos muestran diferencias en homología menores al 2% respecto al prototipo. Algunas variantes naturales existentes tienen diferentes propiedades biológicas y bioquímicas importantes en el riesgo a cáncer (de Villiers *et al.*, 2004; Burk *et al.*, 2009).

En general, los HPVs infectan las células basales de la superficie epitelial humana (Taichman *and* LaPorta, 1986; Lowy *and* Schiller, 2006). Las células basales infectadas se dividen, algunas de las células de la progenie permanecen como células basales infectadas, mientras que las otras también infectadas, se mueven alejándose del basamento membranal, se diferencian y se convierten en células epiteliales. La replicación viral y el ensamblado de los virus están estrechamente ligados al programa de diferenciación de la célula epitelial. Los viriones infectivos son producidos sólo en la célula diferenciada totalmente y son liberados como escamas cargadas de virus (FIG. 3). Esto explica por qué los HPVs no pueden crecer en cultivo de tejidos. A través de los años, varios métodos -incluyendo los ratones atímicos (Kreider *et al.*, 1985; Kreider *et al.*, 1987), sistemas “xenoinjerto” de ratones *SCID* y sistemas de cultivo

tipo “*raff*” (Meyers *et al.*, 1992) han logrado la propagación limitada de virus infectivos para algunos tipos de HPVs, pero la carencia de un sistema de cultivo conveniente ha impedido el estudio completo del ciclo de vida viral.

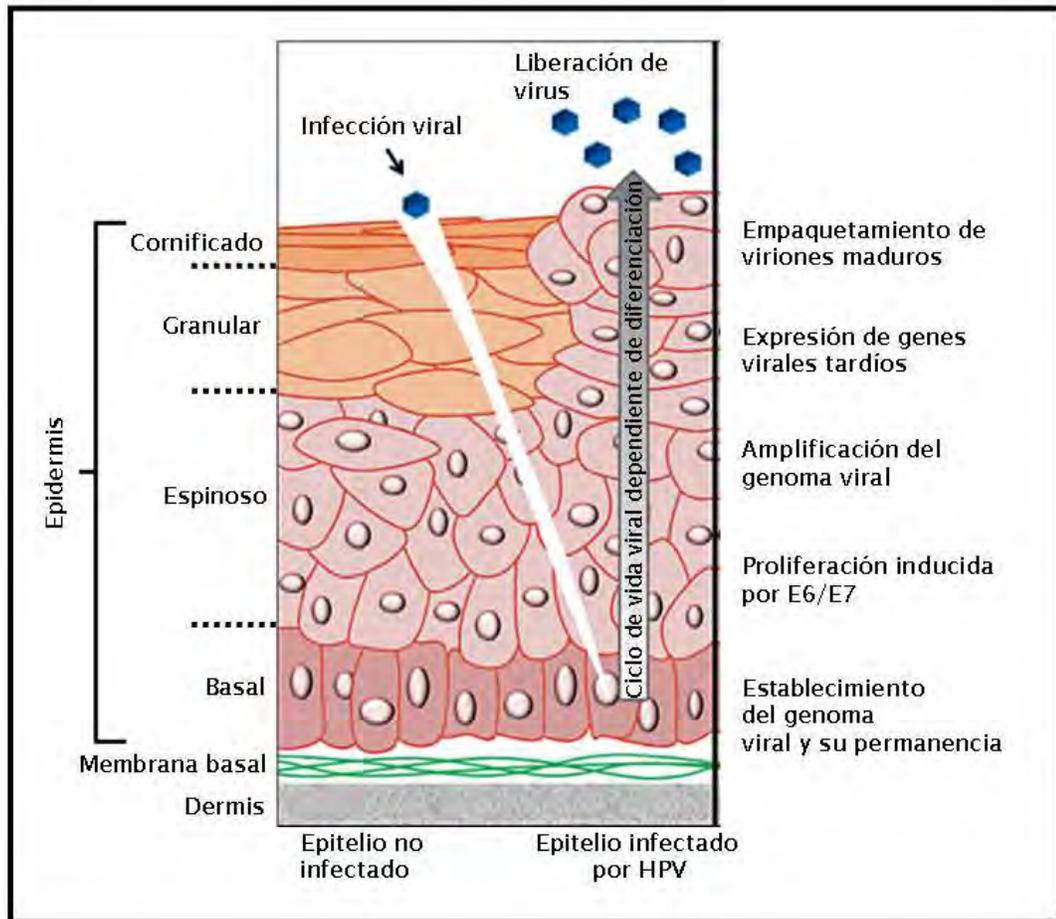


FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL CICLO DE VIDA DEL HPV EN EL CONTEXTO DEL EPITELIO EN DIFERENCIACIÓN. En esta ilustración se representan secciones de epitelio normal no infectado (izquierda) e infectado por HPV (derecha). El ciclo de vida del HPV depende del programa de diferenciación que sufren los queratinocitos dentro del epitelio estratificado. Los viriones de HPV infectan a los queratinocitos en división de la capa celular basal, donde se establecen y mantienen su genoma en forma episomal de bajo número de copias en el núcleo de estas células. Aunque las células no infectadas finalmente se diferencian y pierden sus núcleos, la expresión de los oncogenes virales **E6** y **E7** evita la diferenciación terminal de los queratinocitos infectados y los mantiene en un estado proliferativo necesario para la síntesis del DNA viral. Conforme las células migran hacia las capas superiores del epitelio, el genoma viral se amplifica y se induce la expresión de genes tardíos. La síntesis de las dos proteínas de cápside, L1 y L2, permite que el DNA viral se empaquete en viriones maduros, los cuales son entonces liberados en la porción superior del epitelio por simple descamación natural de las células. Las diferentes capas celulares del epitelio y los eventos que ocurren dentro de éstas, se indican a los lados izquierdo y derecho de la figura, respectivamente (Adaptación de Lehoux *et al.*, 2009).

6) LAS PROTEÍNAS DE LOS HPVs.

a) Las proteínas E1 y E2.

Los HPVs se mantienen como moléculas de DNA circular episomal en las células infectadas y son replicadas con el auxilio de las proteínas virales E1 y E2. La proteína E2 forma homodímeros que reconocen y se unen a secuencias palindrómicas de DNA en la región de control transcripcional de HPV. La proteína E2 puede entonces regular la transcripción desde el promotor adyacente que controla la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV. La proteína E2 puede activar o reprimir la transcripción dependiendo de los niveles de la misma y el tipo celular infectado. A la vez que E2 es un regulador transcripcional, también es esencial para la replicación del genoma viral, encontrándose tres secuencias de unión para E2 alrededor del origen viral (ori) de replicación y la interacción física entre E2 y E1 ocasiona el reclutamiento de E1 a la secuencia ori. Posteriormente al reclutamiento de E2, la proteína E1 interactúa con la secuencia de DNA del ori y forma un complejo hexamérico requerido para la replicación del genoma viral por la actividad de helicasa que posee. Se sabe que E1 interactúa con las subunidades de la DNA polimerasa α y con componentes del complejo SWi/Snf para activar la replicación viral (Taylor *et al.*, 2003).

b) La proteína E1^{E4}.

La proteína E4 de HPV es la que más se expresa y acumula en células en diferenciación en las capas epiteliales superiores. Se sintetiza a partir de un mRNA procesado, E1^{E4}, el cual codifica cinco aminoácidos que provienen del marco de lectura abierto de E1 unidos al de E4 (Chow *et al.*, 1987; Doorbar *et al.*, 1990; Nasser *et al.*, 1987). La primera actividad descrita para la proteína E1^{E4} de HPV16 fue su capacidad para unirse y colapsar la red de citoqueratina (Doorbar *et al.*, 1991). La función de esta intrigante propiedad permanece especulativa, pero la explicación más probable es la que sugiere que la reorganización del citoesqueleto sirve para facilitar la salida del virus de la célula. Esto es especialmente relevante conociendo en dónde se sintetizan las partículas de HPV maduras: éstas son producidas en escamas diferenciadas terminalmente que son ricas en queratina, y se ha sugerido que E4 puede contribuir a la liberación del virus al perturbar la red de citoqueratina e incrementar la fragilidad celular. Recientemente se reportó que después de la unión y el colapso de la red de citoqueratina, la proteína E1^{E4} de HPV16 se une a la mitocondria. Cuando la citoqueratina no está presente en

la célula, E1^{E4} aparece asociada con las mitocondrias tan pronto como se sintetiza. El dominio de leucinas dentro de la región N-terminal de la proteína E1^{E4} es esencial en mediar esta asociación. Después de la unión inicial a las mitocondrias, la proteína E1^{E4} induce la separación de las mitocondrias de los microtúbulos, causando que los organelos formen un gran conjunto único adyacente al núcleo. Lo anterior es seguido por una drástica reducción en el potencial de membrana mitocondrial y una inducción de apoptosis (Raj *et al.*, 2004). Adicionalmente a la interacción con citoqueratinas, E4 también se une a una proteína con dominio DEAD (Doorbar *et al.*, 2000). La función de esta asociación aún no es clara, principalmente debido a que la función de esta proteína con dominio DEAD ha sido escasamente definida. Se sabe que este tipo de proteínas regulan la expresión génica a varios niveles (Iost *and* Dreyfus, 1994; Pause *and* Sonenberg, 1992). Por lo tanto, E1^{E4} puede regular la expresión tanto de genes virales como celulares, por unión a esta proteína con dominio DEAD. Recientemente se ha demostrado que la proteína E1^{E4} de HPV16 detiene a las células en la fase G2 del ciclo celular (Davy *et al.*, 2002). Esta actividad, que es independiente de la asociación con citoqueratinas o a la proteína con dominio DEAD, no sólo se ha observado en células de mamífero, sino también en levaduras de fisión, sugiriendo que este efecto sea probablemente llevado a cabo por una vía reguladora muy básica en la célula. Las propiedades antiproliferativas que poseen las proteínas E1^{E4} y E2 pueden ser la razón de que su ausencia permita que los queratinocitos que expresen E6 y E7 experimenten proliferación continua que pueda conducir al inicio del cáncer cervical.

c) La proteína E5.

Recientemente el gen *E5* de HPV16 fue identificado como otro oncogén potencial (Bouvard *et al.*, 1994; Genter Williams *et al.*, 2005; Leptak *et al.*, 1991; Maufort *et al.*, 2007; Pim *et al.*, 1992). La proteína que codifica este gen consta de 83 residuos de aminoácidos y posee una alta hidrofobicidad, por lo que se asocia a membranas celulares como la del aparato de Golgi, retículo endoplasmático y membrana nuclear (Conrad *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 2008; Oetke *et al.*, 2000; Suprynowicz *et al.*, 2008). La proteína E5 está compuesta de tres hélices transmembranales y regiones cortas en los extremos amino y carboxilo terminales que se extienden más allá de la bicapa lipídica (Alonso *and* Reed, 2002; Ullman *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2003), siendo la primera región hidrofóbica importante para la localización celular de E5 (Cortese *et al.*, 2010; Lewis *et al.*, 2008). En células HaCat esta región confiere crecimiento independiente de adhesión (Lewis *et al.*, 2008) y medía la capacidad de estas células para

invadir la matriz extracelular en ensayos "raft" organotípicos (Barbaresi *et al.*, 2010), mientras que los dominios transmembranales segundo y tercero cooperan para unir a la subunidad c de 16 kDa de la ATPasa protónica o H⁺-ATPasa (Adam *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2000).

En carcinomas *in situ* positivos para HPV, el transcrito más abundante es un mRNA policistrónico que incluye al gen **E5** (Stoler *et al.*, 1992). El mRNA y la proteína de E5 son abundantes en el tercio más bajo del epitelio de las lesiones cervicales de bajo grado detectado por hibridación *in situ* y ensayos de inmunohistoquímica (Chang *et al.*, 2001; Stoler *et al.*, 1992).

Por otro lado, el gen **E5** es frecuentemente eliminado cuando el genoma del HPV se integra al genoma celular (FIG. 4)(Pater *and* Pater, 1985). Existe fuerte evidencia que indica que el DNA de HPV tanto de alto como de bajo riesgo permanece en forma episomal en infecciones ginecológicas benignas (Cullen *et al.*, 1991; Durst *et al.*, 1985; Lehn *et al.*, 1988). En contraste, el DNA de HPV a menudo se ha encontrado integrado en muestras de biopsias y líneas celulares de cánceres cervicales en los cuales el HPV está presente (Durst *et al.*, 1985). La integración viral se ha propuesto que juega un papel central en la progresión del cáncer cervical. A diferencia de otros HPVs de alto riesgo, el HPV16 puede existir en las formas episomal, integrado o episomal/integrado en cánceres cervicales primarios (Cullen *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 2001; Choo *et al.*, 1987; Choo *et al.*, 1989; Matsukura *et al.*, 1989; Pirami *et al.*, 1997). Sin embargo, E5 no es necesariamente responsable del mantenimiento de la malignidad, ya que se pierde durante la integración. Por lo tanto, E5 podría contribuir a la proliferación neoplásica durante las etapas tempranas de la infección, pero no es indispensable para la transformación maligna. Las oncoproteínas E6 y E7 son necesarias para mantener el fenotipo transformado (Stoppler *et al.*, 1996).

Sin embargo, la mayoría de lo que se sabe de E5 está relacionado con una dependencia del EGF y su receptor. Existen reportes refiriendo que E5 incrementa la vida media del receptor a EGF (EGF-r) (Genther Williams *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 1989; Rodriguez *et al.*, 2000; Straight *et al.*, 1993; Straight *et al.*, 1995; Tomakidi *et al.*, 2000), posiblemente ocasionado por una deteriorada subregulación de los receptores y su reciclamiento a la membrana celular en células que expresan E5 (Straight *et al.*, 1993). Este reciclamiento se explicaría en parte por la interacción que tiene E5 *in vitro* con la subunidad de 16 kDa de la H⁺-ATPasa (Chen *et al.*, 1996c; Goldstein *et al.*, 1992; Valle *and* Banks, 1995) localizada en la membrana endosomal (Straight *et al.*, 1993; Straight *et al.*, 1995) inhibiendo consecuentemente la acidificación de endosomas (Conrad *et al.*, 1993; Straight *et al.*, 1995). En el caso de melanomas *amelanóticos*, se ha visto que la interacción de E5 con la subunidad referida también puede provocar, tras la alcalinización celular, una activación post-traducciona de la tirosinasa, la síntesis de melanina y

la modulación del fenotipo. Estos efectos están asociados con un incremento de la sensibilidad a drogas anti-blásticas análogas a tirosina, como las quinonas, que son metabolizadas hacia compuestos tóxicos mediante catálisis por la tirosinasa (Di Domenico *et al.*, 2009).

Por otro lado, datos *in vivo* han revelado que la proteína E5 existe predominantemente en la región perinuclear del citoplasma de células transfectadas con E5 (Conrad *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 2001; Oelze *et al.*, 1995) y en tejidos infectados por HPV16 (Chang *et al.*, 2001), localizaciones consistentes con la distribución de la subunidad de 16 kDa (Conrad *et al.*, 1993).

En contraste, resultados de otros estudios demuestran que la proteína E5 se une, pero no perturba la actividad de la H⁺-ATPasa vacuolar (Adam *et al.*, 2000; Ashby *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2000) sugiriendo que E5 ejerce su función involucrando mecanismos diferentes. Además, un estudio reportó que el tratamiento con EGF sólo incrementa la fosforilación de EGF-r más que el número de receptores en células que expresan E5 (Gu and Matlashewski, 1995). Este resultado sugiere que E5 puede formar un complejo con EGF-r para inducir la fosforilación del mismo. Sin embargo, otros investigadores no han podido demostrar la existencia de complejos E5-EGF-r (Conrad *et al.*, 1994).

Por otro lado, se ha demostrado que E5 de HPV16 estimula la vía de señalización mediada por EGF-r al inhibir la interacción con c-Cbl y disminuyendo así la degradación del receptor (Zhang *et al.*, 2005).

Se ha reportado que E5 también afecta a otros miembros de la familia de EGF-r. Mediante ensayos de inmunohistoquímica, se ha demostrado la asociación entre la proteína E5 y el EGF-r o el receptor ErbB4 en lesiones infectadas por HPV16 (Chang *et al.*, 2001). Estos hallazgos implican que la actividad transformante de E5 podría activar la vía de señalización al afectar la formación de homodímeros de EGF-r, homodímeros de ErbB4 u heterodímeros de EGF-r/ErbB4. La transfosforilación de homo- o heterodímeros inducida por ligando ha sido reportada como moduladora de señales reguladoras de crecimiento (Carraway and Cantley, 1994; Zhang *et al.*, 1996). Un reporte reciente demostró que el tratamiento con EGF ocasiona un incremento en la activación del receptor ErbB2 en células que expresan E5, mientras que el tratamiento con el factor de crecimiento semejante al factor de crecimiento que une heparina (HB-EGF) no incrementa la fosforilación del receptor de ErbB4 en células que expresan E5 (Crusius *et al.*, 1998).

Existen reportes que apoyan la idea de que la proteína E5 puede actuar independientemente de EGF sobre las actividades de PLC- γ -1 (Crusius *et al.*, 1999) o MAPKs en condiciones de estrés. En este último caso, E5 de HPV16 modula la activación dependiente

de sorbitol de la MAPK p38 y ERK1/2 en queratinocitos humanos a través de un mecanismo independiente de EGF (Crusius *et al.*, 2000).

d) La proteína E6.

Las oncoproteínas E6 y E7 se han encontrado en tumores malignos (Schwarz *et al.*, 1985), indicando que las funciones de E6 y E7 se requieren para la tumorigénesis.

E6 interactúa con una gran variedad de proteínas del huésped e interfiere con sus funciones. Las proteínas E6 de papilomavirus de alto riesgo se unen a la proteína supresora de tumores p53 para su degradación (Werness *et al.*, 1990). Esta observación provee un hecho funcional importante por el cual E6 contribuye a transformación celular. Varios estudios han demostrado que se requieren actividades adicionales de E6 para alcanzar el potencial de transformación total (Liu *et al.*, 1999; Nakagawa *and* Huibregtse, 2000). Actualmente se ha identificado un creciente número de blancos de E6 involucrados en un amplio espectro de funciones celulares (Mantovani *and* Banks, 2001), incluyendo la proteína de unión a p300/CREB coactivadora transcripcional (Patel *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 1999), hMcm7 (Kuhne *and* Banks, 1998; Kukimoto *et al.*, 1998), IRF-3 (Ronco *et al.*, 1998) y E6TP1 (Gao *et al.*, 1999) entre otras. Entonces, E6 interfiere con múltiples vías celulares, lo que conduce a la transformación maligna. Sin embargo, el mecanismo que coordina las actividades celulares marcadas por E6 y que conducen a tumorigénesis permanecen aún desconocidas. Recientemente se identificó que la tuberina es un blanco de E6 de HPV16. E6 se une e induce la degradación de la tuberina mediada por proteosoma, conduciendo la destrucción de su función inhibitoria en la regulación de la activación de la cinasa S6 en respuesta a la estimulación por insulina. La región de interacción de E6 con la tuberina se ha mapeado en la región amino de E6 y es diferente al dominio de unión con p53. Estos resultados proveen una posible relación entre la oncogénesis inducida por E6 y la vía de señalización de proliferación celular estimulada por insulina (Lu *et al.*, 2004). También se ha reportado que E6 interacciona con moléculas implicadas en estabilidad cromosomal como NFX1, XRCC1 y MGMT o en adhesión y polaridad celular como hDlg, hScrib, MAGIs y MUPPI (Howie *et al.*, 2009; Whiteside *et al.*, 2008).

e) La proteína E7.

La proteína E7 de HPV16 tiene 98 residuos de aminoácidos y está dividida en tres regiones (CR1, CR2 y CR3) en base a su homología con la oncoproteína E1A (Barbosa *et al.*,

1990; Dyson *et al.*, 1992). E7 induce cambios biológicos significativos, particularmente respecto a crecimiento celular; de hecho, E7 de HPV16 puede immortalizar queratinocitos de prepucio humano (HFks), aumenta la proliferación de fibroblastos de embrión de rata, y, en combinación con Ha-Ras, immortaliza células de riñón de rata recién nacida (Alunni-Fabbroni *et al.*, 2000; Chesters *and* McCance, 1989; Halbert *et al.*, 1991; Hudson *et al.*, 1990; Jewers *et al.*, 1992). Incluso, E7 puede transformar una variedad de líneas celulares, incluyendo fibroblastos de ratón NIH3T3 (Chesters *et al.*, 1990; Heck *et al.*, 1992; Phelps *et al.*, 1992). Una de las características de E7 mejor estudiadas, es su capacidad para unirse a la proteína supresora de tumores retinoblastoma (pRb) (Dyson *et al.*, 1989; Munger *et al.*, 1989). Los miembros de la familia de pRb juegan un papel central en la regulación del ciclo celular en eucariotes. Más específicamente, pRb en su estado hipofosforilado, puede unirse a factores transcripcionales tales como los miembros de la familia de E2F y reprime la transcripción de genes particulares. Conforme las células progresan desde las fases G0 pasando por G1 y llegando a S (FIG. 9), los miembros de la familia de pRb son progresivamente hiperfosforilados por cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), con la consecuente liberación del factor de transcripción E2F, el cual a su vez activa genes involucrados en la síntesis de DNA y la progresión de ciclo celular (Dyson, 1998). Ya que E7 es capaz de unirse a pRb desfosforilado, se cree que E7 puede inducir prematuramente a las células a entrar a la fase S al evitar la formación de los complejos pRb-E2F (Dyson *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1993; Patrick *et al.*, 1994).

La remodelación de la cromatina a través de la acetilación de histonas, está surgiendo como un mecanismo importante por el cual se regula la transcripción de genes. Los genes transcritos activamente muestran un alto nivel de acetilación en histonas, mientras que no lo muestran los genes reprimidos (Grunstein, 1997). Además, se ha demostrado que pRb puede asociarse con la histona desacetilasa 1 (HDAC-1) y que tanto pRb como HDAC-1 cooperan en la represión de la transcripción de genes regulados por E2F (Brehm *et al.*, 1998; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998). Se ha demostrado que el dominio del dedo de zinc CR3 de E7 interactúa con HDAC-1 (Brehm *et al.*, 1998; Brehm *et al.*, 1999). Aunque esta asociación es independiente de pRb, la unión de E7 con HDAC-1 ocurre indirectamente a través de Mi2 β , un componente del complejo desacetilasa remodelado de nucleosoma (NURD) (Brehm *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1998). Notoriamente, las actividades relacionadas con el dominio CR3 de E7 son esenciales para la immortalización de queratinocitos, indicando que la asociación entre HDAC-1 y E7 es relevante biológicamente.

Dado que las funciones bioquímicas conocidas de E7 están relacionadas con blancos implicados en proliferación celular, se asume generalmente que la función principal de E7 es la

de alterar el ciclo celular, para así establecer un ambiente más apto para la replicación viral con la consecuente promoción tumorigénica. Al respecto, se ha encontrado que E7 de HPVs oncogénicos, como el de HPV16, inducen la síntesis de DNA celular en presencia de señales antimitogénicas tales como la diferenciación suprabasal, la presencia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), daño a DNA y carencia de suero (Demers *et al.*, 1996). También se ha descrito que E7 de HPV16 altera la expresión del gen *cdc25A* y que esta regulación está ligada con la interrupción del arresto celular (Nguyen *et al.*, 2002).

f) Las proteínas L1 y L2.

La cápside de los papilomavirus humanos tiene aproximadamente 600 Å de diámetro y consiste de 360 copias de la proteína capsídica mayor, L1 (55 kDa), arreglada como 72 pentámeros en una red icosaédrica T=7, con cantidades subestequiométricas de la proteína capsídica L2 (Baker *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2000; Trus *et al.*, 1997). Cada capsómero contiene cinco monómeros de la proteína L1. La cápside también contiene doce copias de la proteína L2 (74 kDa), posiblemente asociadas con los 12 capsómeros pentavalentes (Doorbar *and* Gallimore, 1987; Trus *et al.*, 1997). La expresión de L1 ó L1+L2 recombinantes en varios sistemas de expresión resulta en el autoensamblado de partículas semejantes a virus ó VLPs que se aproximan a la estructura de los viriones nativos (Hagensee *et al.*, 1993; Kirnbauer *et al.*, 1992; Kirnbauer *et al.*, 1993; Rose *et al.*, 1993; Sasagawa *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1991). El papel que tiene L2 en la encapsidación del genoma, junto con sus propiedades de unión a DNA (El Mehdaoui *et al.*, 2000; Mallon *et al.*, 1987; Zhou *et al.*, 1994), sugiere que, dentro del virión, L2 forma contactos con el genoma viral en adición a su contacto con los pentámeros de L1. Otro dominio de L2 pudiera ser expuesto en la superficie del virión, formando un epítipo específico para reconocimiento inmune (Embers *et al.*, 2002; Kawana *et al.*, 1998; Kawana *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1997). Esta región expuesta de L2 podría también interactuar con un receptor celular para facilitar la entrada de los viriones (Kawana *et al.*, 2001).

7) MODELO DE ASOCIACIÓN ENTRE INFECCIÓN POR HPV Y DESARROLLO DE CC.

El HPV16 es el que predominantemente se encuentra en cánceres cervicales (Howley, 1991; zur Hausen *and* de Villiers, 1994) y codifica como ya se describió para tres oncoproteínas transformantes: E5, E6 y E7. La infección inicial con HPV16 causa una lesión de bajo grado y el

DNA existe como una forma episomal en núcleo de la célula. Durante la progresión a una lesión maligna, el DNA del HPV se integra al genoma de la célula huésped (Cullen *et al.*, 1991; Choo *et al.*, 1987; Choo *et al.*, 1989; Lehoux *et al.*, 2009; Matsukura *et al.*, 1989; Pett and Coleman, 2007; Pirami *et al.*, 1997). La integración del DNA viral permite la expresión persistente de los oncogenes **E6** y **E7**, debido a la pérdida de expresión de E2 durante la integración. E6 facilita la degradación de p53 y E7 inactiva a la proteína supresora de tumores pRb (Howie *et al.*, 2009; McLaughlin-Drubin and Münger, 2009; Yugawa and Kiyono, 2009). En la forma episomal del DNA viral presente en las etapas iniciales de la infección por HPV, el gen de **E5** está presente en el transcrito viral más abundante, el mRNA de E1[^]E4 (Gill *et al.*, 1998; zur Hausen and de Villiers, 1994). Sin embargo, el gen E5 es frecuentemente eliminado cuando el genoma de HPV se integra (DiMaio and Mattoon, 2001; zur Hausen and de Villiers, 1994). Por lo tanto la expresión de E5 desaparece después de la integración del genoma viral durante la progresión de una lesión de bajo grado al estado maligno (FIG. 4).

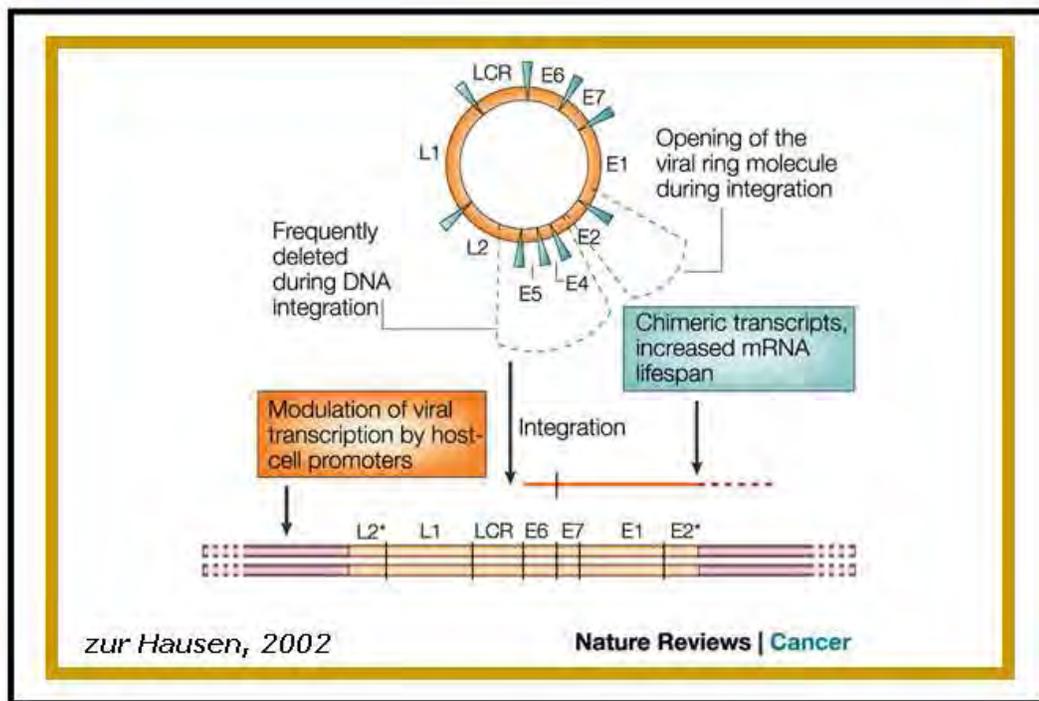


FIGURA 4. INTEGRACIÓN DE HPV AL GENOMA CELULAR. En la región temprana se encuentran codificadas las oncoproteínas E5, E6 y E7. Respecto a E6 y E7, la expresión de éstas es regulada negativamente por E2 en el estado episomal, pero al integrarse el genoma viral al celular se pierde la expresión de E2 generada por la ruptura de la región E1-E2, permitiendo entonces la sobreexpresión de E6 y E7 lo que permite el inicio del proceso canceroso. También durante el proceso de integración, generalmente se pierden las secuencias que codifican para E4 y E5 (zur Hausen, 2002).

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR RELACIONADA A CÁNCER CERVICAL.

1) RECEPTORES TIROSINA-CINASAS, RAS, MAPKs Y PI3K.

a) Receptores tirosina-cinasas (RTKs).

Los receptores tirosina-cinasas (RTKs), entre los que se encuentra el EGF-r, transmiten señales que regulan la proliferación celular y la diferenciación, promueven la migración y la supervivencia celular, además de modular el metabolismo celular. Estos receptores tienen un papel crítico en un amplio rango de procesos celulares, en los que se incluyen el desarrollo embrionario, el crecimiento de un organismo, la angiogénesis, la plasticidad sináptica y la oncogénesis.

Las vías de transducción de señales a partir de RTKs forman una intrincada red, que contiene módulos de complejos multi-protéicos que se ensamblan en varios compartimentos intracelulares para procesar, integrar y transmitir la información que finalmente especificará una respuesta biológica particular.

La mayoría de los RTKs se encuentran como monómeros inactivos y forman dímeros tras la unión de sus ligandos, los cuales por lo general son péptidos solubles. La dimerización induce la activación del receptor y la autofosforilación en los residuos de tirosina en el dominio intracelular del RTK y sirven como sitios específicos de unión para proteínas que contienen dominios SH2 (homólogos a Src tipo 2).

Las proteínas que son reclutadas por un RTK activado se agrupan típicamente en dos categorías: aquellas cuya actividad es estimulada por el receptor activado (Src, PLC γ , Shp-2 y PI3K) y las adaptadoras, que contienen motivos de interacción proteica adicionales (Grb2 y Shc). Muchos receptores RTKs activados también pueden atraer a un tercer grupo de moléculas conocidas colectivamente como proteínas ancla (IRS, FRS y Gab/Dok). Las proteínas ancla son reclutadas a menudo por el RTK vía un dominio PTB intrínseco o a través de la interacción con el adaptador Grb2. Estas proteínas también contienen un motivo para anclaje en membrana (ya sea un dominio de homología a pleckstrina (PH) o un sitio de miristoilación) y múltiples sitios de fosforilación de tirosinas que pueden interactuar con moléculas adicionales. Así, a través del receptor mismo, las proteínas ancla y las adaptadoras, se pueden reclutar numerosos componentes de señalización hacia la cara interna de la membrana celular, activando todo un repertorio de cascadas requeridas para una respuesta específica. Después de la activación, los residuos de tirosina del receptor son fosforilados, sirviendo como sitios de unión para proteínas tales como Grb2 y SOS. El factor de intercambio

entonces reemplaza el GDP unido a la proteína Ras por GTP, para así activarla. La proteína Ras activada puede unir a Raf y así desencadenar una serie de fosforilaciones donde Raf activa a la cinasa de MAPK (MEK) que a su vez activa a la MAPK p44/42 (ERK1/2) (Moelling *et al.*, 2002).

b) El receptor al factor de crecimiento epidermal (EGF-r).

La familia de EGF-r consta de 4 receptores transmembranales, incluyendo al EGF-r (HER/erbB-1), HER2 (erbB-2/neu), HER3 (erbB-3) y HER4 (erbB-4) (Yarden, 2001). El EGF-r (HER1/erbB-1) es una proteína de 170 kDa que contiene tres dominios funcionales principales: un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembranal hidrofóbico y un dominio tirosina-cinasa citoplasmático, como se aprecia en la FIG. 5.

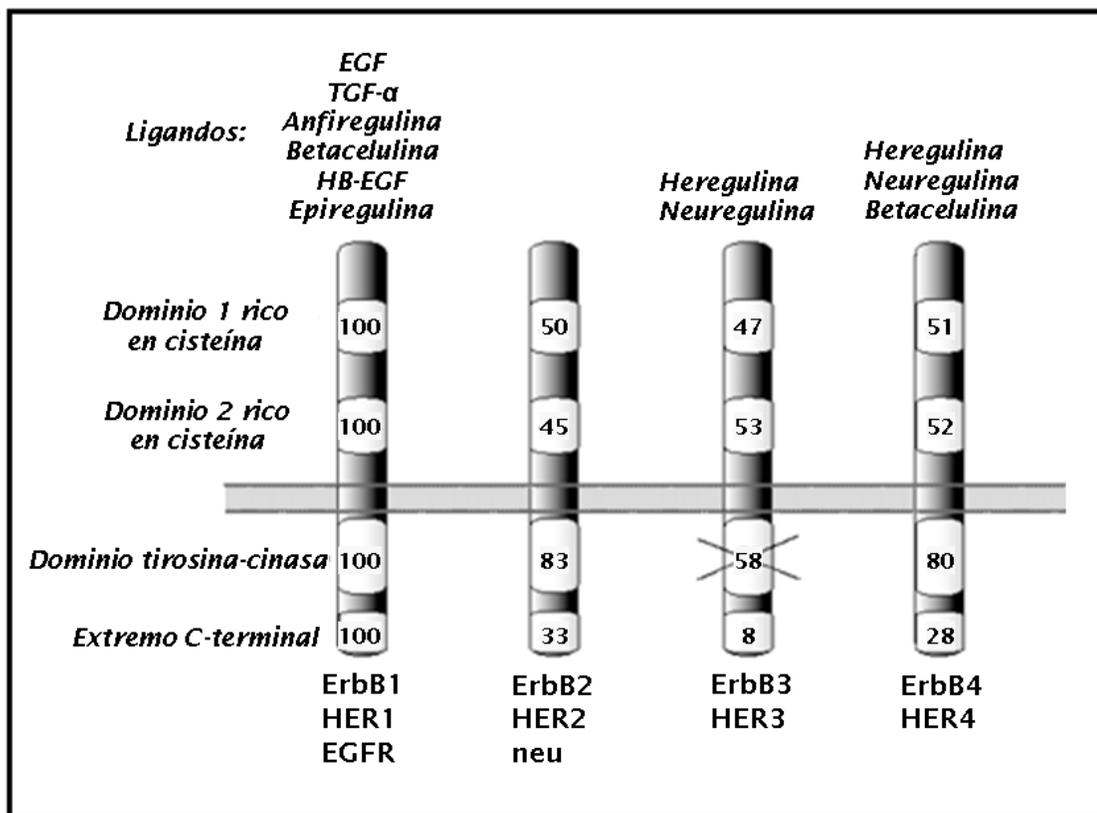


FIGURA 5. DIAGRAMA DE LOS CUATRO MIEMBROS DE LA FAMILIA DE ErbB Y SUS LIGANDOS. Los números denotan el grado de homología relativo a ErbB1/EGF-r (expresado como porcentaje). Con excepción de ErbB3 que es deficiente en cinasa, hay un alto grado de homología en el dominio de tirosina-cinasa (Adaptado de Harari, 2004).

Se ha demostrado que el EGF-r es capaz de unir a siete ligandos genéticamente distintos, como son EGF, factor de crecimiento transformante α (TGF- α), EGF que une heparina, anfiregulina, betacelulina, epiregulina y neuregulina G2 β (Toyoda *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1994; Wells, 1999). La unión del ligando afín induce la dimerización del receptor ErbB, la formación de homodímeros de receptor y/o heterodímeros e internalización (Wiley, 2003; Yarden, 2001). La formación de dímeros conduce a la activación del dominio intrínseco de tirosina-cinasa del receptor. La fosforilación y desfosforilación de proteínas, catalizadas por proteínas-cinasas (tales como tirosina-cinasas) y proteínas-fosfatasas respectivamente, representan eventos bioquímicos fundamentales para la subsecuente transducción de señales intracelulares (Qu, 2002). La autofosforilación de residuos de tirosina dentro de la porción carboxilo terminal del EGF-r en el citoplasma (Cohen, 2003) después de la activación del EGF-r como tirosina-cinasa, inicia una cascada de vías de señalización intracelular (Carpenter *and* Cohen, 1990). La señal de un receptor tirosina-cinasa puede ser terminada por endocitosis del complejo receptor fosforilado-ligando (Madshus *and* Stang, 2009; Yarden, 2001). En la FIG. 6 se muestra el modelo propuesto en 2009 por Madshus y Stang para el procesamiento que sufre el EGF-r después que ha sido activado y que ha dejado pasar la señal mitogénica generada en éste.

Las vías de transducción de señales intracelulares a partir del EGF-r incluyen componentes de las vías de Ras/proteína-cinasa activada por mitógenos (MAPK), fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), activador y transductor de señal de transcripción, proteína-cinasa C (PKC) y fosfolipasa D (Carpenter, 2000; Grant *et al.*, 2002; Wells, 1999). Algunas de estas vías sirven para atenuar la señalización del receptor (Wells, 1999). Las respuestas biológicas integradas a la señalización por EGF-r son pleiotrópicas, incluyéndose mitogénesis, apoptosis, movilidad celular alterada, secreción de proteínas y diferenciación (Wells, 1999).

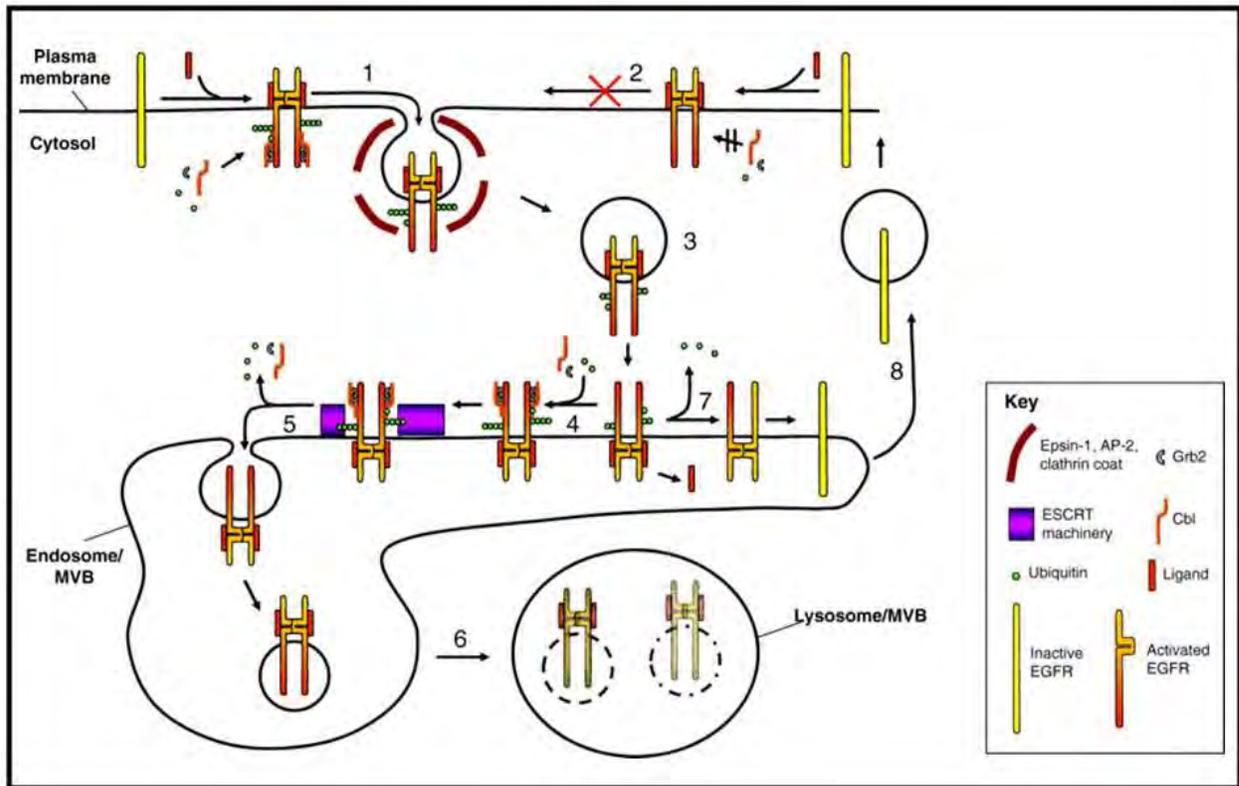


FIGURA 6. . MODELO QUE ILUSTRAS EL TRÁFICO ENDOSOMAL DEL EGF-r. Después de la unión del ligando, el EGF-r se activa, ubiquitina y se recluta en depresiones recubiertas de clatrina (1). Sin embargo, cuando se bloquea la ubiquitinación de EGF-r activado, se inhibe su reclutamiento a las depresiones recubiertas de clatrina (2). En este modelo se propone que el EGF-r es parcialmente desubiquitinado tras su internalización (3), aunque dicho receptor unido a su ligando se reubiquitina (Longva *et al.*, 2002) (4). A través de la interacción con la maquinaria de ESCRT en los endosomas tempranos, el EGF-r es llevado a vesículas internas de endosomas (5) y finalmente a cuerpos multivesiculares (MVBs) y lisosomas para degradación (6). Durante su tránsito por 1, 3 4 y 5, los complejos son activos en señalización, puesto que se mantienen siempre unidos el EGF-r y su ligando. En el caso de que el EGF-r/ligando se disocie a bajo pH, el EGF-r que está en endosomas se desactiva y desubiquitina (7) y es reciclado (8) a la membrana plasmática (Madshus *and* Stang, 2009).

c) El papel de EGF-r en oncología.

La activación del EGF-r estimula el crecimiento y la progresión tumoral, incluyendo la promoción de la proliferación, angiogénesis, invasión, metástasis e inhibición de apoptosis (Salomón *et al.*, 1995; Wells, 1999; Woodburn, 1999). En forma normal, el EGF-r se expresa ampliamente en muchos tipos celulares, incluyendo aquellos de los linajes epitelial y mesenquimal (Wells, 1999). Sin embargo, hay variabilidad de acuerdo a la incidencia reportada de la sobre-expresión o desregulación del EGF-r en enfermedades humanas (Arteaga, 2002; Nicholson *et al.*, 2001). Por ejemplo, algunos reportes describen que la expresión de EGF-r está desregulada en al menos 50% de los tumores epiteliales (Aaronson, 1991; Earp *et al.*, 2003; Grunwald *and* Hidalgo, 2003), mientras que las estimaciones más conservadoras sugieren que

sólo un tercio de los tumores malignos epiteliales expresan altos niveles de EGF-r (Mendelsohn, 2001). En cáncer de cabeza y cuello, la amplia mayoría de los tumores son fuertemente positivos a EGF-r (Mendelsohn, 2001). Otros estudios han reportado la sobreexpresión de EGF-r en los cánceres de: vejiga, cerebro, mama, cervical, uterino, colon, esófago, glioma, pulmón (células no pequeñas o NSCLC), ovario, pancreático y renal (celular) (Herbst, 2002; Mendelsohn *and* Baselga, 2003; Nicholson *et al.*, 2001).

La expresión de EGF-r es más alta en neoplasias intraepiteliales cervicales y cánceres cervicales que en controles (Mathur *et al.*, 2000). Además, la sobre-expresión del EGF-r está asociada con un pronóstico más bajo en pacientes con cáncer cervical, encaminándose como un blanco potencial para terapia (González, 2007; Kersemaekers *et al.*, 1999).

2) LAS PROTEÍNAS RAS.

Las proteínas Ras son miembros prototipo de la superfamilia de GTPasas pequeñas, que transmiten señales de receptores localizados en la superficie celular hacia una gran variedad de moléculas efectoras y por lo tanto pueden regular las vías que gobiernan la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (FIG. 7) (Karnoub *and* Weinberg, 2008). Las proteínas Ras actúan como “*switches*”. La conversión del estado inactivo al activo inducida por una señal es mediada por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (*GEFs*) que estimulan el intercambio de GDP por GTP. Lo anterior se logra al catalizar la liberación de GDP del sitio de unión al nucleótido de guanina. Una vez liberado el nucleótido, enseguida Ras une GTP, que es 10 veces más abundante en el citosol que el GDP. Esta reacción es mediada por la presencia de un *GEF*, que en el caso particular de Ras es SOS, que es reclutado a la cara interna de la membrana plasmática cuando se activa un RTK como el EGF-r. Sin embargo, el reclutamiento se lleva a cabo debido a que SOS va unido a la molécula adaptadora Grb2, la cual reconoce a las tirosinas fosforiladas en el EGF-r por medio de su dominio SH2 y se une con SOS por sus dos dominios SH3. Un cambio conformacional drástico causado por la unión de GTP conduce a la activación de Ras (Vetter *and* Wittinghofer, 2001). El dominio efector pasa la señal a moléculas subsecuentes solamente cuando la proteína está en el estado unido a GTP. El estado de activación de Ras está limitado por la actividad GTPasa intrínseca de la proteína. Sin embargo, Ras, como la mayoría de las GTPasas de señalización, es una enzima poco activa. La actividad catalítica de Ras se incrementa notoriamente por las proteínas activadoras de la GTPasa (*GAPs*). Los *GEFs* y las *GAPs* cooperan para producir un nivel crítico de regulación, permitiendo que la señal se encienda o apague para persistir por un tiempo

relativamente corto pero variable. La disponibilidad de las formas Ras constitutivamente activas así como dominantes negativas han hecho posible caracterizar su función biológica (Feig, 1999).

Las formas dominantes activas están constitutivamente unidas a GTP y mimetizan las formas oncogénicas de la proteína. Los genes **ras** codificados por los virus del sarcoma de rata v-H-ras y v-K-ras, fueron de los primeros oncogenes en ser reconocidos (Harvey, 1964; Kirsten and Mayer, 1969). Estos genes virales son formas mutantes de los proto-oncogenes celulares (DeFeo *et al.*, 1981; Ellis *et al.*, 1981; Ruta *et al.*, 1986). Las mutaciones que producen una GTPasa insensible a la acción de GAP y por lo tanto mantienen a Ras en su estado unido a GTP con la subsecuente actividad oncogénica (Barbacid, 1987; Lowy and Willumsen, 1993).

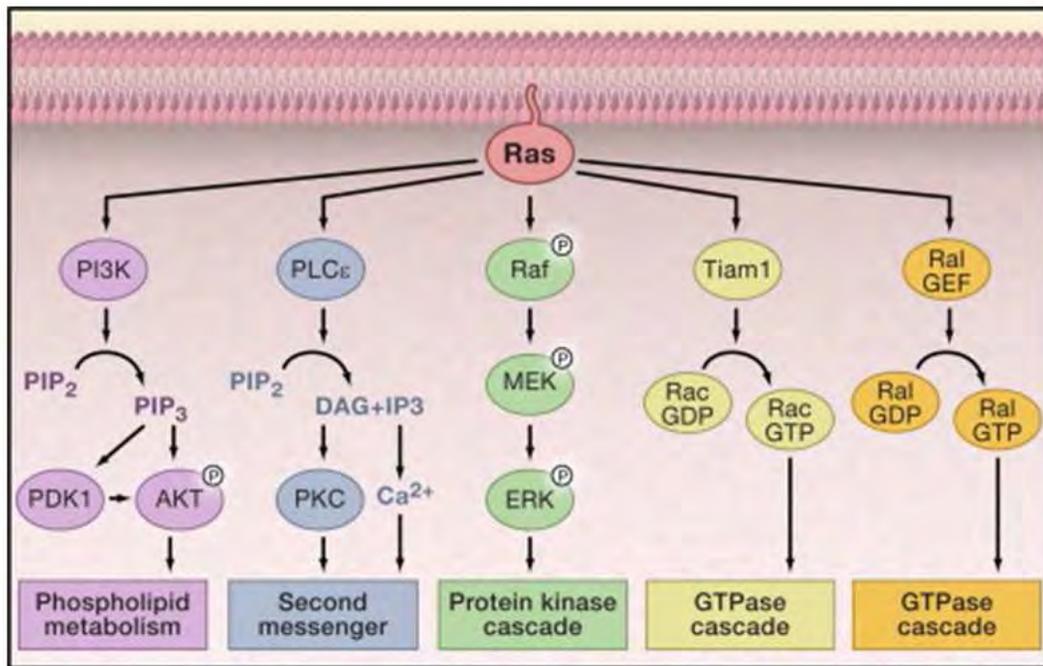


FIGURA 7. EFECTORES DE LA ONCOGÉNESIS MEDIADA POR RAS. Los miembros de al menos cinco clases funcionales de efectores han sido implicados en transformación y oncogénesis. Los efectores más estudiados son las cinasas de serina/treonina Raf (c-Raf-1, A-Raf, B-Raf). Raf fosforila y activa a las cinasas MEK1 y MEK2, las cuales a su vez fosforilan y activan a las MAPKS ERK1 y ERK2. El siguiente efector mejor caracterizado son las subunidades catalíticas p110 (α , β , δ , y γ) de las PI3K clase I. Las cinasas PI3Ks convierten el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), el cual promueve la activación de varias proteínas de señalización, incluyendo la activación y la fosforilación de la cinasa de serina/treonina AKT mediada por PDK1. Cuatro factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs, los cuales promueven la formación de la forma activa unida a GTP de las GTPasas) son activadores de las GTPasas pequeñas RalA y RalB (Ral-GDS, Rgl, Rgl2/Rlf, y Rgl3). El GEF Tiam1 (y el relacionado Tiam2) activa a la GTPasa pequeña Rac. Finalmente, la activación de la fosfolipasa C épsilon por Ras (PLC ϵ) cataliza la conversión de fosfatidilinositol (4,5) bifosfato a los segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) e inositol (1,4,5)-trifosfato (IP₃), resultando en la activación mediada por DAG de la proteína cinasa C (PKC) y la movilización de los iones calcio intracelulares, respectivamente (Channing and Terry van Dyke, 2007).

Los alelos de Ras activados hacen de Ras el oncogén más frecuentemente asociado con carcinomas humanos (Barbacid, 1987), implicando con ello el gran impacto de Ras en la salud humana. El genoma de los mamíferos codifica para tres genes *ras* que dan origen a cuatro productos genómicos, N-Ras, H-Ras, K-Ras4A, y K-Ras4B. Todas estas isoformas son ubicuamente expresadas, aunque los porcentajes de cada isoforma varían de tejido a tejido. Las isoformas K-ras4A y K-Ras4B son variantes generadas por “*splicing*” alternativo de cuatro exones. Las mutaciones en los genes *ras* se han encontrado en un 30% de todos los cánceres humanos. Los tumores difieren tanto en la isoforma asociada a la enfermedad como en la incidencia de mutaciones de dicha isoforma. Por ejemplo, mientras que el 90% de los adenocarcinomas pancreáticos están asociados con una mutación oncogénica de Ras que es invariablemente en el gen *K-ras*, tan sólo en el 10% de los cánceres de vejiga existen mutaciones en Ras, que ocurren en el gen H-Ras (Bos, 1989; Fehrenbacher *et al.*, 2009).

3) LA CASCADA DE LAS MAP CINASAS (MAPKs).

Una de las cascadas efectoras requeridas por la mayoría de los RTKs es la cascada de las proteínas cinasas activadas por mitógenos o vía de las MAP cinasas (MAPK), la cual incluye a Raf, MEK y cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK).

Los miembros de la familia de las MAPKs son serina/treonina cinasas, que juegan un papel esencial en la transducción de señales al modular la transcripción de genes en el núcleo en respuesta a cambios en el entorno celular. Las MAPKs controlan funciones celulares claves, como la proliferación, la diferenciación, la migración y la apoptosis, así como también participan en cierto número de enfermedades como la inflamación crónica y cáncer (Davis, 2000; Kyriakis *and Avruch*, 2001; McKay *and Morrison*, 2007; Pearson *et al.*, 2001; Schaeffer *and Weber*, 1999; Zarubin *and Han*, 2005).

Generalmente, la señal iniciada por la unión de un ligando a su RTK correspondiente desencadena una serie de eventos, en los que está incluido Ras, como previamente se ha referido, y Ras pasa la señal a las MAPKs a partir de la activación de Raf, que a su vez activa a MEK y este último a ERK1/2. En la FIG. 8 se aprecia que la señalización a partir de un RTK puede darse y mantenerse activa en diferentes compartimentos intracelulares a parte de la membrana plasmática, como en endosomas y aparato de Golgi. Recientemente se han descrito las proteínas de andamiaje o “*scaffold*” como KSR, paxilina, MP1/p14 y Sef que mantienen fijas y en cercanía a los componentes de las MAPKs, lo cual favorece una señalización eficiente.

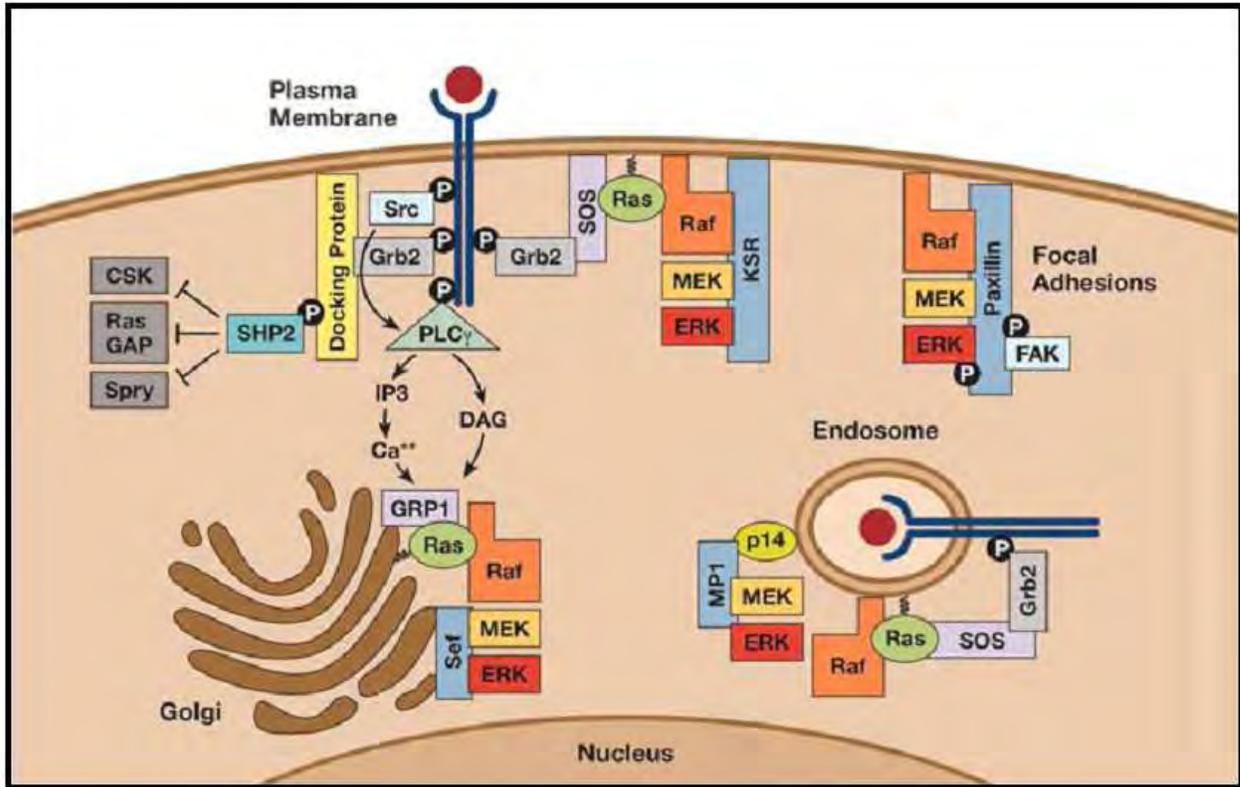


FIGURA 8.- VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL RTK A LAS ERK CINASAS: LA ACTIVACIÓN DE RAS Y ERK EN VARIOS COMPARTIMENTOS INTRACELULARES. En la membrana plasmática, los RTKs activados promueven la activación de Ras tras el reclutamiento de los complejos Grb2/Sos. La proteína KSR es una molécula de andamiaje (*scaffold*) que facilita la activación de la cascada de las MAPKs dependiente de Ras en la membrana celular, mientras que la paxilina dirige dicho ensamblaje en las adhesiones focales. También se han encontrado complejos activos en señalización conteniendo receptores internalizados, Grb2/Sos y Ras en endosomas, donde MP1 sirve de andamiaje junto con la proteína adaptadora p14. Los RTKs activados también pueden dirigir la activación de Ras asociado a Golgi por medio de una vía de señalización en la que están involucrados Src, PLC γ y RasGRP1; en estos complejos, Sef funciona como molécula de andamiaje y facilita la activación de las MAPKs. La tirosina fosfatasa SHP-2 es otro efector de los RTKs que regula positivamente la señal de Ras al antagonizar la capacidad de los reguladores negativos, tales como CSK, RasGAP y Sprouty (McKay and Morrison, 2007)

4) LA VIA DE LA PI3K.

Desde su descubrimiento en los años 1980's, se encontró que la familia de las cinasas denominadas fosfoinositol 3 cinasas (PI3K) tenían papeles reguladores clave en muchos procesos celulares, incluyendo la supervivencia celular, la proliferación y la diferenciación (Bader *et al.*, 2005; Engelman *et al.*, 2006; Vivanco and Sawyers, 2002). Las PI3K son efectores de los RTKs y de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), capaces de transducir señales a partir de varios factores de crecimiento y citocinas, creando mensajes intracelulares como son los fosfolípidos, los cuales activan a la proteína serina-treonina cinasa pAkt (también conocida como proteína cinasa B o PKB) y a otras vías efectoras (FIG. 7, lado izquierdo). La

proteína supresora de tumores PTEN (fosfatasa y homóloga a la tensina) es el regulador negativo más importante de la vía de señalización a partir de PI3K (Cantley *and* Neel, 1999; Cully *et al.*, 2006). Estudios genómicos recientes de cánceres humanos, han revelado que muchos componentes de la vía de la PI3K son blancos frecuentes de mutaciones germinales o mutaciones somáticas en un amplio rango de cánceres humanos. Estos hallazgos, y el hecho de que la PI3K y otras cinasas en la vía de la PI3K son susceptibles para intervención farmacológica, hacen de esta vía una de las más atractivas para el tratamiento terapéutico de los cánceres (Hennessy *et al.*, 2005)

CICLO CELULAR Y SU REGULACIÓN.

Después de la activación de las cascadas de señalización mitogénicas, las células son comprometidas a entrar a una serie de pasos regulados que les permiten transitar por su ciclo celular. La síntesis de DNA (duplicación del genoma), también conocida como fase S, está seguida por su separación en dos células hijas (separación de cromátidas) o fase M. La fase G2 (el tiempo entre las fases S y M) representa el período comprometido en la progresión del ciclo celular. Para que las células puedan continuar el ciclo y avanzar a la siguiente fase, necesitan que la fase previa sea completada; de otra manera, se activan mecanismos correctores de fallas o “*cell cycle checkpoints*” (Paulovich *et al.*, 1997). Ver el diagrama en la FIG. 9 en donde se representan las transiciones de G1/S y G2/M; así como las moléculas más importantes (Senderowicz, 2003).

La maquinaria del ciclo celular está gobernada por la activación cíclica de los complejos de cinasas dependientes de ciclina (CDKs). Los complejos están compuestos por la CDK propiamente (serina-treonina cinasa con propiedades catalíticas) como las CDK1, CDK2, CDK4 y CDK6 y subunidades regulatorias, que incluyen a las ciclinas A, B, D y E e inhibidores de CDKs endógenos (CKIs) tales como p21^{Cip1/Waf1} y p27^{Kip1}. La función principal de las CDKs, es la fosforilación de los sustratos que se requieren para la progresión del ciclo celular (Morgan, 1997). Uno de los sustratos cruciales es el producto del gen de retinoblastoma (pRb), un gen supresor de tumores que es disfuncional en la mayoría de las neoplasias humanas como resultado de la hiperactividad de las CDKs (Senderowicz, 2003).

El primer nivel de regulación de las CDKs es la disponibilidad de las ciclinas durante las distintas fases del ciclo celular. En un segundo nivel, la actividad de los complejos de CDKs son regulados por los CKIs, los cuales generalmente inhiben la progresión del ciclo celular. Estas

proteínas caen dentro de dos familias basadas en sus propiedades estructurales y funcionales. La familia de INK4 incluye a p16, p15, p18 y p19 (Belletti *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 1995; Guan *et al.*, 1994; Hannon *and* Beach, 1994; Hirai *et al.*, 1995; Serrano *et al.*, 1993). Todas éstas tienen

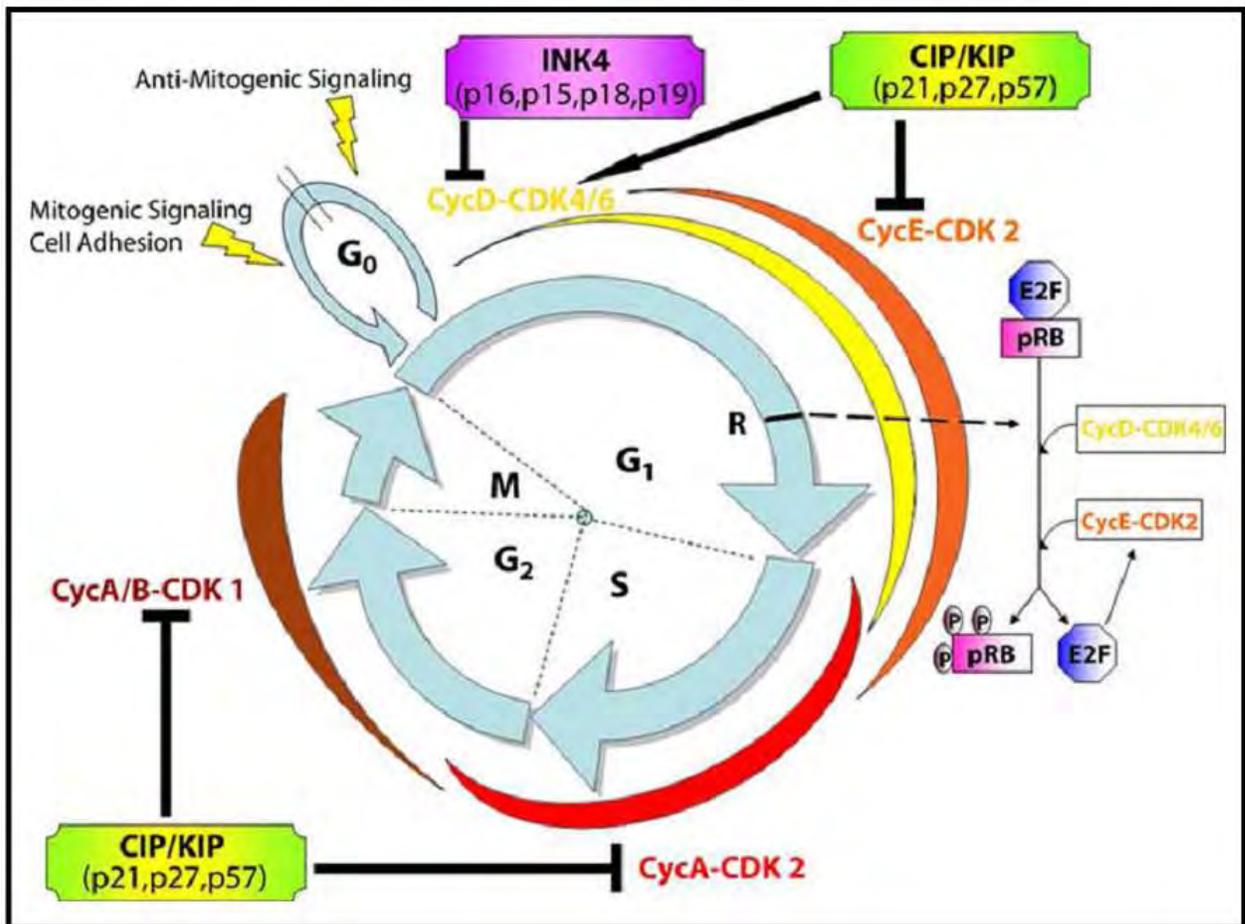


FIGURA 9. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR. Los estímulos mitogénicos inducen la progresión del ciclo celular de la fase G₀ a la de G₁, induciendo la expresión de ciclinas del tipo D y reduciendo la expresión de p27^{Kip1}. La activación secuencial de la ciclina E-CDK2, ciclina A-CDK2, ciclina A-CDK1 y ciclina B1-CDK1 permite a las células pasar a través del punto de restricción (R) en la transición G₁-S y completar la división mitótica. El paso por el punto R se debe a la inactivación de la proteína pRB por la fosforilación dependiente de CDKs (Belletti *et al.*, 2005).

4 repetidos de ankirina y forman complejos con CDK4 y/o CDK6 y las ciclinas del tipo D. Su actividad depende de la presencia de una pRb normal (Chan *et al.*, 1995; Guan *et al.*, 1994). La máxima expresión de las proteínas INK4 ocurre durante la mitad de la fase S en células en proliferación. Tanto p15 como p16 muestran una alta frecuencia de “deleciones” génicas, y varios tumores humanos y líneas celulares tienen mutaciones en el gen de p16, sugiriendo que

estos genes podrían funcionar como supresores de tumores (Hirama *and* Koeffler, 1995; Reed *et al.*, 1995).

El segundo grupo de CKIs, perteneciente a la familia de Cip/Kip, incluye a p21^{Cip1/Waf1} (p21), p27^{Kip1} (p27) y p57^{Kip2} (p57) (Belletti *et al.*, 2005; El-Deiry *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993; Hengst *and* Reed, 1996; Kato *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995; Matsuoka *et al.*, 1995; Polyak *et al.*, 1994a; Polyak *et al.*, 1994b; Ponce-Castaneda *et al.*, 1995; Toyoshima *and* Hunter, 1994; Xiong *et al.*, 1993). Estas proteínas inhiben las actividades cinasa de la ciclina E-CDK2 pre-activada en G1, ciclina D-CDK4/6 y otras ciclinas. Las proteínas Cip/Kip se designaron como los CKIs universales porque interactúan con varios complejos de CDKs, con ciclinas A, E, D1, D2, D3 y CDKs (Xiong *et al.*, 1993). La sobreexpresión de las proteínas Kip conduce al arresto del ciclo celular. Los miembros de la familia de proteínas Kip comparten una gran homología. La proteína p27^{Kip1} tiene un 42% de homología en su secuencia aminoacídica respecto a p21^{Cip1/Waf1} y 47% de homología con la región amino-terminal de p57^{Kip2}, que es la región implicada en la inhibición de las CDKs. Todas las proteínas Kip tienen una señal de localización nuclear en su dominio carboxi-terminal. A diferencia del grupo de las INK4, el cual inhibe exclusivamente a CDK4/6, los inhibidores Cip/Kip pueden actuar adicionalmente en complejos con CDK2.

1) LA PROTEÍNA p27^{Kip1} Y SU REGULACIÓN.

Los niveles de la proteína p27^{Kip1} oscilan durante el ciclo celular (FIG. 10), mostrando los niveles máximos durante G1, quiescencia (G0) (Hengst *and* Reed, 1996), en células arrestadas en G1 por inhibición de crecimiento por contacto (Kato *et al.*, 1997; Swat *et al.*, 2009; Yanagisawa *et al.*, 1999), en presencia de factor de crecimiento transformante β (Polyak *et al.*, 1994b; Reynisdottir *et al.*, 1995), AMP cíclico (Kato *et al.*, 1994) y cuando hay daño en DNA debido a agentes genotóxicos (Cuadrado *et al.*, 2009). También se ha visto que incrementan los niveles de p27^{Kip1} cuando las células pierden la adhesión a matriz extracelular, en la inducción de diferenciación y en los tratamientos con INF- γ , rapamicina y lovastatina (Hengst *et al.*, 1994; Polyak *et al.*, 1994a; Polyak *et al.*, 1994b).

Por otro lado, algunos factores de crecimiento, tales como la IL-2 y el EGF, parecen estimular la proliferación celular al menos en parte por degradación de p27^{Kip1} (Pedroza-Saavedra *et al.*, 2010; Takuwa *and* Takuwa, 1997). En contraparte, los niveles del mRNA de p27^{Kip1} no cambian durante un ciclo celular no perturbado.

Los niveles de la proteína p27^{Kip1} se mantienen regulados a través de la degradación

proteolítica dependiente de ubiquitina (FIG. 10). En la fase G1 temprana del ciclo celular, la fosforilación de una pequeña fracción de $p27^{Kip1}$ en la Ser10 permite su exportación nuclear, luego en el citoplasma ocurre su degradación y promueve la activación de los complejos nucleares de ciclina E-CDK2 que fosforilan a la $p27^{Kip1}$ nuclear restante, en Thr187, lo cual favorece su degradación en el núcleo por ubiquitinación (Bloom *and* Pagano, 2003; Chu *et al.*, 2008). Evidencia reciente señala a la proteína Kis como la cinasa responsable de la fosforilación en la Ser10 en G1 (Boehm *et al.*, 2002) y a Akt como la cinasa adicional necesaria para la exportación nuclear de $p27^{Kip1}$ (Fujita *et al.*, 2002). En la FIG. 11 aparecen todos los sitios que regulan a $p27^{Kip1}$ y las moléculas implicadas en ello, que son activadas por distintas vías como se aprecia en la FIG. 12.

La unión de una cadena de moléculas de ubiquitina a una proteína por la acción concertada de tres enzimas, la E1 (enzima activadora de ubiquitina), la E2 (enzima conjugante de ubiquitina) o Ubc y la E3 (ubiquitin ligasa) marcan al sustrato para la degradación por una proteasa multicatalítica, el proteosoma 26S. La especificidad por el sustrato está dada por la

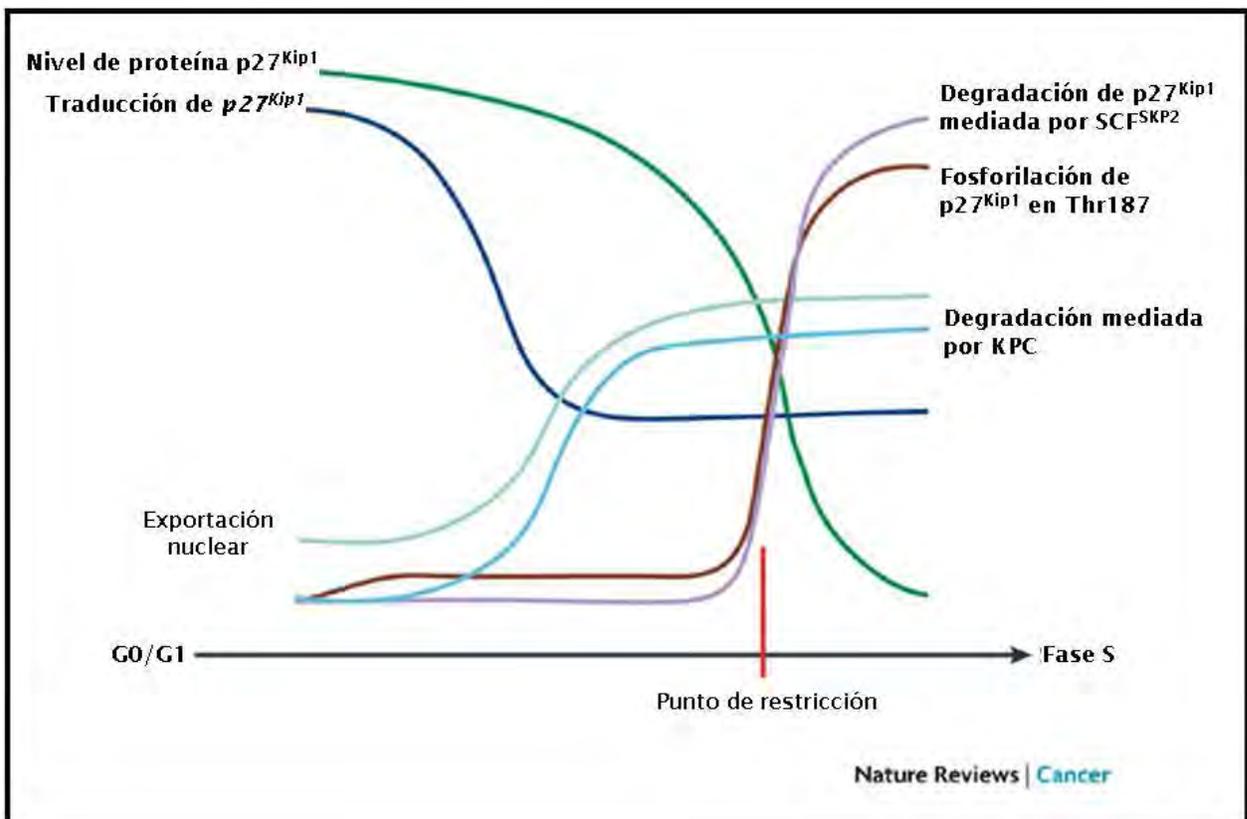


FIGURA 10. MODELO ESQUEMÁTICO DE LOS NIVELES DE $p27^{Kip1}$ Y SU REGULACIÓN DURANTE LA TRANSICIÓN DE LAS FASES G0/G1 A S. Durante la progresión en G1, disminuye la traducción de $p27^{Kip1}$. En la fase G1 temprana, aumentan la exportación nuclear y la degradación de $p27^{Kip1}$ mediada por el complejo promotor de ubiquitinación (KPC). La fosforilación de la treonina 187 (Thr187) incrementa en la fase G1 tardía y marca a $p27^{Kip1}$ para la proteólisis mediada por el complejo SCF^{SKP2} (SKP1/ciclina/SKP2) (Adaptada de Chu *et al.*, 2008).

gran variedad de enzimas Ubc y E3 que existen. Se ha demostrado que p27^{Kip1} es sustrato para degradación dependiente por ubiquitinación tanto *in vivo* como *in vitro* (Pagano *et al.*, 1995). Se han detectado niveles altos de p27^{Kip1} y de formas modificadas por ubiquitina en células tratadas con inhibidores de la actividad del proteosoma 26S. Notoriamente, la ubiquitinación de p27^{Kip1} disminuye en células quiescentes comparada con células en proliferación.

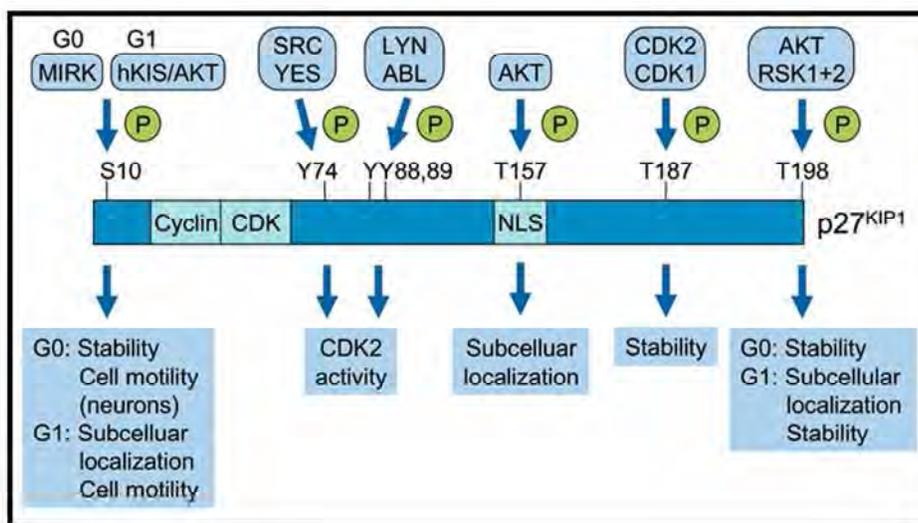


FIGURA 11. SUMARIO DE LOS SITIOS DE FOSFORILACIÓN PRESENTES EN p27^{KIP1} REALIZADOS POR CINASAS CONOCIDAS QUE MODIFICAN SITIOS INDIVIDUALES. También se incluyen las funciones asociadas con estas modificaciones post-traduccionales (Vervoorts *and* Lüscher, 2008).

2) CARCINOGENESIS Y p27^{KIP1}.

Existen diversos estudios en donde se ha examinado la expresión de la proteína p27^{KIP1} en varios tumores humanos y se encontró que esta proteína está reducida en cánceres epiteliales, entre los que se incluyen el de colon, mama, próstata, pulmón y ovario, además de tumores cerebrales y linfomas. También se ha investigado la expresión de la proteína p27^{KIP1} en carcinomas cervicales y se encontró que estaba disminuida en el 65% de ellos en comparación con el tejido normal. Los niveles reducidos de p27^{KIP1} pueden contribuir al desarrollo de carcinomas cervicales al permitir a las células entrar a la fase S del ciclo celular (Skomedal *et al.*, 1999).

Comparando con una ausencia total de la proteína p27^{KIP1}, se requieren bajos niveles de la misma para favorecer la transformación celular, debido a que permite el ensamblado de complejos entre las ciclinas de tipo D con CDK4 y CDK6, sin inhibir a los complejos de CDK2.

Esta hipótesis se apoya en un modelo de ratón en donde se demuestra que el epitelio mamario de ratones $p27^{Kip1+/-}$ es más susceptible a la tumorigénesis inducida por oncogenes que las glándulas mamarias de ratones $p27^{Kip1-/-}$ al menos en cooperación con oncogenes particulares como Erb2 (Muraoka *et al.*, 2002).

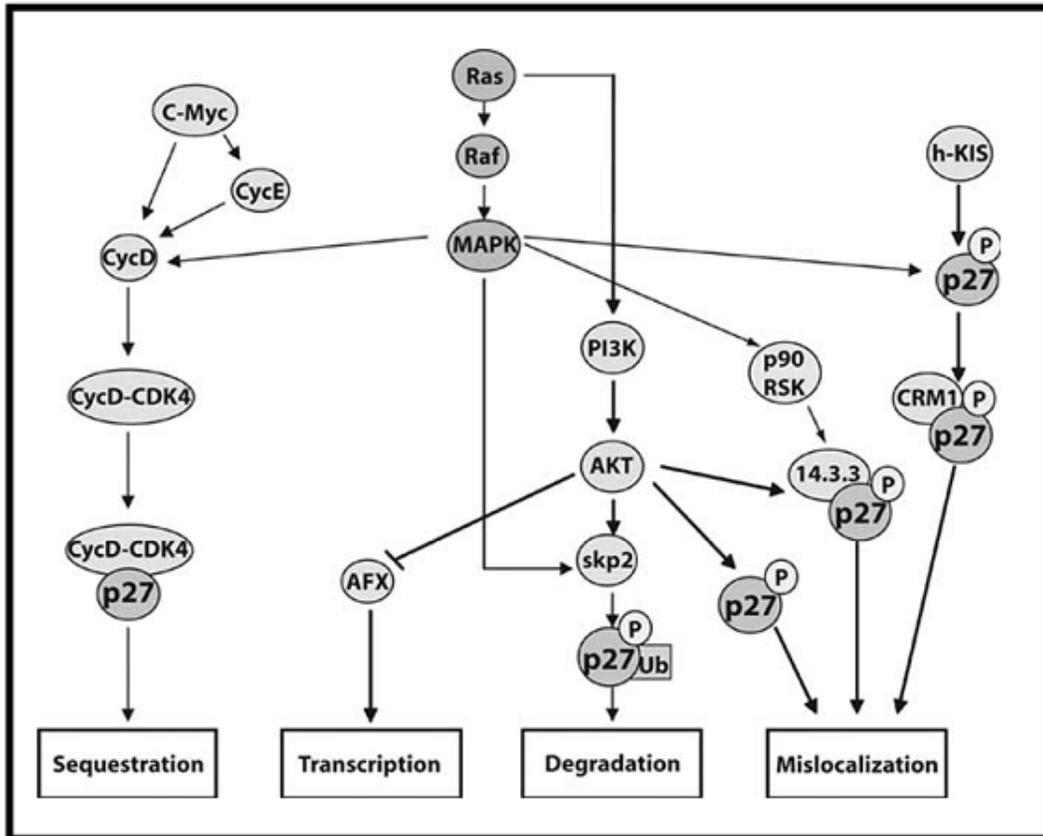


FIGURA 12. LAS DIFERENTES VÍAS QUE REGULAN INTRACELULARMENTE LA EXPRESIÓN DE $p27^{Kip1}$ Y SU FUNCIÓN. Las 2 principales vías que regulan los niveles de $p27^{Kip1}$ a nivel postranscripcional, son la cascada de las MAP cinasas (MAPKs) y la vía de PI3K, ambas dependientes de la activación de Ras. Una parte de $p27^{Kip1}$ puede quedar secuestrada en los complejos ciclina D-CDK4 para mantener activos estos complejos. La fosforilación de $p27^{Kip1}$ puede conducir a la traslocación de esta proteína de núcleo a citoplasma para ser degradada (Belletti *et al.*, 2005).

Significativamente, numerosos estudios han demostrado que $p27^{Kip1}$ es un marcador pronóstico independiente en muchos cánceres humanos, correlacionando con un grado tumoral más alto y poca sobrevivencia (Catzavelos *et al.*, 1997; Chu *et al.*, 2008; Mori *et al.*, 1997). Aún más, a menudo los niveles de $p27^{Kip1}$ en tumores no correlacionan inversamente con la expresión de marcadores de proliferación, sugiriendo que la disminución de la expresión de $p27^{Kip1}$ no sólo resulta en la sobreactivación de las CDKs sino que pudiera producir efectos adicionales aún no bien entendidos, los cuales proveerían una ganancia de función. En algunos

tumores, p27^{Kip1} es localizado aberrantemente en el citoplasma (Baldassarre *et al.*, 1999; Ciaparrone *et al.*, 1998; Orend *et al.*, 1998; Piva *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 1998). El secuestro de p27^{Kip1} en el citoplasma puede servir para bloquear la actividad inhibitoria de p27^{Kip1} hacia los complejos de ciclina E/CDK2 y permitir el incremento en la proliferación celular. La localización errónea de p27^{Kip1} favorece la progresión del ciclo celular y puede contribuir a la transformación celular. De acuerdo con esto, las líneas celulares transformadas y derivadas de tumor, que tienen crecimiento independiente de adhesión, muestran más de la mitad de su p27^{Kip1} secuestrado en el citoplasma (Orend *et al.*, 1998) y dicho desplazamiento de este CKI ha sido descrito en carcinomas de colon, ovario, mama, Barrett's y tiroides (Baldassarre *et al.*, 1999; Ciaparrone *et al.*, 1998; Hurteau *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 1998). También se ha observado que el Ras oncogénico causa la regulación negativa en la expresión de p27^{Kip1} en la fase G1 tardía en varios tipos celulares, ya sea suprimiendo la síntesis *de novo* de p27^{Kip1}, incrementando la degradación proteica o aún más, promoviendo la localización errónea de p27^{Kip1} en el citoplasma y su secuestro por la sobreexpresión de ciclina D1 y/o CDK6 (Cheng *et al.*, 1998).

Aunque la expresión de la proteína p27^{Kip1} disminuye en los tumores humanos, el mRNA no lo hace así, lo cual elimina la posibilidad de que mecanismos transcripcionales sean la causa de este decremento. Más bien, los bajos niveles de la proteína p27^{Kip1} que se han observado en muchos cánceres humanos son debidos a un aumento en la proteólisis (Chiarle *et al.*, 2002; Esposito *et al.*, 1997; Kawana, Tamaru *et al.*, 1998; Kudo *et al.*, 2001; Loda *et al.*, 1997; Piva *et al.*, 1999). Lo anterior sugiere que las proteínas involucradas en la degradación de p27^{Kip1} pueden tener propiedades oncogénicas (FIG. 13) (Bloom *and* Pagano, 2003). En particular, los niveles de Skp2 han sido examinados en tumores humanos y se ha demostrado que correlacionan con el grado de malignidad (Chiarle *et al.*, 2002; Gstaiger *et al.*, 2001; Hershko *et al.*, 2001; Kudo *et al.*, 2001; Latres *et al.*, 2001; Masuda *et al.*, 2002; Signoretti *et al.*, 2002; Yokoi *et al.*, 2002). Descubrimientos semejantes se han encontrado para altos niveles de ciclinas A y E (revisión en Bartek *and* Lukas, 2001). Estudios inmunohistoquímicos han revelado que altos niveles de Skp2 y bajos niveles de p27^{Kip1} correlacionan con un grado superior de malignidad en linfomas (Latres *et al.*, 2001). Además, las investigaciones en tejido oral han demostrado que los niveles de Skp2 están elevados en adenomas epiteliales y continúan incrementándose durante la progresión a carcinomas (Gstaiger *et al.*, 2001), mientras que la expresión de Skp2 correlaciona con un pronóstico pobre en cáncer oral (Kudo *et al.*, 2001). Todos estos estudios nos indican que Skp2, al igual que p27^{Kip1}, pueden ser marcadores para pronóstico para una gran variedad de cánceres.

Por otro lado, la desregulación de la expresión de la proteína p27^{Kip1} puede ser clave

para su capacidad oncogénica. Mientras que la estimulación con factores de crecimiento inhibe la degradación proteosómica de Skp2 (Wirbelauer *et al.*, 2000), lo cual se observa en células en G0/G1, la adhesión a matriz extracelular sobreestimula los niveles de mRNA de Skp2 (Carrano *and* Pagano, 2001). En ausencia de adhesión celular, las células normales o immortalizadas no expresan Skp2 después de estimulación con suero y muestran niveles elevados de p27^{Kip1} (Carrano *and* Pagano, 2001). En contraste, las células cancerosas continúan expresando Skp2 cuando se colocan en suspensión (Signoretti *et al.*, 2002). Una suspensión de células immortalizadas que expresan Skp2 transfectado, son capaces de degradar p27^{Kip1} y entrar en la fase S (Carrano *and* Pagano, 2001). De acuerdo con esto, las células de cáncer de mama que expresan una mutante dominante de Skp2 forman significativamente menos colonias en agar suave que las células control (Signoretti *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que la sobre-expresión de Skp2 sería una ventaja de crecimiento para células cancerosas, lo que permite la proliferación en ausencia de adhesión. El mecanismo de sobre-expresión de Skp2 en cáncer aún no está bien definido, pero algunos datos aún no publicados (mención en Bloom *and* Pagano, 2003) indican que la amplificación del locus Skp2 puede ser la causa, al menos en algunos tejidos epiteliales.

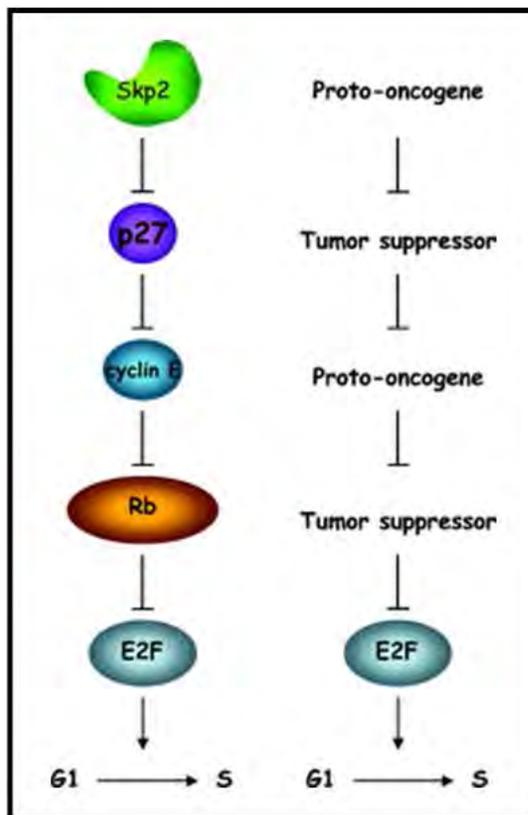


FIGURA 13. LA VÍA DE p27^{Kip1}. La proteína pRb supresora de tumores se regula negativamente por la fosforilación dependiente de ciclina E, un evento necesario para la activación del factor transcripcional E2F, el cual es requerido para la transición de G1/S. Como se menciona en el texto, p27^{Kip1} y Skp2 funcionan por encima de la ciclina E. Debido a la naturaleza de estas proteínas, la transición G1/S es regulada por la actividad alternante de proto-oncogenes y supresores de tumores para mantener bajo control los eventos que conducen a la proliferación celular (Bloom *and* Pagano, 2003).

II. MARCO TEÓRICO

Tomando en consideración todo lo anteriormente expuesto, y resumiendo lo más importante en la FIG. 14, observamos que E5 de HPV16 no solamente actúa sobre el receptor de EGF, sino su efecto también se observa sobre componentes de la vía de señalización que parten del mismo, como MAPKs (ERK1 y ERK2) (Crusius *et al.*, 1997; Gu and Matlashewski, 1995). Por su parte, E5 también favorece la sobreexpresión de factores transcripcionales como c-Fos y c-Jun que juntos conforman al complejo AP-1 (Chen *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996a; Chen *et al.*, 1996b), el cual estimula la transcripción de genes implicados en crecimiento, pudiendo actuar éste último en la regulación de la expresión del gen de p21^{Waf1} (Tsao *et al.*, 1996) y finalmente conducir a la progresión del ciclo celular, lo que conlleva a un incremento de células en fase S (Nath *et al.*, 2006). Es interesante enfatizar que la producción de transcritos de los HPVs también pueden ser estimulados, debido a que éstos tienen en su región reguladora (LCR) tres sitios que son reconocidos por el factor AP-1 (Chong *et al.*, 1991).

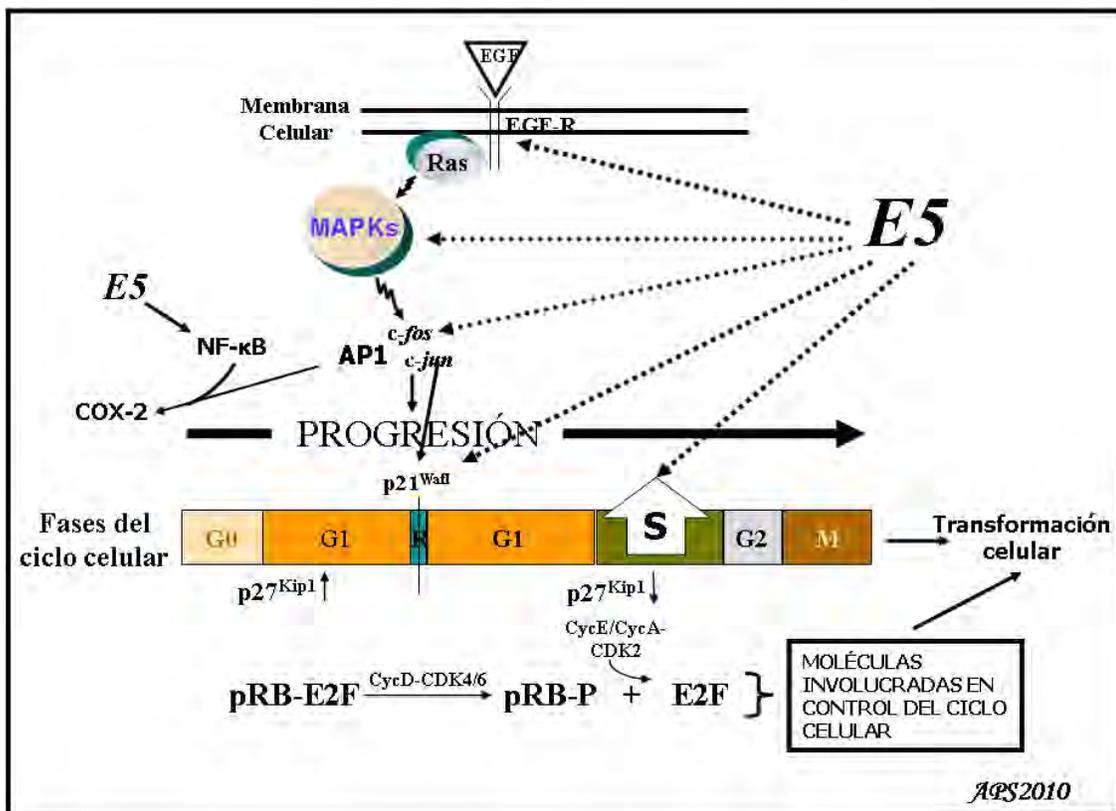


FIGURA 14.- MARCO TEÓRICO. En este diagrama se resumen los hechos experimentales más importantes que conforman el marco teórico de esta tesis y de donde se deriva la Hipótesis. La proteína E5 de HPV16 incide sobre varios componentes de la vía de señalización que parten de EGF y su receptor (en la cual se encuentra Ras), con lo cual se puede propiciar el inicio de la transformación celular. Las flechas punteadas indican una acción indirecta de E5 sobre las moléculas indicadas, aunque se desconoce el mecanismo de cómo se lleva a cabo esta acción.

La estrecha asociación de E5 con los factores de crecimiento y sus receptores, y el hecho de que el gen **E5** se pierde en etapas tempranas del cáncer cervical debido a la integración del virus al genoma celular, haría pensar en la posibilidad de que E5 tendría un papel clave en el ciclo de vida viral y así podría llevar a cabo su actividad transformante en etapas tempranas de la neoplasia a través de incrementar la respuesta celular a factores como el EGF, conduciendo directamente a la desregulación de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular como se ha reportado para p21^{Waf1} (Tsao *et al.*, 1996), entre otras.

El hecho de que **E5** sea un oncogén, pero este se pierda durante la integración del virus, sugiere que **E5** está involucrado en los estadios tempranos de la transformación celular, estableciendo las condiciones adecuadas para que los oncogenes **E6** y **E7** generen el proceso canceroso posteriormente. Se sabe que E5 se asocia al receptor a EGF incrementando la vida media de éste, así como su actividad. Sin embargo, aún se desconoce mucho del papel que juega E5 en el inicio de la transformación celular y cómo modifica los caminos de señalización celular que permite finalmente el desarrollo del CC, por lo que consideramos importante profundizar en el estudio de este oncogén.

Sin embargo, a pesar de lo que se conoce sobre la actividad de E5, todavía se desconocen los mecanismos mediante los cuales esta oncoproteína modifica el ciclo celular y cómo esto coadyuva en el proceso de transformación celular. Por lo que nos dimos a la tarea de identificar las fases del ciclo celular que son modificadas por E5 y las proteínas de la maquinaria del ciclo celular que son modificadas en sus niveles, de tal manera que se permita la progresión del ciclo celular y con ello favorecer finalmente el inicio de la transformación celular.

III. HIPÓTESIS

Si tanto Ras como E5 se encuentran en el camino de señales transmitidas por el EGF-r y éstas culminan a su vez en eventos relacionados con el ciclo celular y en la activación de genes importantes en la transcripción como son *c-fos* y *c-jun*, entonces es posible que E5 de HPV16 aproveche la vía de transducción de señales que parten del EGF-r y mediadas por Ras, para alterar el ciclo celular y favorecer el proceso de transformación.

IV. OBJETIVO GENERAL

Identificar si E5 de HPV16 es capaz de llevar a la transformación celular alterando el ciclo celular por medio de un mecanismo dependiente de la vía de transducción de señales de EGF-r.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Determinar si el proceso de transformación que promueve la oncoproteína E5 de HPV16 es dependiente del camino de señales mediadas por EGF-r.
- b) Determinar qué proteínas de ciclo celular son alteradas en su expresión o actividad por E5 de HPV16.
- c) Determinar si la posible alteración en los niveles de proteínas del ciclo celular por E5 es dependiente de la vía de transducción de señales de EGF-r y mediadas por Ras.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1) CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pcDNA3-E5.

Se clonó en el sitio *BamHI* de pcDNA3 (Invitrogen, C.A., EEUU), un fragmento de 1225 pb de HPV16 (nucleótidos 3761 a 4986) (Seedorf *et al.*, 1985) procedente del plásmido pJ4.E5 donado a nuestro laboratorio por el Dr. L. Banks (Pim *et al.*, 1992), que contiene el gen completo de **E5** (Halbert *and* Galloway, 1988).

Para la clonación, tanto pJ4.E5 como pcDNA3 fueron cortados con la enzima *BamHI*, para liberar el fragmento de 1225 pb de pJ4.E5 y linearizar pcDNA3, los cuales fueron purificados a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en TAE 1X por el método descrito en Sambrook *et al.*, 1989. Los fragmentos obtenidos y cuantificados por medio de espectrofotometría con luz UV (Sambrook *et al.*, 1989), se colocaron en una reacción de ligación en una proporción molar 3:1 (inserto/vector) con T4 DNA ligasa (Biolabs) por 16 h a 16°C de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La mezcla de ligación obtenida se utilizó para transformar bacterias competentes DH5 α que fueron sembradas en medio LB-agar con ampicilina a 50 μ g/ml (Chung *and* Miller, 1988). Posteriormente, se aislaron varias colonias bacterianas para purificar el DNA plasmídico por *miniprep* (Sambrook *et al.*, 1989) y proceder a su caracterización mediante análisis con las enzimas de restricción *BamHI*, *PstI* y *KpnI*.

Una vez realizado el análisis por digestión enzimática de los DNA plasmídicos procedentes de las colonias bacterianas que se obtuvieron después de la ligación y la transformación, se obtuvo la clona con el plásmido pE55a (posteriormente renombrado como pcDNA3-E5) el cual generó solo dos fragmentos con *BamHI* (vector de 5446 pb + inserto de 1225 pb). Debido a que los extremos de los fragmentos ligados eran *BamHI*, se tuvo que comprobar la orientación del fragmento insertado en pcDNA3 mediante corte con la enzima *PstI*, la cual tiene sitios de corte en **E5** y el vector, lo que generó fragmentos de 5058, 1349 y 264 pb en la orientación correcta como se observó para la clona pE55a. También se utilizó el corte único con la enzima *KpnI* para verificar el tamaño total del plásmido pcDNA3-E5, el cual debe ser de aproximadamente 6671 pb (FIG. 15).

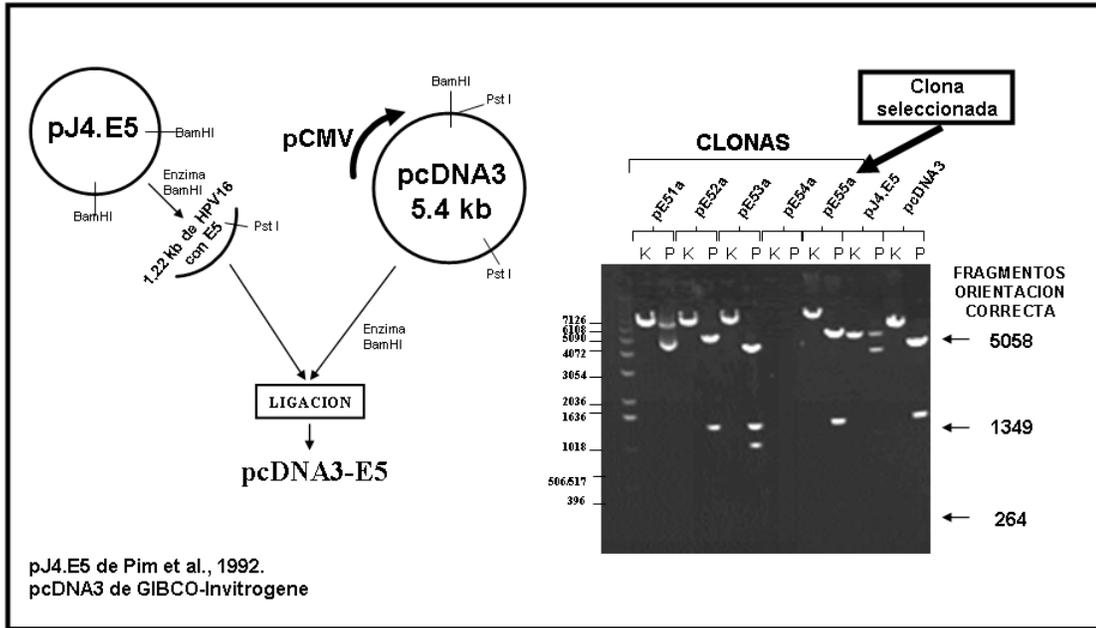


FIGURA 15. CLONACIÓN DEL FRAGMENTO DE 1.22 kpb DE HPV16 EN pcDNA3. Este fragmento contiene al gen **E5** y originalmente estaba insertado en el vector pJ4.E5 donado a nuestro laboratorio por el Dr. L. Banks. Para la clonación de pJ4.E5 se extrajo el fragmento de 1.22 kb mediante corte con *Bam*HI y este se ligó al vector en el mismo sitio. Bacterias DH5α fueron transformadas y varias clonas aisladas para su caracterización. Después del análisis por digestión enzimática, se obtuvo la clona pE55a con **E5** insertado en la orientación correcta, a la cual se denominó posteriormente pcDNA3-E5. En pcDNA3 la expresión de los genes clonados queda bajo regulación del promotor de citomegalovirus. K = Kpn I, P = Pst I.

2) SECUENCIA PARCIAL DEL FRAGMENTO DE 1.22 kpb CLONADO EN pcDNA3.

Además de verificar la presencia del fragmento clonado en pcDNA3-E5 y su orientación correcta, el plásmido purificado mediante *Endofree Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN) se envió a secuenciar al Instituto de Biotecnología (UNAM) utilizando el protocolo del *Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-based Sequencing*.

El reporte de la Unidad de Secuenciación arrojó la secuencia de las primeras 869 bases del fragmento de 1.22 kpb (FIG. 16), donde se aprecia en rojo la que corresponde al gen de **E5**, y que es idéntica a la secuencia reportada por Halbert *and* Galloway (1988). Además, el fragmento de 1.22 kpb también posee las primeras 751 pb de la secuencia que codifica para L2 del mismo virus. Aunque **E5** y **L2** están en el mismo marco de lectura y de que son las únicas regiones potencialmente codificantes en este fragmento de acuerdo al programa *ORF Finder* del *NCBI*, teóricamente es muy probable que se traduzca únicamente **E5** ya que es el único que posee codón de término, mientras que la porción correspondiente a **L2** no será traducida al no poseer el codón de término en fase con su **AUG**.

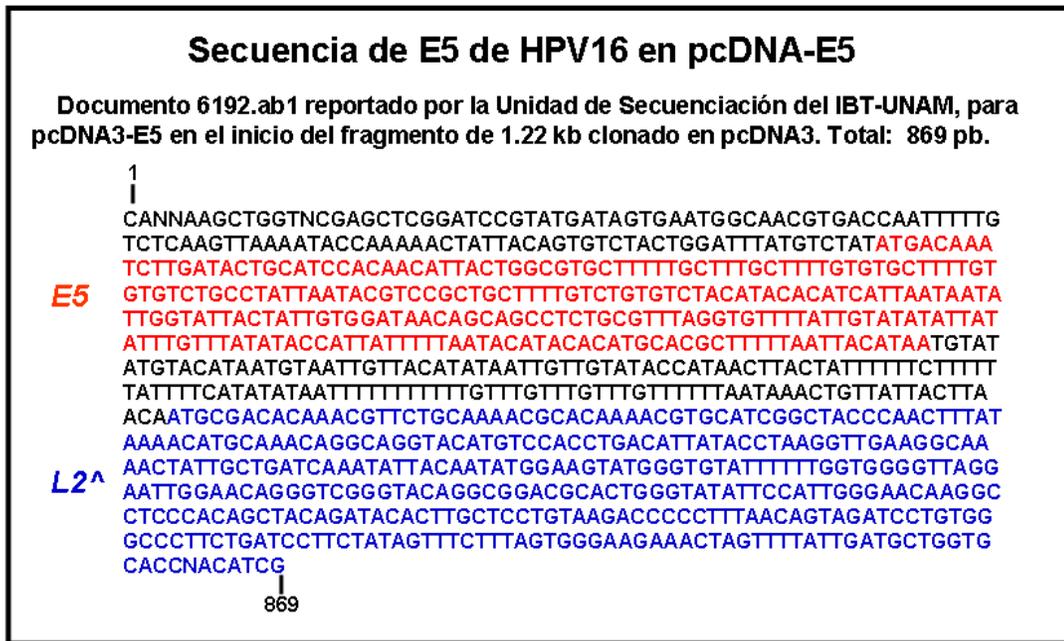


FIGURA 16. SECUENCIA PARCIAL DEL FRAGMENTO DE 1.22 kpb CLONADO EN pcDNA3. El plásmido pcDNA3-E5 se envió a secuenciar al IBT. El reporte de la Unidad de Secuenciación arrojó la secuencia de las primeras 869 bases del fragmento de 1.22 kpb donde se aprecia en rojo la que corresponde al gen de E5, la cual es 100% igual a la secuencia reportada para E5 de HPV16 (NCBI Reference Sequence: NC_001526.1 Human papillomavirus - 16, complete genome VERSION NC_001526.1 GI:9627100. El fragmento de 1.22 kpb también posee las primeras 751 pb de la secuencia que codifica para L2 del mismo virus, aunque la secuencia en azul corresponde solamente a las primeras 366 pb de dicho fragmento (L2[^]). El gen de L2 consta de 1419 pb. E5 y L2 están en el mismo marco de lectura y son las únicas regiones codificantes según el programa ORF Finder del NCBI.

3) LÍNEAS CELULARES Y TRANSFECCIONES.

Todas las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron crecidas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (DMEM-SFB10%). Los fibroblastos de ratón NIH3T3 se obtuvieron de la “*American Type Culture Collection*” (ATCC; VA, EEUU). La línea celular EGFR proviene de la línea celular NIH3T3 y sobre-expresa el receptor humano a EGF, donada al laboratorio por el Dr. D. Lowy (Laboratorio de Oncología Celular, NCI, NIH, Bethesda, MD, EEUU) (Velu *et al.*, 1989).

Las células NIH3T3 o EGFR fueron transfectadas con 5 µg del plásmido pcDNA3-E5 o pcDNA3 utilizando el método de la lipofectina (GIBCO/Invitrogen) como previamente se ha descrito (Ogiso *et al.*, 1990). Después de 15 días de selección en DMEM-SFB10% conteniendo 800 µg/ml de G418, se colectaron el total de las colonias formadas en cada transfección para formar varios “*pools*” celulares que se denominaron 3T3E5 y EGNE5 (para las células NIH3T3 y EGFR que expresan E5, respectivamente). De igual manera, las células NIH3T3 y EGFR

transfectadas con el plásmido control pcDNA3 que fueron resistentes a G418, se denominaron 3T3neo y EGFRneo respectivamente.

En este estudio se utilizaron las células NIH3T3 para poder aislar al sistema de señalización a partir de EGFR, debido a que este sistema no es el regulador primario de proliferación en dicha línea celular. De esta manera, las señales originadas por EGFR podrían ser identificadas sin la interferencia del receptor endógeno murino.

También en algunos experimentos se emplearon las células HaCatE5, las cuales nos fueron donadas por el Dr. Alonso (Oelze *et al.*, 1995) y conforman un sistema inducible para la expresión de E5 de HPV16, en el cual el *ORF* completo de **E5** (nucleótidos 3849 a 4100 de HPV16) fue clonado inmediatamente después del promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) en el plásmido pMSG (Pharmacia). El promotor del MMTV puede ser inducido por dexametasona 2 μ M, logrando así una expresión controlada de E5.

4) PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL Y NORTHERN BLOT.

La preparación de RNA total se realizó de acuerdo a un protocolo estándar (Chomczynski *and* Sacchi, 1987). Brevemente, la monocapa celular crecida en un frasco de 180 cm^2 se lisa con 5 ml de una solución altamente desnaturante de tiocianato de guanidina 4.2 M, citrato de sodio 26.4 mM pH 7.0, N-laurilsarcosina 0.528% y β -mercaptoetanol 0.1 M. El lisado obtenido se transfiere a un tubo COREX y se añade 0.5 ml de acetato de sodio 2 M pH 4.0, 5.5 ml de fenol saturado con agua y 2ml de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1). Mezclar y reposar 15 min en hielo. Centrifugar a 7700 x g 20 min y el RNA se precipita del sobrenadante obtenido, con un volumen igual de isopropanol. Tras otra centrifugación se obtiene una pastilla que se lava con etanol 75%, se deja secar y se disuelve en agua-DEPC.

Para cuantificar la concentración de los RNAs obtenidos, se hace una dilución apropiada de éstos y se lee en un espectrofotómetro a 260/280 nm (Modelo UNICAM UV 300 de ThermoSpectronic) en celdillas de cuarzo y empleando la siguiente fórmula (Sambrook *et al.*, 1989):

$$\mu\text{g/ml de RNA} = (\text{Abs}^{260 \text{ nm}})(\text{factor de dilución})(40 \mu\text{g/ml})$$

Una vez que se obtuvieron los diferentes RNAs de las muestras, éstos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer de corrida (20 mM MOPS, 10 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA pH 8.0 y 2.2 M de formaldehído) para posteriormente ser transferidos a

un filtro de nylon empleando solución de SSC 20X (NaCl 3M y citrato de sodio 0.3M pH 7.0)(Sambrook *et al.*, 1989). Los filtros de nylon secos con los RNAs transferidos, se expusieron a luz UV por 17-18 s a 120 mJ/cm² (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker marca UVP) para unir covalentemente el RNA, y se incubaron en solución de prehibridación por 2 h, tras lo cual se añadieron 500,000 cpm/ml de una sonda de DNA marcada con ³²P-dCTP dirigida contra **E5** de HPV16, contra **p27^{Kip1}** de ratón (fragmento EcoR1-BamH1 del plásmido pBS-m27), o contra el receptor humano a EGF (fragmento EcoRI de 1838 bp del plásmido pHER-A64-1) según se requiriera en el experimento. Las membranas se dejaron en incubación hasta el día siguiente a 42°C con agitación. Posteriormente, las membranas se lavaron dos veces con 2X SSC y 0.2% SDS a temperatura ambiente y una más con 1X SSC y 0.2% SDS a temperatura ambiente por 1 h. Las membranas de nylon se expusieron a películas Kodak X-OMAT K y se guardaron por al menos 24 h a -70°C.

5) ANÁLISIS DEL TRANSCRITO DE E5 MEDIANTE RT-PCR.

Se utilizaron 5 µg de RNA total por cada reacción de transcripción reversa con oligo(dT) y la enzima Mo-MLV RT (Invitrogen, Geithersburg, MD, EEUU). La amplificación de cada cDNA blanco se realizó mediante 30 ciclos de 94°C por 45 s, 54°C por 1 min y 72°C por 2 min, usando 1U de enzima ULTMA por reacción (Perkin Elmer, EEUU). Los oligonucleótidos E5-GST1 (5'-GCCCGGAATTCGACAAATCTTGATACT-3') y E5-GST2 (5'-GCGCCGCTCGCGTTCATGTAATTA AAAAGCG-3') fueron empleados para amplificar la región codificante de **E5** de HPV16 de aproximadamente 275 pb. Para visualizar los productos de la RT-PCR se emplearon geles de poliacrilamida al 6% empleando TBE 1X (Sambrook *et al.*, 1989) como buffer de corrida y tñiendo con una solución de bromuro de etidio a 5 µg/ml en agua.

6) ENSAYO DE CRECIMIENTO EN AGAR SUAVE.

Se sembraron por cuadruplicado 1X10³, 1X10⁴ y 1X10⁵ células en cajas Petri de 60 mm de diámetro, en DMEM-SFB10% conteniendo 0.4% de agar-agar sobre una cama de gel previamente colocada de DMEM-SFB10% con 1% de agar-agar (Chen *and* Mounts, 1990). La mitad de las cajas preparadas contenían EGF a 10 ng/ml, mientras que la otra mitad se dejó sin el factor. Las células se incubaron a 37°C por 15 días, alimentándolas cada tercer día con 0.5 ml de medio DMEM-SFB10% fresco sin EGF o con EGF a 10 ng/ml según correspondiera. Al

final de los 15 días, se realizó el conteo al microscopio del número total de colonias formadas, no importando el tamaño de las mismas.

7) ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR.

Se sembraron cajas Petri de 35 mm de diámetro con 3×10^4 células cada una en 2.5 ml de DMEM-SFB10% por duplicado. A la mitad de las cajas Petri se les añadieron 10 ng/ml de EGF cada tercer día para estimular a las células, mientras que la otra mitad se dejó sin factor. A diferentes tiempos de incubación (1, 2, 5 y 7 días) se cosecharon células para realizar el conteo total por caja, contando por duplicado en una cámara de Neubauer usando PBS y azul de tripano para confirmar viabilidad celular. De estos datos, se obtuvieron las curvas de proliferación celular y los tiempos de duplicación y densidad de saturación de las diferentes líneas celulares la cual fue calculada a partir de tres experimentos independientes.

Para calcular los tiempos de duplicación, se siguió un procedimiento análogo al que se describe en el punto 9 descrito para calcular la vida media de p27^{Kip1}. Se realizó una prueba de *Mann-Whitney* para comparar la diferencia observada entre líneas celulares parentales y las células que expresan E5 y un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

8) ANÁLISIS DE CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.

Las células a analizar fueron sembradas a 1×10^6 células por caja Petri de 60 mm en DMEM-SFB10% por duplicado e incubadas por 32 h a 37°C y en una atmósfera de 5% CO₂. Transcurrido el tiempo indicado, a la mitad de las cajas se le añadió 25 ng/ml de EGF por 16 h. Después del estímulo, todas las células fueron tripsinizadas, resuspendidas en DMEM-SFB10% y contadas en una cámara de Neubauer. Se tomaron igual número de células de cada tratamiento (3×10^5), se lavaron con buffer PBS frío y se fijaron con etanol al 75% en PBS. Posteriormente las células fueron centrifugadas y una vez eliminado el sobrenadante, se tiñeron en la oscuridad por 1 h a temperatura ambiente, con una solución de 10 µg/ml de yoduro de propidio (IP) y 10 µg/ml de RNAsa A en PBS. Finalmente, las células se pasaron a través de una malla de nylon para eliminar grumos celulares y se analizaron por citometría de flujo con el canal FL2 para detectar la fluorescencia del bromuro de etidio unido a DNA (FACSCalibur, Beckton Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, EEUU). Los datos se analizaron por medio del programa WinMDI versión 2.8.

9) TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS CON CICLOHEXIMIDA (CHX).

La solución *stock* de CHX se preparó a una concentración de 5 mg/ml (Sigma, EEUU) en agua ultrapura y esterilizada por filtración. En los experimentos donde se utilizó la CHX, se cultivaron las células en fase exponencial por 72 h en DMEM-10% SFB, tras lo cual se añadió la CHX a 5 µg/ml de concentración final por 30 min antes de estimular con EGF (25 ng/ml) (Roche, EEUU) por los tiempos indicados en la sección de resultados. Otro grupo de cultivos celulares se dejó como control solamente con la CHX y no fue estimulado por EGF. En ambos casos, la CHX permaneció durante todo el tiempo que se dejó actuar el EGF en las células estimuladas.

10) CÁLCULO DE LA VIDA MEDIA DE p27^{Kip1} DEL EXPERIMENTO CON CHX.

Para calcular la vida media de p27^{Kip1} se hicieron los cálculos en base a lo reportado por Belle y colaboradores (Belle *et al.*, 2006), brevemente:

- Se escanearon las bandas de p27^{Kip1} y se cuantificaron mediante el programa ImageJ (versión 1.33u, NIH-EEUU).
- Los valores de densidad óptica se normalizaron en base a un 100% de la banda a tiempo cero y posteriormente se obtuvo el logaritmo natural (**ln**) de cada uno de éstos. Se obtienen los **ln** de los datos normalizados, porque este fenómeno de degradación se considera como reacción de primer orden y se puede aplicar la siguiente ecuación matemática, que al obtener el **ln** en ambos lados de la igualdad, se puede reducir a una ecuación que describe una recta:

$$N = N_0 e^{-kt}$$

aplicando **ln**:

$$\ln N = \ln[N_0 e^{-kt}]$$

aplicando leyes de logaritmos:

$$\ln N = \ln N_0 + \ln e^{-kt}$$

desarrollando:

$$\ln N = \ln N_0 - kt(\ln e)$$

$$\ln N = \ln N_0 - kt \quad (1)$$

$$\ln N = \ln N_0 - kt$$

ecuación de una recta, $y = mx + b$

$$\ln N = -kt + \ln N_0$$

en donde:

$$y = \ln N \quad m = -k \quad x = t \quad b = \ln N_0$$

N = bandas normalizadas en base al tiempo cero.

t = tiempo post-estimulación con EGF.

k = constante de degradación

- Por lo que si se grafican:
ln(Intensidad de la bandas normalizadas) vs tiempo post-estimulación EGF.
Se obtendrá idealmente una recta, de la cual puede obtenerse por regresión lineal el valor de la pendiente y a su vez éste será el valor de **k**.
- Finalmente, el valor de la vida media ($t_{1/2}$) se calcula a partir de la fórmula:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k = 0.693 / k$$

11) TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS CON TIRFOSTINA AG1478.

La solución *stock* de la tirfostina AG1478 se preparó a 20 mM (Sigma, EEUU) en DMSO. En los experimentos donde se utilizó la tirfostina, se cultivaron las células en fase exponencial por 72 h en DMEM-10% SFB, tras lo cual se añadió este compuesto a 1 μ M de concentración final por 1 h antes de estimular con EGF (25 ng/ml) (Roche, EEUU), por los tiempos indicados en la sección de resultados. Otro grupo de cultivos celulares se dejó sin tirfostina pero se sometió también a EGF. En ambos casos, la tirfostina permaneció durante todo el tiempo que se dejó actuar el EGF. En estos experimentos se empleó también PDGF como control negativo.

12) TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS CON EL INHIBIDOR DE PI3K, LY294002.

La solución *stock* de LY294002 (Sigma, EEUU) se preparó a 10 mM en DMSO. En los experimentos donde se utilizó la LY294002, se cultivaron las células en fase exponencial por 72 h en DMEM-10% SFB, tras lo cual se añadió la LY294002 a 50 μ M de concentración final

por 1 h antes de estimular con EGF (25 ng/ml) (Roche, EEUU), por los tiempos indicados en la sección de resultados. Como controles, algunas células se incubaron con DMSO, que es el disolvente de la LY294002.

13) ANÁLISIS MEDIANTE WESTERN BLOT.

En todos los experimentos con *Western blot* primero se obtuvieron los lisados de células sometidas a las diferentes condiciones experimentales y luego se cuantificó en cada uno de ellos la concentración de proteínas. En general, las células cultivadas en cajas Petri de 60 mm de diámetro fueron lavadas 3 veces con PBS frío y lisadas con 200 μ l de buffer RIPA-PBS frío (2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1% NP40, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS y 1 mM EDTA) complementado con inhibidores de proteasas (Complete-Mini, Roche, EEUU), con 10 mM de ortovanadato de sodio como inhibidor de fosfatasa de fosfotirosinas y con 0.5 mM de DTT cuando fuera necesario. Después de 15 min en hielo, la monocapa celular se raspó, se pasó repetidas veces por la punta de una micropipeta para romper el DNA y el lisado se colectó para ser centrifugado y así remover todo el material insoluble. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y a partir de éste se determinó la concentración proteica por el método de BCA (Pierce, Rockford, IL, EEUU). Cuarenta microgramos de proteína total por muestra, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12.5% en condiciones desnaturalizantes con SDS al 1% y posteriormente las bandas proteicas separadas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa tipo PROTEAN (Schleicher & Schuell, N.H., EEUU) como se ha descrito previamente (Towbin *et al.*, 1979), pero utilizando un buffer de transferencia con la siguiente composición: 24 mM Tris, 193 mM glicina y etanol 4 M (23.2 % v/v). Los sitios que no contenían proteína en las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueados por 30 min en buffer PBS-T (PBS con 0.05% de Tween 20) conteniendo 10% de leche en polvo libre de grasa, y posteriormente incubados toda la noche a 4°C con los anticuerpos indicados, en PBS-T leche 5%. De la marca Santa Cruz se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales contra antifosfotirosinas (PY99), ciclina D1, ciclina D3 y pAkt-1, y policlonales contra actina, ciclina A, ciclina D2, Grb2, pRb, pAkt-Ser⁴⁷³P. En el caso de los anticuerpos contra p21^{Waf1}, p27^{Kipl} y EGF-r (R1) son monoclonales de hibridomas. Un segundo anticuerpo anti-EGF-r es un monoclonal de la marca Zymed. En lo que respecta a los anticuerpos PY99 anti-fosfotirosina y anti-pAkt1-Ser⁴⁷³P también de Santa Cruz, éstos tuvieron que diluirse en albúmina sérica bovina (BSA) (SIGMA) al 1% en PBS-T, para evitar el fondo al usar leche que contiene fosfoproteínas. Posteriormente las membranas fueron lavadas con

buffer PBS-T frío y los anticuerpos primarios que reconocieron a su antígeno en las membranas, fueron detectados mediante anticuerpos secundarios anti-IgGs de ratón, conejo o cabra -según corresponda- unidos a peroxidasa de rábano (DAKO) y visualizando dicho reconocimiento mediante el método de quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido) y exposición a placas sensibles al azul (KODAK X-OMAT). En las figuras donde se dan valores numéricos a las bandas obtenidas por *Western blot*, éstos se obtuvieron mediante análisis densitométrico utilizando el programa ImageJ (version 1.33u, NIH-EEUU). En todos los casos, la densidad de cada banda fue ajustada con la densidad de su correspondiente control de actina y las bandas de las células control en condiciones basales se les asignó arbitrariamente un valor de 100%.

VII. RESULTADOS.

1) ANÁLISIS DE LOS TRANSCRITOS DE *E5* DE HPV16 EN LAS CÉLULAS TRANSFECTADAS, MEDIANTE *NORTHERN BLOT* Y RT-PCR.

El plásmido pcDNA3-E5 fue transfectado en las líneas celulares NIH-3T3 y EGFR (células NIH-3T3 que sobre-expresan el receptor humano a EGF). Las células EGFR presentan una señalización amplificada después de la activación con su ligando específico. Después de 15 días, se colectaron el total de las colonias resistentes a 800 µg/ml de G418 y se denominaron 3T3E5 y EGNE5 respectivamente. Para comprobar la expresión de los transcritos de *E5*, se extrajo el RNA total de todas las líneas celulares transfectadas y se sometieron a un análisis por *Northern blot* (FIG. 17) y por RT-PCR utilizando un par de oligonucleótidos que amplifican específicamente la secuencia codificante de *E5* de 275 pb (FIG. 18).

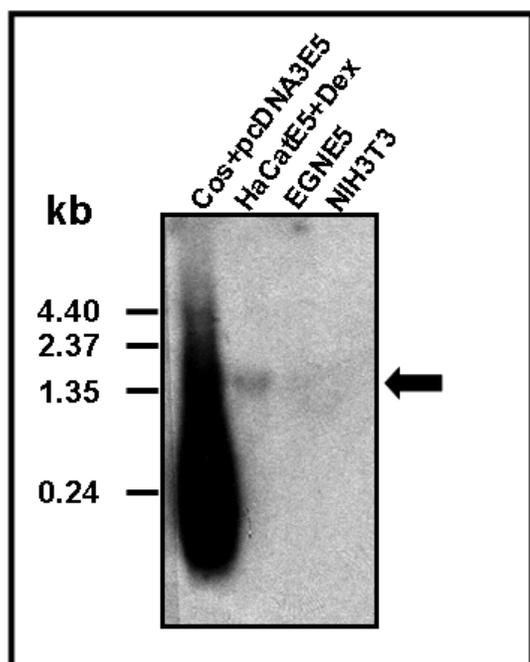


FIGURA 17. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL TRANSCRITO DE *E5* DE HPV16 EN CÉLULAS TRANSFECTADAS. Se cultivaron las líneas celulares indicadas y se extrajo el RNA total. Posteriormente se realizó un *Northern blot* con 30 µg de RNA y una sonda marcada radioactivamente para visualizar el transcrito de *E5* en las células transfectadas (EGNE5). Como controles positivos se utilizaron una transfección transitoria de células Cos con el plásmido pcDNA3-E5 (Cos+pcDNA3-E5) y el RNA de células HaCatE5 tratadas con dexametasona por 48 h (HaCatE5+Dex). Como control negativo se utilizó RNA de células NIH-3T3.

En el *Northern blot* encontramos que a excepción de las células NIH-3T3, en las células EGNE5 se observa un transcrito de igual tamaño que en el caso de las células HaCatE5, el cual está reportado ser el fragmento de 1.22 kb, que representa *E5* y que tomamos como nuestro control positivo del sistema. Por lo tanto, las células EGNE5 producen un transcrito de tamaño equivalente al fragmento reportado en células HaCatE5 induciendo E5 con dexametasona

(HaCatE5+Dex) (Oelze *et al.*, 1995), al igual que se observó en la transfección transitoria de células Cos con pcDNA3-E5.

En cuanto al RT-PCR, los resultados mostraron que sólo las células 3T3E5 y las EGNE5 presentaban la banda de aproximadamente 275 pb que corresponden al *ORF* de **E5** clonado en el plásmido pcDNA3. Colateralmente, se sometió a RT-PCR el RNA total de las células parentales transfectadas con el vector vacío (3T3neo y EGFRneo) como controles negativos del sistema, mientras que el plásmido pcDNA3-E5 se usó como control positivo en la PCR (FIG. 18). También caracterizamos la expresión de **E5** de HPV16 en el sistema inducible que emplea células HaCatE5 y produce el máximo de transcritos de **E5** después de una incubación por 48 h con dexametasona 2 μ M. Igualmente se encontró que sólo las células tratadas con dexametasona presentaron el fragmento de DNA de 275 pb correspondiente al transcrito de **E5** (FIG. 18, HaCaTE5+Dex).

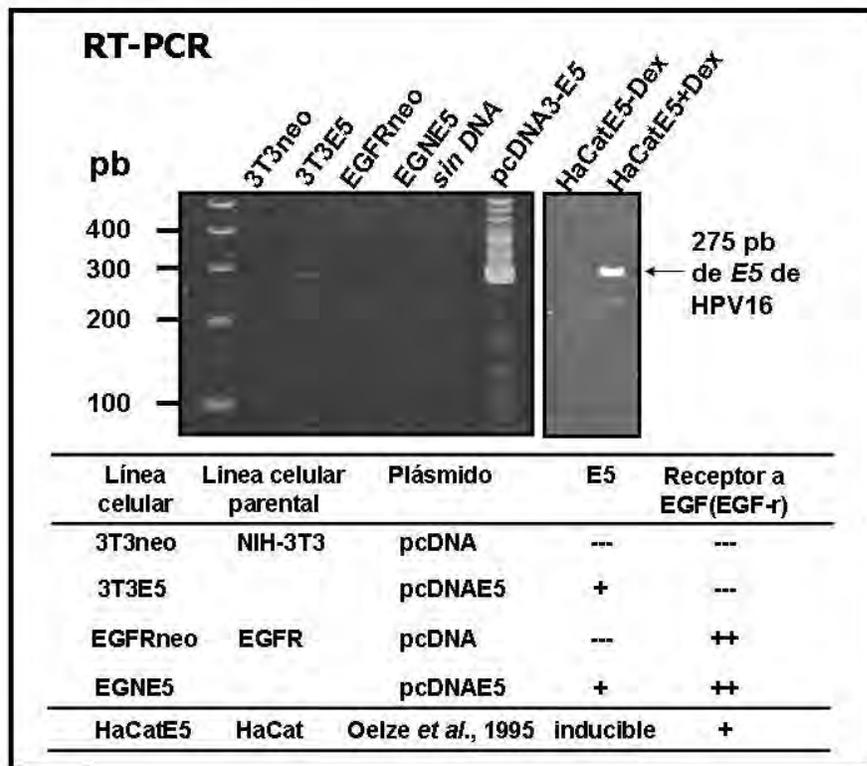


FIGURA 18. IDENTIFICACIÓN POR RT-PCR DE LOS TRANSCRITOS DE E5 DE HPV16 EN LAS CÉLULAS TRANSFECTADAS CON pcDNA3-E5. Para amplificar solamente el *ORF* correspondiente a *E5* de 275 pb, se realizaron reacciones de RT-PCR como se describe en Materiales y Métodos. Se utilizó el plásmido pcDNA3-E5 como control positivo de la PCR. Los marcadores de tamaño de DNA están dados en pares de bases (pb). En la tabla inferior se muestran las características de las diferentes líneas celulares transfectadas en este trabajo.

2) ACTIVIDAD TRANSFORMANTE DEL ONCOGÉN E5 DE HPV16.

Después de examinar la expresión de los transcritos de **E5** en las líneas celulares, decidimos determinar la capacidad transformante de **E5** a través de ensayos de crecimiento independiente de adhesión en agar suave (ensayo ampliamente utilizado para determinar la actividad transformante de oncogenes) y curvas de proliferación celular.

Se determinó la capacidad transformante de E5 asociada a la actividad del receptor a EGF como se ha reportado (Genther Williams *et al.*, 2005; Pim *et al.*, 1992). En la Tabla 1 se observa que las células EGNE5 que expresan a E5 y sobre-expresan al receptor a EGF tuvieron una capacidad de transformación reducida en ausencia de EGF, mostrado por el bajo número de colonias formadas (razón 11 vs. 88 en las células EGFRneo), efecto observado de manera consistente en experimentos independientes (datos no mostrados). Sin embargo, cuando el EGF se añadió al sistema, la capacidad transformante de **E5** en las células EGNE5 se reestableció, superando incluso al de las células EGFRneo (razón 128 vs. 54, respectivamente). Por otro lado, las células 3T3E5 fueron incapaces de formar colonias en agar, tanto en presencia como en ausencia de EGF, coincidiendo con reportes previos (Pim *et al.*, 1992). Las células 3T3neo fueron usadas como control negativo en el ensayo de transformación (en condiciones de \pm EGF formaron 5.5 y 1.5 colonias, respectivamente).

Tabla 1. Caracterización de la actividad transformante del oncogén E5 de HPV16 en las diferentes líneas celulares

Líneas celulares ^a	DNA transfectado	No. colonias en agar suave ^b			
		-EGF (razón) ^c		+EGF (razón) ^c	
3T3neo	pcDNA3	1.5	(1.0)	5.5	(1.0)
3T3E5	pcDNA-E5	0.0	(0.0)	1.0	(0.2)
EGFRneo	pcDNA3	132	(88.0)	296	(53.8)
EGNE5	pcDNA-E5	16	(11)	702	(127.6)

^a Las células fueron sembradas a 1×10^4 y crecidas en agar suave por 15 días en ausencia y presencia de 10 ng/ml EGF. Resultados similares fueron obtenidos de dos experimentos independientes.

^b Los números anotados son el promedio de determinaciones por duplicado.

^c Razón, es el número de colonias en agar suave en relación con las células control 3T3neo.

Los resultados mostraron además que la simple sobre-expresión de un proto-oncogén como lo es el receptor a EGF en las células (EGFRneo) incrementa la formación de colonias en agar suave, sea en ausencia o presencia de EGF, comparado con las células control 3T3neo (radios 88 y 54 respectivamente).

Por otro lado, en la Tabla 2, el análisis de las curvas de crecimiento mostró que no hubo diferencias en los tiempos de duplicación de las células EGFRneo en ausencia o presencia de EGF (19 vs. 19.6 h, respectivamente). Sin embargo, las células EGNE5 (expresan E5 y el EGF-r) mostraron un tiempo de duplicación más largo (21.3 h en ausencia de EGF) en comparación con el resto de las líneas celulares. Notoriamente, el tiempo de duplicación disminuyó a 18.5 h cuando el EGF se añadió a las células, diferencia que fue estadísticamente significativa al comparar con las células EGFRneo ($p < 0.05$). Este resultado sugiere que la expresión de E5 en las células EGNE5 puede estar modificando la duración del ciclo celular. Bajo las mismas condiciones, la densidad de saturación fue 40% más alto en las células EGNE5 en relación con las células EGFRneo, en presencia de EGF (2.96×10^6 vs. 2.11×10^6 , respectivamente) diferencia que fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$), aún cuando las densidades celulares fueron similares en ausencia de EGF (1.28×10^6 vs. 0.98×10^6 , respectivamente). En el caso de las células 3T3E5, el tiempo de duplicación y la densidad de saturación fueron similares a los de las células 3T3neo.

Tabla 2. Cinética de crecimiento de las líneas celulares

Líneas celulares	DNA transfectado	Tiempo de duplicación (h) ^a		Densidad de saturación (10^6) ^b	
		- EGF	+EGF	- EGF	+ EGF
3T3neo	pCDNA3	17.2	17.3	1.71± 0.04	2.43± 0.35
3T3E5	pCDNA-E5	17.1	17.3	2.03± 0.04	2.56± 0.10
EGFRneo	pCDNA3	19.0	19.6	0.98± 0.03	2.11± 0.12
EGNE5	pCDNA-E5	21.3	18.5	1.28± 0.04	2.96± 0.11
HaCatE5-dex	(c)	20.3	18.0	2.68± 0.09	4.48± 0.42
HaCatE5+dex	(c)	19.2	18.2	3.39± 0.03	4.59± 0.36

^a Los valores dados son del promedio de determinaciones por duplicado.

^b Los números de células están dados por 1×10^6 . Se reportan el promedio de experimentos por duplicado y sus rangos.

^c Oelze et al., 1995.

El comportamiento diferente entre las células que expresan E5 (3T3E5 y EGNE5) podría ser debido a una diferencia en los niveles de expresión de la proteína E5 en dichas líneas celulares.

3) LA DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS EN LAS FASES DEL CICLO CELULAR ES ALTERADA POR LA PRESENCIA DE E5 DE HPV16 Y EGF.

Después de demostrar que las células que expresan E5 tienen una tasa de proliferación modificada y una mayor actividad transformante en el ensayo independiente de adhesión, buscamos si existían alteraciones en las fases del ciclo celular mediante análisis por FACS (FIG. 19). Las células se crecieron y fueron estimuladas al final del experimento con EGF por 16 h antes del análisis por FACS, mientras que un número semejante de células no se estimularon con el factor. Encontramos que las células que expresan E5 (3T3E5 y EGNE5) y estimuladas con EGF mostraron un incremento importante del 37% en fase S (de 15.5 a 21.2%) y de 44% (de 17.7 a 25.5%) respectivamente, al compararlas con las células no estimuladas. Es notable que en las células parentales (3T3neo y EGFRneo), el incremento de células en la fase S en presencia de EGF fue alrededor del 17%, comparadas con las células no estimuladas.

Por otro lado, si se comparan las células EGFRneo contra las EGNE5 en ausencia de EGF, se observa un incremento de 46% en la población en fase S (de 12.1 a 17.7, respectivamente). Lo anterior hace pensar que E5 tiene también cierto efecto en las células aún en ausencia de EGF, aunque el sistema tiene al receptor de EGF sobre-expresado.

Estos resultados sugieren que la expresión de E5 incrementa a la población de células en fase S, en forma independiente de los receptores a EGF, puesto que la línea celular EGFRneo que sobre-expresa al receptor fue incapaz de incrementar su fase S en la misma proporción que lo hicieron las líneas celulares que expresan E5.

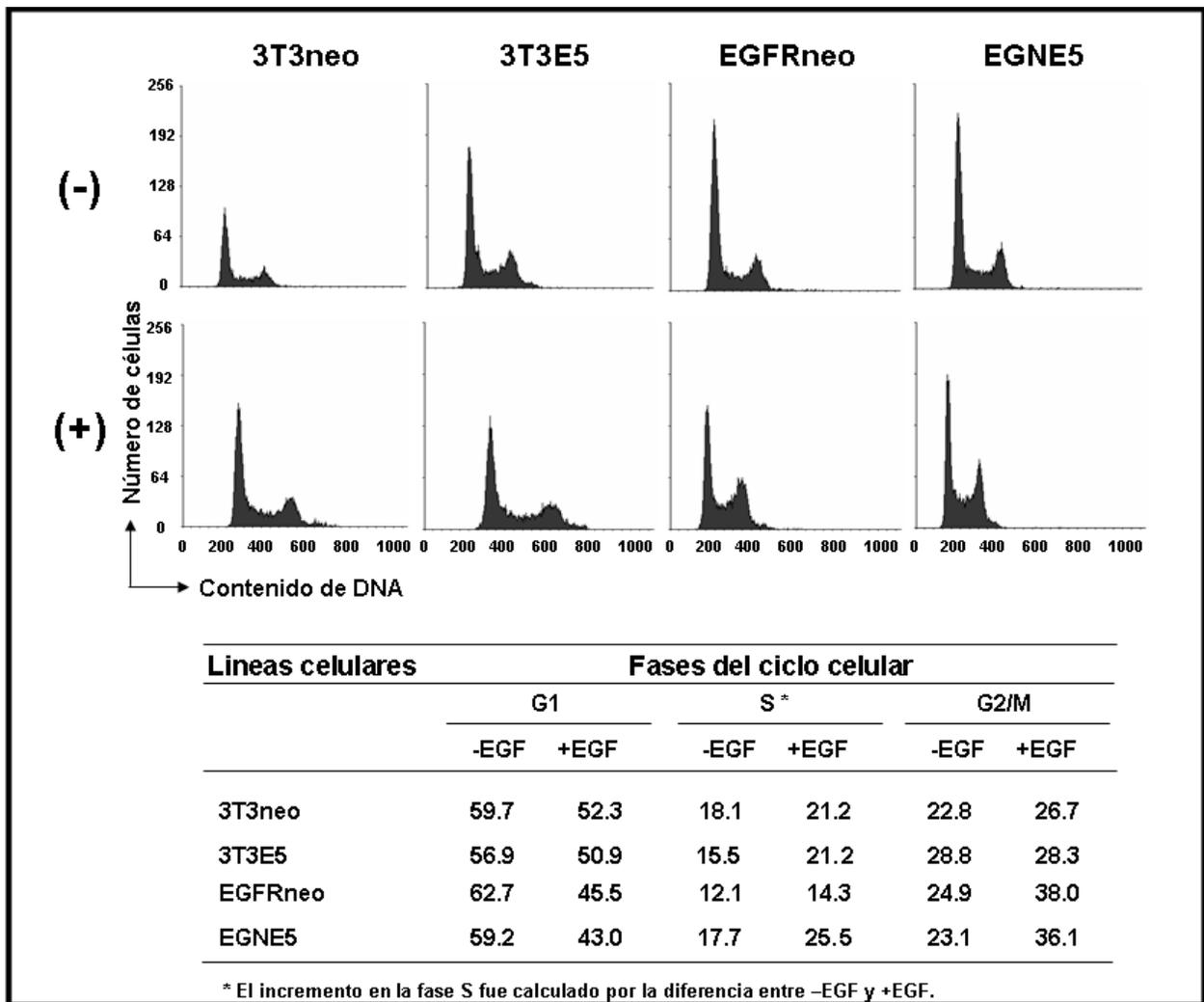


FIGURA 19. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR DE LAS CÉLULAS QUE EXPRESAN E5 DE HPV16. Las células se cultivaron en presencia de 50 ng/ml de EGF por 16 h, se colectaron, se fijaron con etanol al 70% y se tiñeron con 10 µg/ml de yoduro de propidio (PI). La distribución de las células en el ciclo celular se determinó mediante análisis por FACS. Para cada línea celular se muestran los histogramas correspondientes a los ciclos celulares con EGF a tiempo cero (-) y a 16 h (+). La tabla muestra la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular de acuerdo al análisis de datos mediante el programa WinMDI 2.8.

4) E5 DE HPV16 ES CAPAZ DE MODIFICAR LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA p27^{KIP1} EN LAS CÉLULAS ESTIMULADAS CON EGF.

Como se esperaba, demostramos que E5 no solo mantuvo su actividad transformante, sino también que E5 de HPV16 fue capaz de alterar la proliferación celular y la distribución celular en las diferentes fases del ciclo celular. Una posible explicación sería que la proteína E5 pudiera regular positiva o negativamente los niveles o la actividad de una o más proteínas del ciclo celular como las ciclinas, las CDKs, o sus inhibidores. Para abordar esta posibilidad, analizamos por *Western blot* el patrón de las proteínas del ciclo celular en las células que expresan E5 y en las líneas celulares control en presencia de EGF a distintos tiempos. En la

FIG. 20 se muestran los *Western blots* de las proteínas del ciclo celular de células que expresan o no a E5, tratadas con EGF por diferentes periodos y visualizadas mediante quimioluminiscencia. Los resultados mostraron que las células 3T3E5 y las EGNE5, pero no las células control (3T3neo y EGFRneo) tuvieron una reducción sustancial en los niveles de la

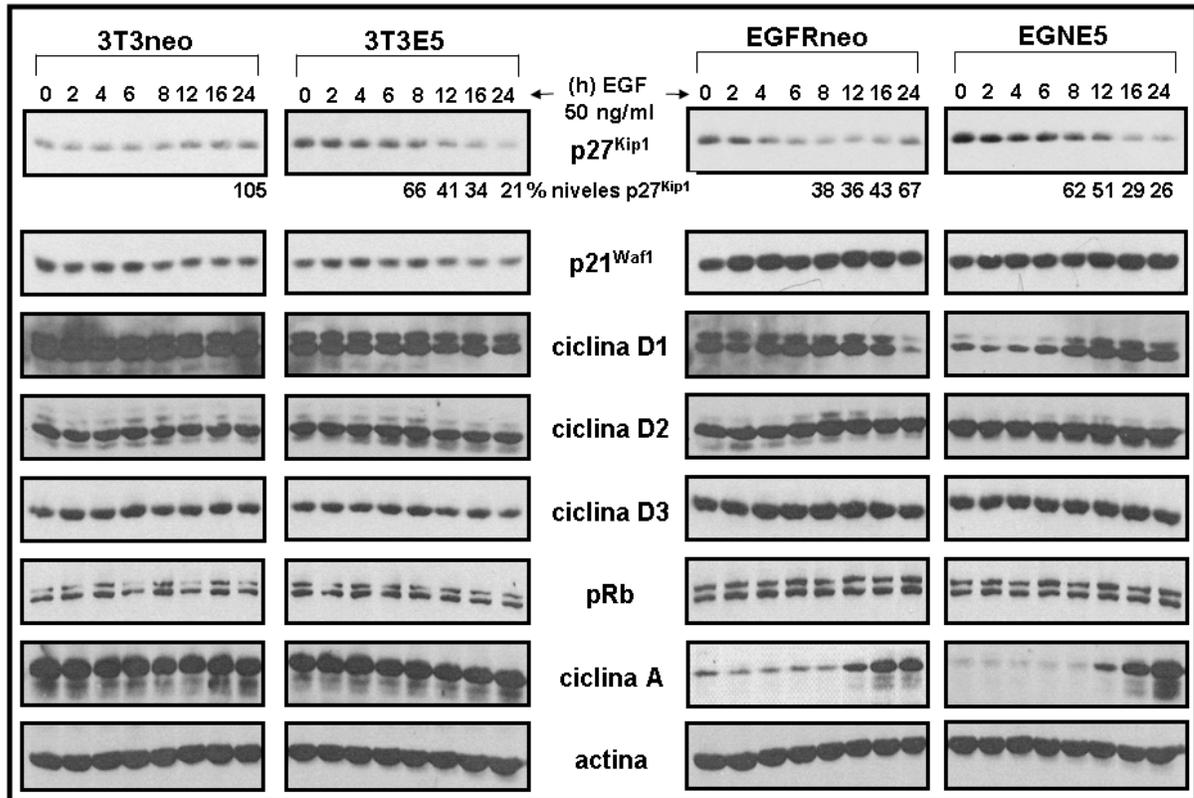


FIGURA 20. EFECTO DE LA PROTEÍNA E5 DE HPV16 EN LAS PROTEÍNAS DE CICLO CELULAR. Las células transfectadas fueron estimuladas con 50 ng/ml de EGF a diferentes tiempos. Cuarenta microgramos de proteína total de cada línea celular fueron separados por SDS-PAGE, seguido de análisis inmunoblot con anticuerpos contra las diferentes proteínas de ciclo celular, y revelados por quimioluminiscencia. Se probaron los inmunoblots de 3T3neo y EGFRneo (células control), y 3T3-E5 y EGNE5 (células que expresan E5) con los diferentes anticuerpos contra las proteínas de ciclo celular. Se utilizó el anticuerpo anti-actina como control de carga del sistema.

proteína p27^{Kip1} después de 16 h post-estimulación con EGF (<35% en las células que expresan E5 en comparación con las células control) y permanecieron bajas aún a las 24 h post-estimulación con EGF (<27% en células que expresan E5 contra un 67% en células EGFRneo y del 105% en células 3T3neo) (FIG. 20). En lo que corresponde a las demás proteínas del ciclo celular analizadas como ciclinas D2, D3 y A, pRb y p21^{Waf1} se observaron los mismos niveles de las proteínas tanto en células que expresan E5, como en las que no. Cuando buscamos las mismas proteínas en las células que expresan E5 y sobre-expresan el receptor a EGF

(EGNE5), observamos que la proteína p27^{Kip1}, mas no la ciclina D1 fue regulada negativamente a las 16 h después de la estimulación con EGF y se mantuvo baja aún después de 24 h. Sin embargo, este efecto no fue observado en las células parentales EGFR (solamente sobre-expresan el receptor a EGF). Estos resultados mostraron que los niveles de la proteína p27^{Kip1} disminuyeron en las células que expresan E5 y el efecto se reforzó cuando el receptor estaba sobre-expresado y estimulado. Por lo tanto, decidimos estudiar la regulación de p27^{Kip1}, debido a que esta proteína tiene un amplio espectro de acción, por ejemplo, es capaz de regular la actividad de los complejos ciclina-CDKs alterando el ciclo celular, y provocando cambios en la proliferación celular o en la transformación celular como se demostró con anterioridad (Tablas 1 y 2).

Estos resultados demuestran que los niveles de la proteína p27^{Kip1} disminuyen en las células que expresan E5 y permanecen bajos por más tiempo cuando el receptor está activado, por lo que posiblemente E5 favorezca una proliferación celular prolongada al mantener bajos los niveles de la proteína p27^{Kip1} en cooperación con EGF-r.

Debido a que la sobre-expresión del receptor a EGF amplifica la señal y a que se observaron claras diferencias entre las líneas celulares de EGFRneo y EGNE5, se llevaron a cabo experimentos subsecuentes con sólo estas dos líneas celulares.

5) E5 REGULA NEGATIVAMENTE LOS NIVELES DE p27^{Kip1} EN QUERATINOCITOS.

Para corroborar el efecto de E5 sobre p27^{Kip1} observado en los fibroblastos de ratón, decidimos utilizar el sistema inducible para la expresión de E5 en células de origen humano HaCatE5 sometidas a dexametasona (inductor) y EGF. En la FIG. 21 se aprecia la reducción de p27^{Kip1} solamente en presencia de E5, a las 16 h post-estimulación con EGF, como previamente se observó en los fibroblastos de ratón. Sin embargo, a pesar de que los queratinocitos son las células idóneas para el estudio de HPV, no pudimos seguir utilizando este sistema inducible debido a que hay varios reportes en donde se ha demostrado que la dexametasona puede actuar no sólo sobre el promotor inducible de MMTV, sino también sobre otros blancos entre los que se encuentra el propio EGF-r, además de alterar diversas funciones celulares, como la de inhibir el crecimiento celular. Debido a esto y a que en nuestros experimentos demostramos que el efecto de E5 sobre los niveles de p27^{Kip1} fue el mismo tanto en fibroblastos de ratón como en los queratinocitos, fue que decidimos utilizar sólo el sistema de fibroblastos de ratón para los subsecuentes experimentos.

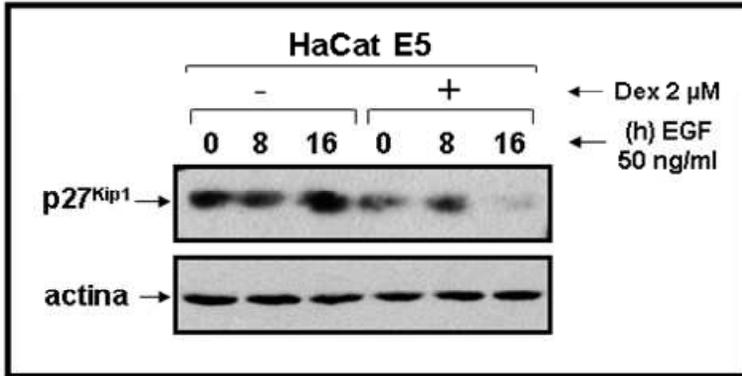


FIGURA 21. EFECTO DE E5 SOBRE p27^{Kip1} EN QUERATINOCITOS HUMANOS. Se cultivaron células HaCatE5 en ausencia (-) o presencia (+) de dexametasona 2 μM (Dex 2 μM) para inducir la expresión de E5, y se estimularon por distintos tiempos con 50 ng/ml de EGF. Se realizó el seguimiento de la proteína p27^{Kip1} por *Western blot* y quimioluminiscencia con un anticuerpo anti-p27^{Kip1}. Se utilizó el anticuerpo anti-actina como control de carga del sistema.

6) E5 DE HPV16 MANTIENE BAJOS LOS NIVELES DE p27^{Kip1} EN ALTA CONFLUENCIA CELULAR Y EN PRESENCIA DE EGF.

Uno de los principales problemas en nuestros experimentos para el seguimiento de los niveles de p27^{Kip1} fue que los resultados no eran consistentes de experimento a experimento, de manera que tuvimos que identificar el problema de estas variaciones. Al revisar la literatura nos dimos cuenta que la expresión de p27^{Kip1} se incrementa al aumentar la confluencia celular, por lo que las variaciones en el sistema posiblemente se debían a este factor. El incremento en los niveles de p27^{Kip1} en estas condiciones conduce al arresto celular y se requieren factores de crecimiento o la dispersión celular para lograr bajar dichos niveles para así promover el reingreso al ciclo celular

Para homogenizar y hacer reproducible el sistema se llevaron a cabo experimentos en los cuales se ajustó la concentración inicial de células y se estimularon con EGF por 16 h, después de lo cual las células se lisaron y las muestras se analizaron por *Western blot*.

Como se puede observar en la FIG. 22, en las células 3T3 y EGFRneo los niveles de p27^{Kip1} aumentaron notoriamente conforme aumentaba la confluencia de la monocapa celular, tanto en ausencia como presencia de EGF. Sin embargo, en las células que expresan E5 este patrón no se repitió. Las células 3T3 mostraban los niveles más altos de p27^{Kip1} en ausencia de EGF, principalmente a alta confluencia, en comparación con las células EGFRneo y EGNE5, indicando que la sola sobre-expresión del receptor favorece la degradación de p27^{Kip1}. Al comparar los niveles de p27^{Kip1} entre las células EGFR y EGNE5, éstos fueron muy semejantes en las diferentes confluencias celulares, en ausencia de EGF. Sin embargo, al comparar estas mismas líneas celulares en presencia de EGF se observó que los niveles de p27^{Kip1} permanecieron bajos a lo largo de las diferentes confluencias, incluso a la más alta, sólo en

las células que expresan E5, lo cual no sucedió con EGFRneo, que sí mostró un mayor nivel de p27^{Kip1} sobre todo en la confluencia más alta.

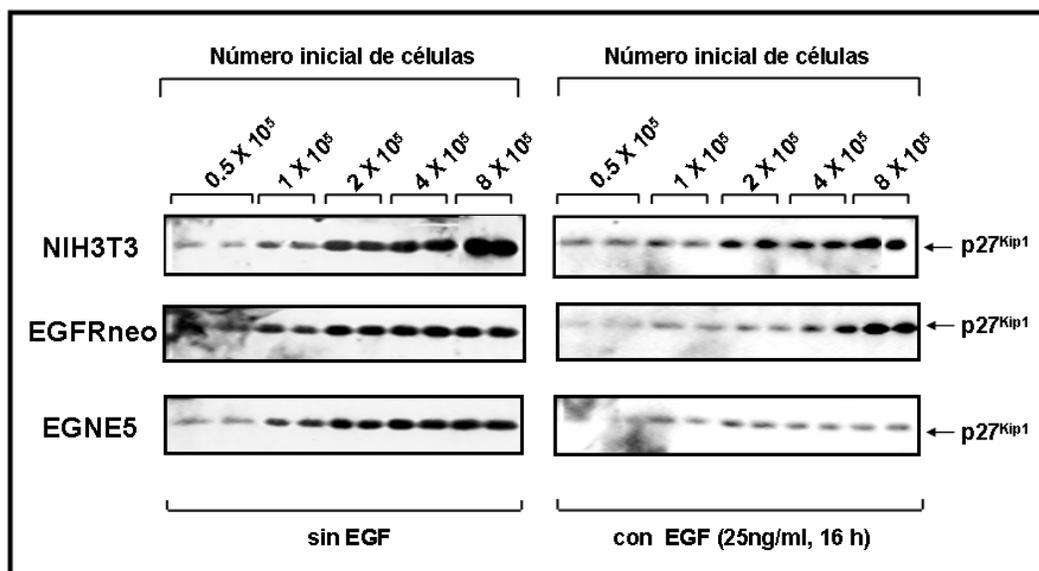


FIGURA 22. EFECTO DE LA PROTEÍNA E5 DE HPV16 SOBRE p27^{KIP1} A DIFERENTES CONFLUENCIAS. Se sembraron cantidades crecientes de células NIH-3T3, EGFRneo y EGNE5 y la mitad fue estimulada con EGF a 25 ng/ml por 16 h. Se realizó el seguimiento de la proteína p27^{Kip1} por *Western blot* y quimioluminiscencia con el anticuerpo anti-p27^{Kip1}.

Debido a que los niveles de la proteína p27^{Kip1} pueden ser regulados en parte por la densidad celular a través de otro camino independiente de factores mitogénicos, en el caso de los experimentos donde se determinaron los niveles de dicha proteína, las concentraciones celulares se ajustaron para evitar que la densidad celular afectara los resultados al utilizar un factor de crecimiento como EGF (Roche). Por lo tanto, se hizo el ajuste en todos los experimentos a 5×10^3 células/cm² para 3T3neo y 3T3E5, y a 3.5×10^4 células/cm² para EGFRneo y EGNE5 (aproximadamente 90% de confluencia). Bajo estas condiciones aseguramos que los resultados siempre fueran reproducibles.

Además, en los siguientes experimentos que involucran la actividad del EGF-r, tuvimos que dejar de usar las células 3T3neo y 3T3E5 debido a que en éstas no fue posible detectar la actividad de dicho receptor.

Estos resultados nos indicaron que E5 fue capaz de regular negativamente los niveles de p27^{Kip1} en cooperación con EGF/EGF-r en alta densidad celular donde este oncogén evita la acumulación de p27^{Kip1}. Es posible que E5 permita a las células en un cultivo de alta densidad

mantener su respuesta a factores de crecimiento para así mantener bajos los niveles de p27^{Kip1}, favoreciendo la proliferación en condiciones de arresto celular.

7) LA ONCOPROTEÍNA E5 DE HPV-16 MODULA NEGATIVAMENTE LOS NIVELES DE p27^{Kip1} A TRAVÉS DE LA REDUCCIÓN DE SU VIDA MEDIA.

Para caracterizar con mayor detalle el mecanismo por el cual E5 regula negativamente a p27^{Kip1}, se trataron las células con cicloheximida (CHX) para detener la síntesis de proteínas previo a la estimulación con el EGF a diferentes tiempos (descrito en Materiales y Métodos), para examinar la degradación de p27^{Kip1} y calcular su vida media. El análisis de *Western blot* mostró que los niveles de p27^{Kip1} en las células que expresan E5 fueron más bajos en comparación con las células EGFRneo. Sin embargo, la degradación de p27^{Kip1} se incrementó en las células que expresan E5 después de la estimulación con EGF. Este efecto fue evidente a las 6 h y los niveles de la proteína casi desaparecieron hacia las 8 h (FIG. 23A, EGNE5). Mediante análisis densitométrico, calculamos la cantidad de p27^{Kip1} presente en las bandas utilizando el programa ImageJ (versión 1.33u, NIH-EEUU). Los datos obtenidos se graficaron (FIG. 23B) y la vida media de la proteína p27^{Kip1} se calculó de acuerdo a Belle y colaboradores (2006).

Con los datos obtenidos, fue claro que la vida media de la proteína p27^{Kip1} disminuyó ligeramente en las células que expresan E5, en ausencia de EGF cuando se compara con las células EGFRneo controles (de 18.4 a 12.7 h). Al mismo tiempo, en presencia de EGF, la vida media de p27^{Kip1} se redujo cuatro veces al compararla con las células control (de 12.8 a 3.6 h)(FIG. 23C). En su conjunto, estos resultados sugieren que E5 coopera con el receptor a EGF para promover la proliferación celular al mantener bajos niveles de la proteína p27^{Kip1} mediante reducción de su estabilidad.

Sin embargo, también es de destacar que al comparar a las células EGFRneo y EGNE5 en ausencia de EGF, también ocurre una reducción en la vida media de p27^{Kip1} (de 18.4 a 12.7 h), aludiendo que E5 está provocando un efecto en la reducción de los niveles de p27^{Kip1} sin la adición de EGF exógeno, aunque no se descarta la presencia residual de EGF del SFB proveniente del medio de cultivo.

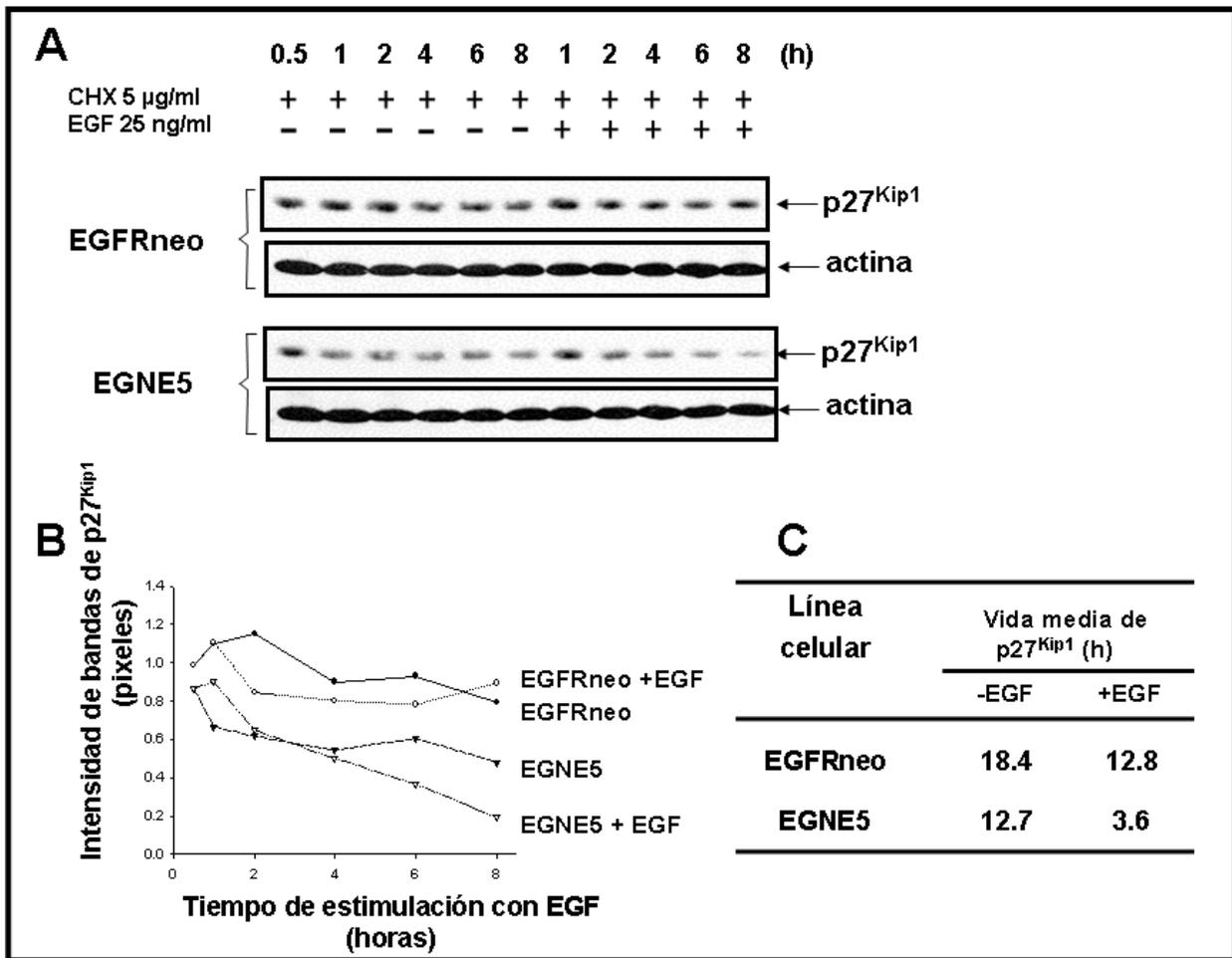


FIGURA 23. E5 DE HPV16 ALTERA LA VIDA MEDIA DE p27^{Kip1}. Las células EGFRneo y EGNE5 fueron pretratadas con 5 µg/ml de cicloheximida (CHX) por 30 min y enseguida estimuladas, una serie con 25 ng/ml de EGF por distintos tiempos y otra sin estímulo. El análisis de *Western blot* se hizo con 40 µg de proteína total, revelando con un anticuerpo monoclonal anti-p27^{Kip1} y quimioluminiscencia. (A) *Blots* de las diferentes líneas celulares mostrando a la proteína p27^{Kip1} después de los diferentes tiempos de estimulación con EGF. (B) Las bandas del panel (A) fueron escaneadas y las cantidades relativas de proteína de p27^{Kip1} se graficaron contra el tiempo de estimulación con EGF. (C) La vida media de la proteína p27^{Kip1} se determinó a a partir de los datos de (B), y de acuerdo con Belle y colaboradores (2006).

8) LA REGULACIÓN NEGATIVA DE LOS NIVELES DE p27^{Kip1} POR E5 DE HPV16 NO ESTÁ DADA A NIVEL TRANSCRIPCIONAL.

Una vez que identificamos que E5 aceleraba el proceso de degradación de p27^{Kip1}, lo siguiente que quisimos saber fue a qué nivel se estaba dando esta regulación. Se ha reportado que los niveles de la proteína p27^{Kip1} se regulan principalmente a un nivel post-traduccional, por medio de fosforilación por el complejo ciclina E/CDK2 o por otras cinasas como Akt1, y su posterior degradación por al menos dos sistemas de ubiquitinación. Debido a que en nuestros ensayos p27^{Kip1} mostraba variaciones a nivel de proteína, quisimos saber si en el caso de las

células que expresan E5 esta regulación se daba como consecuencia de una variación a nivel transcripcional. Por lo tanto, analizamos el estatus del mRNA de $p27^{Kip1}$ en células EGFRneo y EGNE5 no estimuladas (0h) o estimuladas a 0.5 y 16 h con 50 ng/ml de EGF. Luego, el RNA total se extrajo de las células mediante el método del isotiocianato/fenol-cloroformo y se empleó para analizar los niveles de expresión de los transcritos de $p27^{Kip1}$ mediante Northern blot como se describe en Materiales y Métodos. En la FIG. 24 se observa que tanto las células EGFRneo como las EGNE5 muestran una misma banda específica y de la misma intensidad para el transcrito de $p27^{Kip1}$ (de alrededor de 2.37 kb). No se observaron variaciones en los transcritos de $p27^{Kip1}$ a 0, 0.5 y 16 h post-estimulación con EGF (FIG. 24A). En contraste, los niveles de $p27^{Kip1}$ se redujeron a las 16 h post-estimulación con EGF en ambas líneas celulares (FIG. 24 B). De acuerdo a estos resultados de este experimento, proponemos que E5 no tiene ningún efecto en la regulación de $p27^{Kip1}$ a nivel transcripcional, sino más bien a nivel post-traducciona.

Nuestros resultados mostraron consistencia con lo que ya ha sido reportado respecto a que los niveles de $p27^{Kip1}$ son regulados principalmente a nivel post-traducciona por proteólisis mediada por ubiquitinación (Swanson *et al.*, 2000; Ungermannova *et al.*, 2005).

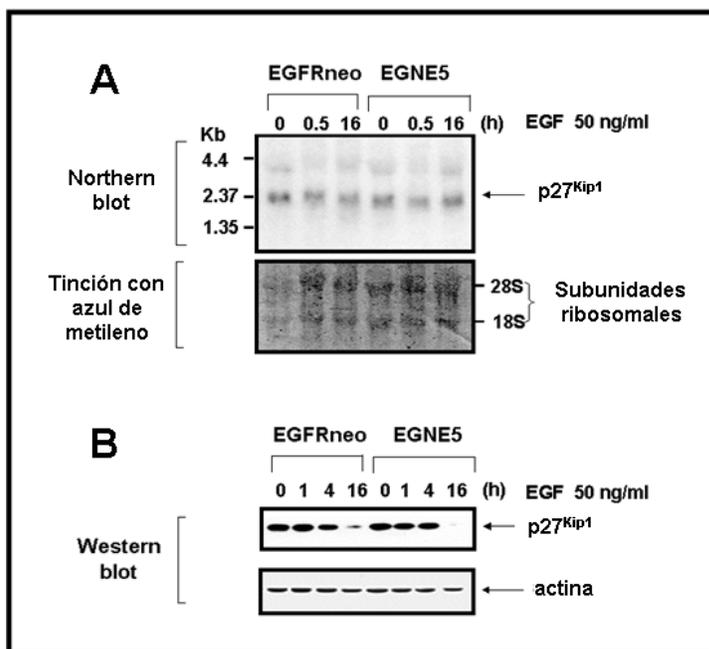


FIGURA 24. E5 REGULA LOS NIVELES DE $p27^{Kip1}$ A NIVEL POST-TRADUCCIONAL Y NO A NIVEL POST-TRANSCRIPCIONAL. (A) Células EGFRneo y EGNE5 fueron estimuladas a diferentes tiempos con EGF, la mitad de las células fueron tratadas para extracción de RNA para analizar los transcritos de $p27^{Kip1}$ por Northern blot empleando una sonda específica. Como control de carga, se tiñó el filtro con azul de metileno para visualizar los RNA ribosomales; (B) La otra mitad de las células fueron lisadas y analizadas por Western blot para la presencia de $p27^{Kip1}$. Se determinó la actina como control de carga en los geles.

9) LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA EGF-r SON REGULADOS NEGATIVAMENTE EN CÉLULAS QUE EXPRESAN E5, PERO LA ACTIVIDAD DE DICHO RECEPTOR Y LOS NIVELES BAJOS DE p27^{Kip1} SE MANTIENEN POR MUCHO MÁS TIEMPO.

Existen numerosos reportes en los que se demuestra que las células que expresan E5 tienen una actividad prolongada del receptor a EGF, debido principalmente al reciclamiento de dichos receptores (Martin *et al.*, 1989; Rodriguez *et al.*, 2000; Straight *et al.*, 1993; Straight *et al.*, 1995). Por lo anterior, investigamos los niveles y la actividad del receptor a EGF (por fosforilación en tirosinas) mediante *Western blot* y estos datos se correlacionaron con la regulación negativa de p27^{Kip1} en base a la vía de señalización mediada por E5 de HPV16. Con nuestros experimentos demostramos que la actividad del receptor a EGF (observada como fosforilación en tirosinas) fue similar tanto en las células que expresan E5 como en las células EGFRneo a tiempo 0 h, aunque la actividad de dicho receptor se mantuvo más alta por un

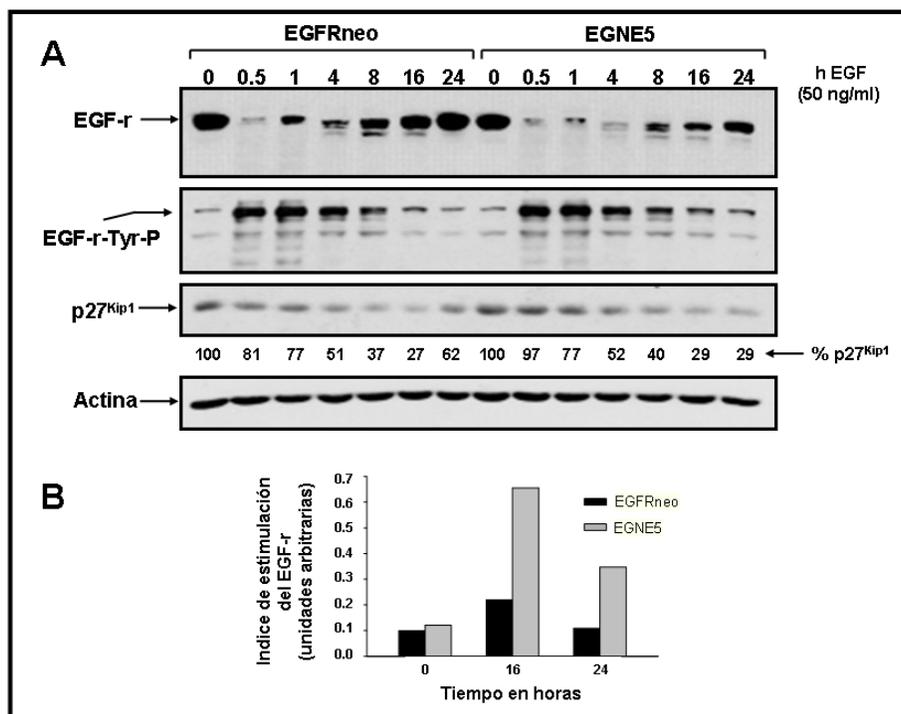


FIGURA 25. NIVELES DE LA PROTEÍNA DEL RECEPTOR A EGF Y SU ESTADO DE FOSFORILACIÓN EN CÉLULAS QUE EXPRESAN E5. (A) Las células fueron estimuladas con EGF por diferentes tiempos, lisadas y sus proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en gel al 12.5% y por *Western blot* con anticuerpos anti-EGF-r, anti-fosfotirosinas (PY99), anti-p27^{Kip1} y anti-actina. Los blots se revelaron mediante quimioluminiscencia. Se utilizó a la actina como control de carga del sistema. (B) Las bandas del receptor a EGF y las correspondientes fosforiladas de los blots, fueron escaneadas y la intensidad relativa de las mismas se calculó con el programa ImageJ. Se calculó el índice de estimulación dividiendo la intensidad de las bandas fosforiladas entre las correspondientes de proteína EGF-r total, y los valores obtenidos se graficaron contra tiempo post-estimulación con EGF.

período más prolongado (hasta las 24 h) en las células EGNE5 en comparación con las control EGFRneo (FIG. 25, EGF-r-Tyr-P). Sin embargo, los niveles más bajos de la proteína del receptor a EGF se detectaron en las células EGNE5 en comparación con las EGFRneo a las 24 h post-estimulación del receptor (FIG. 25, EGF-r). Al mismo tiempo, la prolongada actividad del receptor correlacionó con una mayor degradación de la proteína p27^{Kip1} en las células que expresan E5 (FIG. 25, p27^{Kip1}). El análisis comparativo de las bandas del receptor a EGF fosforilado en tirosinas, mostró que la actividad basal del receptor a EGF fue similar en ambas líneas celulares a tiempo cero, sin embargo, después de 16 h post-estimulación con EGF la actividad del receptor fue 3.5 veces mayor en las células que expresan E5 en comparación con las EGFRneo y permaneció alta (3 veces) en las células EGNE5 aún después de 24 h post-estimulación con EGF (FIG. 25B).

Tomados todos estos resultados en conjunto, nos indican que las células que expresan E5 mantienen una mayor actividad del receptor (medido por fosforilación en tirosinas), en comparación con las células EGFRneo, a pesar de que éstas poseen el doble de la proteína (FIG. 25).

10) E5 MODIFICA LOS NIVELES DEL EGF-r Y MANTIENE ALTA LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR A LARGO PLAZO.

Un punto importante fue corroborar que realmente el receptor de EGF era la banda fosforilada que se observaba con el anticuerpo anti-fosfotirosina, después de haber estimulado a las células con EGF. Para esto se realizó un experimento de Inmunoprecipitación-*Western blot*, en el cual se utilizaron dos anticuerpos diferentes anti-EGF-r, uno para inmunoprecipitarlo (R1) y otro para detectarlo por *Western blot* (Zymed), utilizando lisados de células sometidas a 0, 0.5 y 16 h post-estimulación con EGF. En la FIG. 26 se aprecia en los paneles (B) que el anticuerpo antifosfotirosina (anti-Tyr-P) reconoció la banda fosforilada del receptor en el inmunoprecipitado con anti-EGF-r, lo que no se observó en el control con IgG de ratón (FIG. 26A). Una vez que se reveló con el anticuerpo anti-fosfotirosina, la membrana se lavó para despegar ese anticuerpo y se re-incubó con un anticuerpo anti-EGF-r diferente al usado para inmunoprecipitar, como aparece en los paneles de la FIG. 26C, donde se puede apreciar a la proteína total del receptor que fue inmunoprecipitada en primera instancia pero reconocida con el otro anticuerpo anti-EGF-r.

De la misma manera al evaluar la relación actividad/receptor nuevamente se observó que este índice es 3 veces mayor en las células EGNE5 a las 16 h post-estimulación con EGF

comparado con las células EGFRneo. Esto confirma el hecho de que E5 mantiene bajos los niveles del receptor, pero permanece activado por más tiempo.

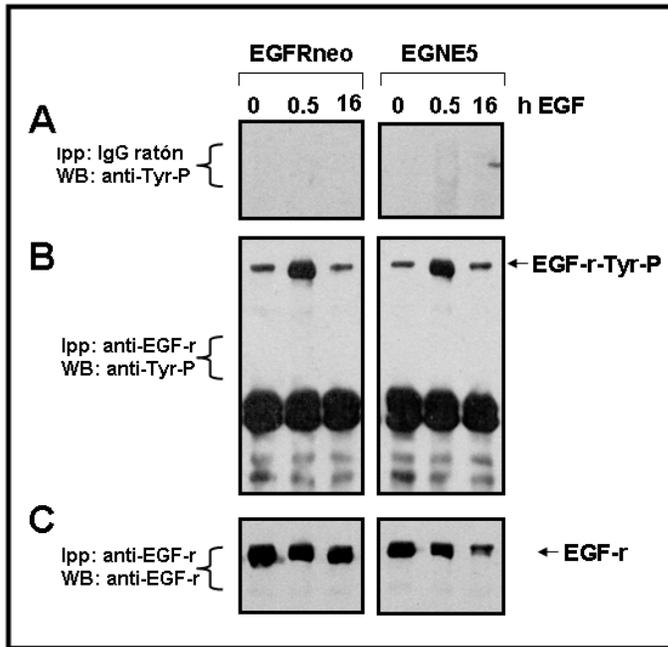


FIGURA 26. E5 MODIFICA LOS NIVELES DEL EGF-r Y MANTIENE ALTA LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR A LARGO PLAZO. Se sembraron células y se estimularon con EGF por diferentes tiempos. Posteriormente las células fueron lisadas y sometidas a un ensayo de inmunoprecipitación-*Western blot*, en donde los lisados fueron tratados primero con IgG de ratón que se utilizó como control o con anticuerpo anti-EGF-r (R1). Posteriormente, los inmunoprecipitados fueron separados en un gel de poliacrilamida al 12.5% y transferidos a membrana de nitrocelulosa. (A) Las membranas con los inmunoprecipitados de IgG de ratón o (B) con anti-EGF-r (R1) se trataron con un anticuerpo anti-fosfotirosinas y se revelaron por quimioluminiscencia. (C) Los anticuerpos de las membranas de los paneles (B) se despegaron y se re-incubaron con anti-EGF-r (Zymed)

11) LA REGULACIÓN POR E5 DE LOS NIVELES DEL RECEPTOR A EGF SE LLEVA A CABO A NIVEL POST-TRADUCCIONAL.

Como observamos que la presencia de E5 estaba modificando los niveles de la proteína de EGF-r, decidimos analizar los transcritos del *EGF-r* para identificar a qué nivel se está llevando a cabo esta regulación.

Encontramos que los niveles en los transcritos de *EGF-r* no variaron significativamente por la estimulación con EGF, ya que mediante *Northern blot* con RNA procedente de las diferentes líneas observamos que los niveles de mRNA se mantienen relativamente constantes en las células EGFR, EGFRneo y EGNE5, indicando que el EGF o E5 no pudieron modular al receptor a este nivel (FIG. 27), lo cual sugiere que E5 está modulando al receptor a EGF únicamente a un nivel post-traducciona. No se detectó el transcrito en las células NIH-3T3 silvestres.

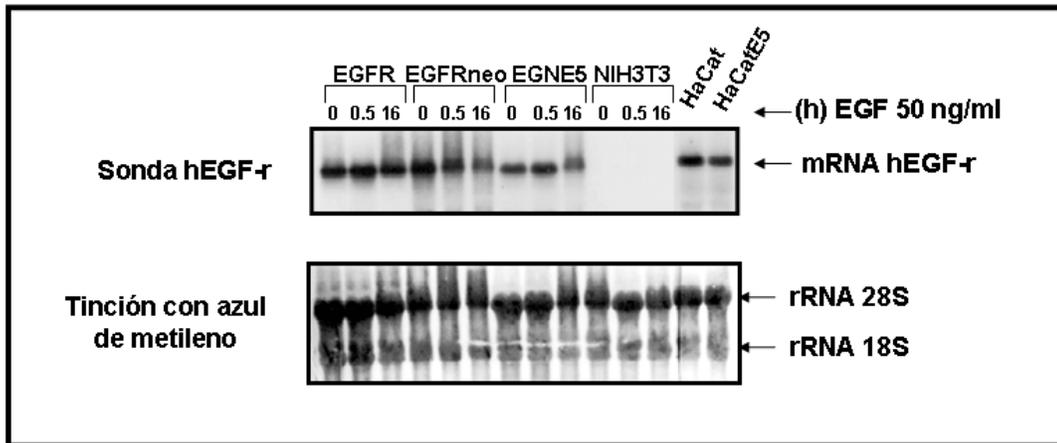


FIGURA 27. NORTHERN BLOT PARA mRNA DE hEGF-R CON RNA PROCEDENTE DE LAS DISTINTAS LÍNEAS CELULARES. El RNA de las células que fueron estimuladas por diferentes tiempos con EGF, se empleó para realizar el *Northern blot* con una sonda radioactiva contra el receptor humano a EGF (*hEGF-r*, panel superior). Como control de carga del sistema se empleó una tinción directa de las subunidades ribosomales 28S y 18S con azul de metileno que da un patrón definido y constante para todas las muestras que se utilizaron (panel inferior).

12) LA ACTIVIDAD DE E5 SOBRE P27^{Kip1} DEPENDE ESPECÍFICAMENTE DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN A PARTIR DEL RECEPTOR A EGF.

Para verificar que el efecto de E5 sobre la degradación de p27^{Kip1} depende de la actividad del receptor a EGF, utilizamos tirfostina AG1478, un inhibidor específico de la actividad cinasa del receptor y en consecuencia de la vía de señalización que parte de éste (Dvir *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 2001). La fosforilación en tirosinas del PDGF se utilizó como control negativo de este sistema y para demostrar que la tirfostina AG1478 estaba actuando exclusivamente sobre el receptor a EGF. Las células se cultivaron y estimularon con EGF como se describe en Materiales y Métodos. El análisis de *Western blot* mostró que el receptor a EGF se activó después de 30 min post-estimulación con EGF en presencia o ausencia de la proteína E5 (FIG. 28, carriles 2 y 14). Sin embargo, se observó una mayor actividad del receptor a EGF en todos los tiempos en las células que expresan E5 (FIG. 28; EGNE5, panel superior). La adición de la tirfostina AG1478 a las células previo a la estimulación con EGF inhibió la actividad del EGF-r como lo reveló la ausencia de fosforilación en tirosinas (FIG. 28; carriles 3 y 15, paneles superiores). A las 16 h post-estimulación con EGF, se observaron los niveles más altos del EGF-r fosforilado y los más bajos de la proteína p27^{Kip1} en las células EGNE5, en comparación con las células EGFRneo (FIG. 28; carriles 8 y 20, páneles superiores y p27^{Kip1}). En presencia de tirfostina AG1478, la regulación negativa de p27^{Kip1} se bloqueó como consecuencia de la inhibición de la actividad del EGF-r (FIG. 28, carriles 10 y 22, páneles

superior y p27^{Kip1}). Por otro lado, los niveles de p27^{Kip1} no se vieron afectados por el PDGF ni en presencia del inhibidor AG1478 (FIG. 28; carriles 11,12, 23 y 24 del panel de p27^{Kip1}). Adicionalmente, para identificar si el sistema de transducción de señales que parten del EGF-r fue completamente bloqueado por la tirfostina AG1478, estudiamos la fosforilación de Grb2, uno de los blancos del EGF-r activado (Li *et al.*, 2001). Los resultados mostraron un patrón normal de fosforilación de la proteína Grb2 en las células control EGFRneo a tiempos cortos, aunque esta actividad se redujo al 13% después de 16 h post-estimulación (FIG. 28; carriles 2 y 8 respectivamente). Sin embargo, para las células que expresan E5, el 28% del Grb2 fosforilado permaneció a las 16 h post-estimulación, sugiriendo la existencia de una estimulación positiva del sistema de transducción de señales a partir del EGF-r (FIG. 28; carriles 14 y 20).

Estos resultados demostraron que E5 requiere de un EGF-r activo (medido por su fosforilación en tirosinas) y de una vía de señalización activa (puesta en evidencia por la fosforilación de Grb2) para incrementar la regulación negativa de los niveles de p27^{Kip1}. El papel real que Grb2 fosforilado podría tener en la degradación de p27^{Kip1} no está aún bien entendido, debido a que la activación de Grb2 por la unión a EGF-r y su posterior fosforilación está asociado con el apagado de la vía de Ras y no con un incremento de la señal (Li *et al.*, 2001). En nuestros experimentos, el Grb2 fosforilado se asoció con la regulación negativa de p27^{Kip1}.

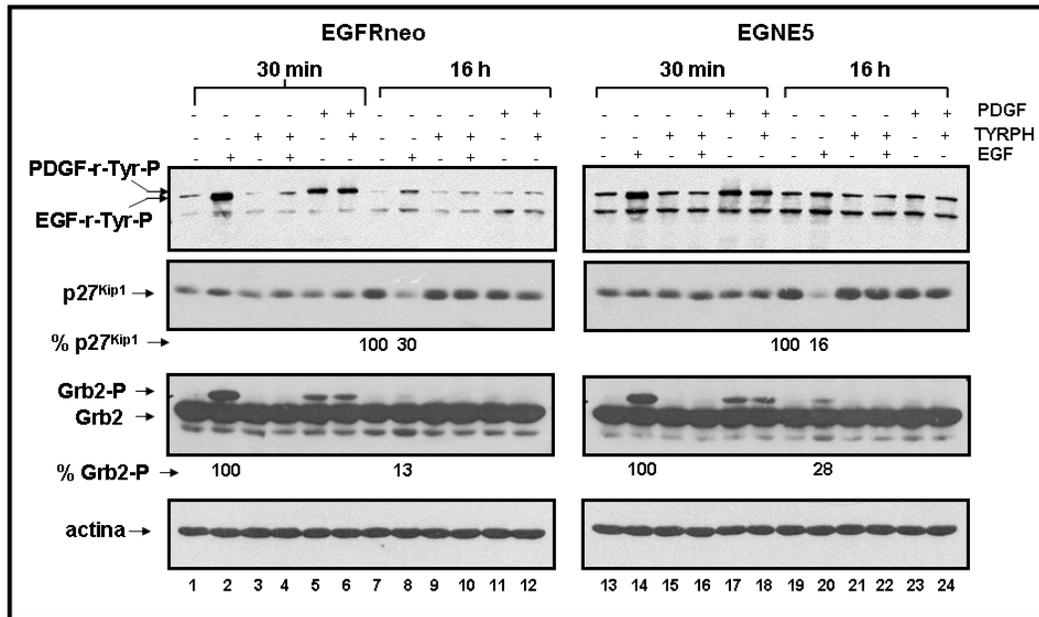


FIGURA 28. LA REGULACIÓN NEGATIVA DE LOS NIVELES DE p27^{Kip1} POR E5 DEPENDE DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR A EGF. Las células EGFRneo y EGNE5 fueron tratadas con 1 μ M de tirfostina AG1478 (TYRPH) por 1 h previo a la estimulación con EGF (50 ng/ml) o PDGF (25 ng/ml). Posteriormente las células se lisaron con buffer RIPA conteniendo ortovanadato de sodio 10 mM y 0.5 mM DTT. Cuarenta microgramos de proteína total fueron separados en un gel SDS-PAGE al 12.5%, transferidos y analizados con anticuerpos anti-fosfotirosina (PY99), anti-p27^{Kip1}, anti-Grb2 o anti-actina como control. El *Western blot* fue revelado por quimioluminiscencia.

13) LA INHIBICIÓN DE PI3K FAVORECE LA DEGRADACIÓN DE p27^{Kip1} MEDIADA POR E5 DE HPV16.

Como ya se mencionó, una de las vías que se activan durante la estimulación con EGF, es la vía de PI3K, la cual también quisimos saber si es modificada por E5. En estos experimentos se utilizó un inhibidor de PI3K, el LY294002 (LY) (Vlahos *et al.*, 1994) para dilucidar el papel de E5 sobre dicha vía. Los resultados mostraron que a los 30 min de estimulación con EGF se provocó la activación del receptor a EGF y correspondió con un aumento en la fosforilación de pAkt (FIG. 29, carriles 2 y 10, pAkt1-Ser⁴⁷³-P) lo cual implica que la PI3K se activó en ambas líneas celulares. Sin embargo, al adicionar EGF y LY al mismo tiempo no se modificó la actividad del EGF-r, pero sí la actividad de PI3K, demostrado por la baja en la fosforilación de pAkt (FIG. 29, carriles 4 y 12, pAkt1-Ser⁴⁷³-P).

A las 16 h observamos que la actividad del EGF-r fue mayor en las células EGNE5, correspondiendo a una mayor degradación de p27^{Kip1} en ausencia de LY (FIG. 29, carril 14, EGF-r-Tyr-P, p27^{Kip1}). Sin embargo, encontramos un incremento del procesamiento de p27^{Kip1} en presencia de LY, tanto en ausencia como presencia de EGF en las células EGNE5 pues sólo se detectaron un 24.7% y un 0% respectivamente de p27^{Kip1} en relación con el 100% fijado para 16 h sin EGF ni LY (FIG. 29, carriles 15 y 16, p27^{Kip1}). Lo anterior no ocurrió para las EGFRneo, ya que mostraron niveles más elevados de p27^{Kip1} en las mismas condiciones, de 109% y 32% respectivamente (FIG. 29, carriles 7 y 8, p27^{Kip1}).

La interpretación que dimos a estos resultados fue que la degradación de p27^{Kip1} en ausencia de E5 depende tanto de la vía de las MAPKs y PI3K, ambas dependientes de la activación de Ras, mientras que en presencia de E5, solamente depende de la vía de las MAPKs, debido a que la inhibición de PI3K por LY afectó la degradación de p27^{Kip1} y al parecer PI3K tiene un efecto inhibitorio sobre la degradación de esta proteína. En este sistema se abre la posibilidad de que E5 origine, utilice o modifique un “*cross-talk*” pre-existente entre las vías de PI3K y MAPKs, lo cual requerirá revisión. Se ha reportado que sí existen regulación de las vías de PI3K y MAPKs mediante el fenómeno de “*cross-talk*” (Geoffrey *et al.*, 2006). En la FIG. 30 proponemos un modelo que trata de dar explicación a la mayoría de los hechos experimentales encontrados en este trabajo de tesis y los correlacionamos con otros reportes científicos.

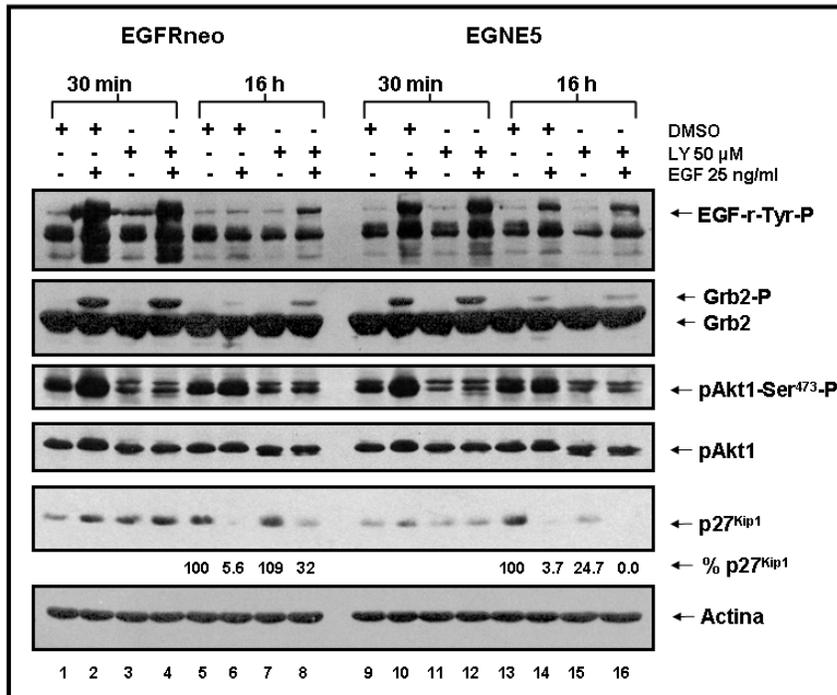


FIGURA 29. EFECTO DE LY294002, INHIBIDOR DE PI3K SOBRE LOS NIVELES DE p27^{Kip1}.

Las células se estimularon con EGF al igual que en el experimento anterior, pero a algunas cajas se les añadió previamente LY294002. La actividad de PI3K se sigue por la fosforilación específica que sufre pAkt en Ser473 mediante un anticuerpo que reconoce dicha fosforilación. Las muestras se procesaron para Western blot y por escaneo se determinó la densidad de las bandas.

VIII. DISCUSIÓN.

En el transcurso del trabajo experimental desarrollado para esta tesis, lo más importante que encontramos fue que la proteína E5 de HPV16 está involucrada en la regulación negativa de los niveles de la proteína p27^{Kip1}, un inhibidor de CDKs importante para el arresto del ciclo celular en la fase G1. Esta novedosa propiedad de la proteína E5 de HPV16 requiere de un receptor a EGF activo así como también una vía de señalización activa a partir de éste (evidenciada por la fosforilación de Grb2), un hecho que también ha sido demostrado para otras señales asociadas con esta oncoproteína (Crusius *et al.*, 1997; 1998; Genther Williams *et al.*, 2005; Leechanachai *et al.*, 1992; Pim *et al.*, 1992; Straight *et al.*, 1993). Actualmente ha quedado establecido que **E5** de HPV16 es un oncogén potente, debido a su capacidad para promover un crecimiento de tumores espontáneos en ratones transgénicos para E5 y en ausencia de los oncogenes E6/E7 de HPV16. Incluso, también se apoya en esos experimentos la cooperación existente entre E5 y el receptor a EGF (Genther Williams *et al.*, 2005).

Para caracterizar la actividad de la proteína E5 en este proyecto, lo primero a mencionar es que empleamos un fragmento de 1225 pb de HPV16 que es más grande que la secuencia completa del *ORF* de **E5** de HPV16 (252 pb; Halbert *and* Galloway, 1988). Debido a que el fragmento de 1225 pb también contiene múltiples sitios AUG y los primeros 751 nucleótidos de la secuencia de **L2** de HPV16, existe la controversia sobre cuáles péptidos se producirán realmente a partir de estas secuencias. Desde el inicio de este trabajo, y a lo largo del mismo, dicho fragmento había sido o estaba siendo utilizado ampliamente en al menos 12 trabajos que comenzaron a explorar las funciones de **E5** (Bouvard *et al.*, 1994; Bravo *et al.*, 2005; Crusius *et al.*, 1998; Crusius *et al.*, 2000; Kabsch *and* Alonso 2002; Kabsch *et al.*, 2004; Leechanachai *et al.*, 1992; Leykauf *et al.*, 2004; Oelze *et al.*, 1995; Oetke *et al.*, 2000; Pim *et al.*, 1992; Tomakidi *et al.*, 2000), aunque recientemente en un reporte de 2008 se volvió a utilizar este mismo fragmento (Kivi *et al.*, 2008). Independientemente a estos trabajos, el grupo de Chen y colaboradores (Chen *et al.*, 1996) emplearon un fragmento más grande que el que codifica para la proteína E5 de HPV16, aunque de menor tamaño al de 1225 pb (1059 pb del nucleótido 3696 al 4755 de HPV16).

Una característica importante de este fragmento es que contiene uno de los tres sitios de poliadenilación naturales de HPV16 (AATAAA), lo que permite una mejor transcripción de **E5** (Milligan *et al.*, 2007). En etapas tempranas del ciclo viral, los pre-mRNAs virales se poliadenilan casi exclusivamente en este sitio poly(A) localizado en la región de los genes de expresión temprana. Se ha reportado que el cambio en el procesamiento de los pre-mRNAs

tempranos a los tardíos, requiere no solamente de la liberación de la inhibición del sitio poli(A) de la región tardía, sino también de la disminución en la poliadenilación en el sitio poli(A) de la región temprana (Zheng *and* Baker 2006).

Sin embargo, hay que recordar que casi todos los transcritos de los papilomavirus son bicistrónicos o policistrónicos; y el inicio en la traducción de una proteína a partir de un *ORF* viral depende de mecanismos especializados diferentes a lo que sucede por lo general en eucariotes. Dichos mecanismos pueden ser el reinicio de la traducción, la carencia en el escaneado del mRNA por el ribosoma, el salto de los ribosomas y la presencia de entradas ribosomales internas (IRES). Para esto, los papilomavirus han desarrollado mecanismos para regular el “*splicing*” de pre-mRNAs individuales de una manera específica, dependiente de la diferenciación celular como se pone en evidencia por la presencia de múltiples cis-elementos regulatorios en cada una de las especies de pre-mRNA virales (Zheng *and* Baker, 2006). Por ejemplo, en los genes eucariotes también se han encontrado IRES, y en el caso particular del cáncer cervical se ha observado que el papilomavirus es capaz de modificar el patrón de traducción de proteínas, de uno tradicional hacia uno donde intervienen los IRES principalmente (Mizrachy-Schwartz *et al.*, 2007).

Cuando estudiamos la actividad transformante en las células que expresan E5, observamos que E5 requiere de la activación del receptor a EGF para generar este fenotipo. Lo anterior está basado en la observación de que las células que expresan E5 (EGNE5) inducen la densidad de saturación y la formación de colonias en agar suave más altas (características asociadas con un fenotipo transformado), solo en presencia de EGF como previamente se ha reportado (Leechanachai *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1989; Pim *et al.*, 1992; Straight *et al.*, 1993). La sobreexpresión del receptor a EGF confiere capacidad transformante en las células, como se observó por el gran número de colonias formadas en las células EGFRneo. Sin embargo, inesperadamente la formación de colonias se redujo en las células que expresan E5 en ausencia de EGF, pero se incrementó hasta 128 veces respecto a las células control (3T3neo) en presencia de EGF. En este momento, aún no queda claro cómo es que E5 puede revertir el proceso de transformación en ausencia de EGF; sin embargo es evidente que E5 requiere de la activación del receptor a EGF para que la vía de señalización en la que interviene E5 funcione e induzca transformación. Una posibilidad es que, en ausencia de ligando, E5 sea capaz de disminuir la dimerización espontánea y la señalización de los receptores a EGF (sobreexpresados en células EGFRneo y EGNE5), permitiendo la modulación del proceso de transformación o pudiendo conducir a las células hacia otro proceso celular como la senescencia o la diferenciación. Nuestros resultados están de acuerdo con un reporte de

Genther Williams y colaboradores (2005), quienes demostraron en ratones transgénicos que E5 fue capaz de dirigir a las células hacia diferenciación y no sólo a transformación; sin embargo, no fue claro si estos eventos dependen de la activación del receptor a EGF.

Por otro lado, nuestros resultados mostraron que E5, en cooperación con la vía de señalización a partir del receptor a EGF, promovió la proliferación celular, lo cual fue demostrado por un incremento en la población de células en la fase S en las células EGNE5 (FIG. 19). Estos resultados son consistentes con otros reportes, como en el que se demuestra que la proteína E5 de HPV-31 es capaz de promover la progresión del ciclo celular de células epiteliales en diferenciación (Fehrmann *et al.*, 2003), aunque estos investigadores postulan que el receptor a EGF no está involucrado en el proceso. Este resultado, diferente a lo que encontramos, puede ser debido a la presencia de E6 y E7 en el mismo sistema celular. Es posible que E6 y E7 estén por encima de la vía de señalización de E5 como en reportes previos en los que demuestran que los oncogenes E6 y E7 incrementan los niveles y la actividad del receptor a EGF (Akerman *et al.*, 2001; Johnston *et al.*, 1999). También pudiera ser posible que la actividad diferencial de E5 de HPV16 y HPV31 sobre el receptor a EGF se deba a la diferencia en niveles de expresión o a propiedades funcionales diferentes atribuidas a variaciones en secuencia. En el mismo sentido, Barbaresi y colaboradores (2010) demostraron que en cultivos "raft" organotípicos de células HaCat-16E5, los marcadores mcm5/ki67 de proliferación se detectaron tanto en las capas basal como suprabasal, incluyendo células entre los queratinocitos diferenciados y en la capa superficial del epitelio, demostrando que algunas células son capaces de llevar a cabo la progresión de su ciclo celular aún en las capas más superiores. Las células invasoras también fueron positivas para los marcadores mcm5/ki67 de proliferación. Aunque en este reporte no comentan sobre la participación del receptor a EGF en este proceso.

Cuando investigamos los mecanismos mediante los cuales E5 de HPV16 promueve la progresión del ciclo celular, encontramos que este oncogén tiene la capacidad de potenciar la disminución en los niveles de p27^{Kip1}. También, propusimos que la actividad de E5 depende de la presencia de un receptor a EGF activo, ya que el sistema puede ser bloqueado por el inhibidor de la actividad del receptor a EGF, la tirfostina AG1478. Finalmente, identificamos que la proteína Grb2 permanece fosforilada por un tiempo mayor en las células que expresan E5, la cual podría estar manteniendo una transducción activa a través de Ras y modulada negativamente por PI3K, ya que el inhibidor de esta vía, la LY294002 conduce a la degradación total de p27^{Kip1}, lo que posiblemente arreste el ciclo celular.

Todos estos resultados en su conjunto sugieren que E5 de HPV-16 regula la entrada al ciclo celular, a través de regular negativamente a la proteína p27^{Kip1} de una manera dependiente de EGF y esta podría ser la razón del por qué se observa una mayor población de células en fase S en nuestros experimentos; probablemente, este hecho pudiera ser una etapa de iniciación del proceso de transformación, como se ha visto que ocurre en los cánceres que se desarrollan a partir de la oncoproteína Ras (Gryfe *et al.*, 1997; Takami *et al.*, 1995). Alternativamente, se ha demostrado que p27^{Kip1} regula al Grb2 citoplasmático en respuesta a la estimulación con EGF en un sistema de retroalimentación negativo (Moeller *et al.*, 2003). Por lo tanto, nuestros resultados también sugieren que E5 puede incrementar la formación del complejo Grb2-Sos y probablemente la activación de la transducción de señales a partir de Ras como consecuencia de los niveles anormalmente bajos de p27^{Kip1}, eventos que pueden contribuir al proceso de transformación. También ha sido demostrado que la regulación de las actividades de Grb2/Ras tienen el potencial para influir en el destino celular (Schwartz, 1997) y esto podría ser fundamental para E5. Probablemente esta oncoproteína juega un papel clave en el ciclo de vida viral, manteniendo parcialmente diferenciadas a las células dentro del ciclo celular, para permitir la formación de partículas virales.

Debido a que p27^{Kip1} controla la división celular, la desregulación de esta proteína ha sido implicada no solamente en oncogénesis, sino también en la agresividad de los tumores y en la baja sobrevivencia de los pacientes con diferentes tipos de cánceres (Bloom and Pagano, 2003; Catzavelos *et al.*, 1997; Mori *et al.*, 1997). Es posible que la proteína p27^{Kip1}, un regulador importante de la actividad CDK, pudiera afectar la entrada y salida al ciclo celular en las células cancerosas. De igual manera se ha demostrado que la proteína p27^{Kip1} se expresa en altos niveles en las células diferenciadas, y en las que no están transitando por su ciclo celular; pero su nivel es bajo o ausente en células en proliferación (Durand *et al.*, 1998).

Más recientemente, se ha demostrado que los niveles bajos de p27^{Kip1} en ratones transgénicos (haploinsuficientes para p27^{Kip1}) fueron más susceptibles a la transformación por el receptor ErbB2/Neu (miembro de la familia ErbB, la cual incluye al receptor a EGF). Estos investigadores también demostraron que la carencia de ambos alelos de p27^{Kip1} conducía a una menor susceptibilidad a la transformación por ErbB2 (Muraoka, *et al.*, 2002). Por lo tanto parece que la titulación de los niveles de p27^{Kip1} dentro de la célula puede determinar la función de esta proteína en el ciclo celular. En este contexto, podemos especular que E5 de HPV-16 mantiene bajos los niveles de p27^{Kip1} en la célula, ya que esta proteína es requerida para la actividad del complejo ciclina D/CDK4 (Cheng, *et al.*, 1998; 1999). Esta actividad de CDK4 permite la progresión de la célula a través de la fase G1 y la entrada a la fase S, efecto final que fue

observado en las células que expresan E5 (FIG. 19). En este momento, no queda claro si el punto de decisión se establece por la presencia de E5 que desregula los niveles de la proteína p27^{Kip1} impidiendo el papel de esta proteína como un inhibidor de ciclo celular, permitiendo a las células cambiar a una etapa de proliferación que favorece la producción de partículas virales. Sin embargo, si persisten niveles bajos de p27^{Kip1} por mucho tiempo, debido a la regulación por E5, entonces se puede dirigir a la célula a un proceso de transformación, como el que fue observado en los ratones transgénicos p27^{+/-} haploinsuficientes.

También buscamos si existían alteraciones en los niveles de la proteína del receptor a EGF y de su actividad, ya que se ha reportado que E5 puede modular a este receptor (aunque este punto es totalmente controversial). Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que E5 prolonga la actividad del receptor a EGF, pero sin incrementar los niveles de dicha proteína, como ha sido reportado previamente (Gu *and* Matlashewski, 1995). Sin embargo, hay un reporte que demuestra un elevado número de receptores a EGF, así como un incremento en el grado de fosforilación. Se observó que en células que expresan E5, hay un impedimento en la degradación y en el reciclamiento de los receptores hacia la membrana celular (Straight *et al.*, 1993). La discrepancia entre reportes de la modulación del receptor a EGF por E5 podría estar relacionada con el uso de diferentes líneas celulares que expresan diferentes niveles de los miembros de la familia del receptor a EGF (por ejemplo EGF-r, ErbB-2, ErbB-3 y ErbB-4). Se ha demostrado que se generan la transfosforilación de homo- y heterodímeros inducidos por ligando para modular las señales regulatorias de crecimiento (Carraway *and* Cantley, 1994; Zhang *et al.*, 1996). Es probable que las células usadas en este trabajo específicamente amplificaron la vía de señalización a partir del receptor a EGF, ya que las células sobreexpresan este receptor. Al mismo tiempo, también es posible que los homo-dímeros del receptor a EGF prendan una señal específica que culmine en la degradación de p27^{Kip1}.

En resumen, examinamos el papel de E5 de HPV16 en la progresión del ciclo celular y encontramos que E5 incrementa la degradación de los niveles de p27^{Kip1} por una vía dependiente de EGF ya que la proteína Grb2 permanece activa por más tiempo en nuestro sistema. Estos datos sugieren que p27^{Kip1} es un blanco localizado por debajo de E5, el cual permite a las células estar por más tiempo en el ciclo celular para permitir el inicio del fenotipo transformado.

IX. CONCLUSIONES

Como conclusión se presenta un modelo en el cual se tratan de explicar los resultados obtenidos, haciendo mención de los resultados de esta tesis donde se observó el fenómeno e interrelacionando con el conocimiento general que se tiene de otros reportes afines al tema; en varios puntos se hacen suposiciones que requerirían ser validadas experimentalmente *a posteriori* (FIG. 30). Cabe aclarar que los fenómenos descritos pueden estar regulados por otros factores no considerados en este modelo y por lo tanto no se espera que las activaciones o inhibiciones en las vías mencionadas ocurran a un 100%, sino más bien sucederán en forma parcial.

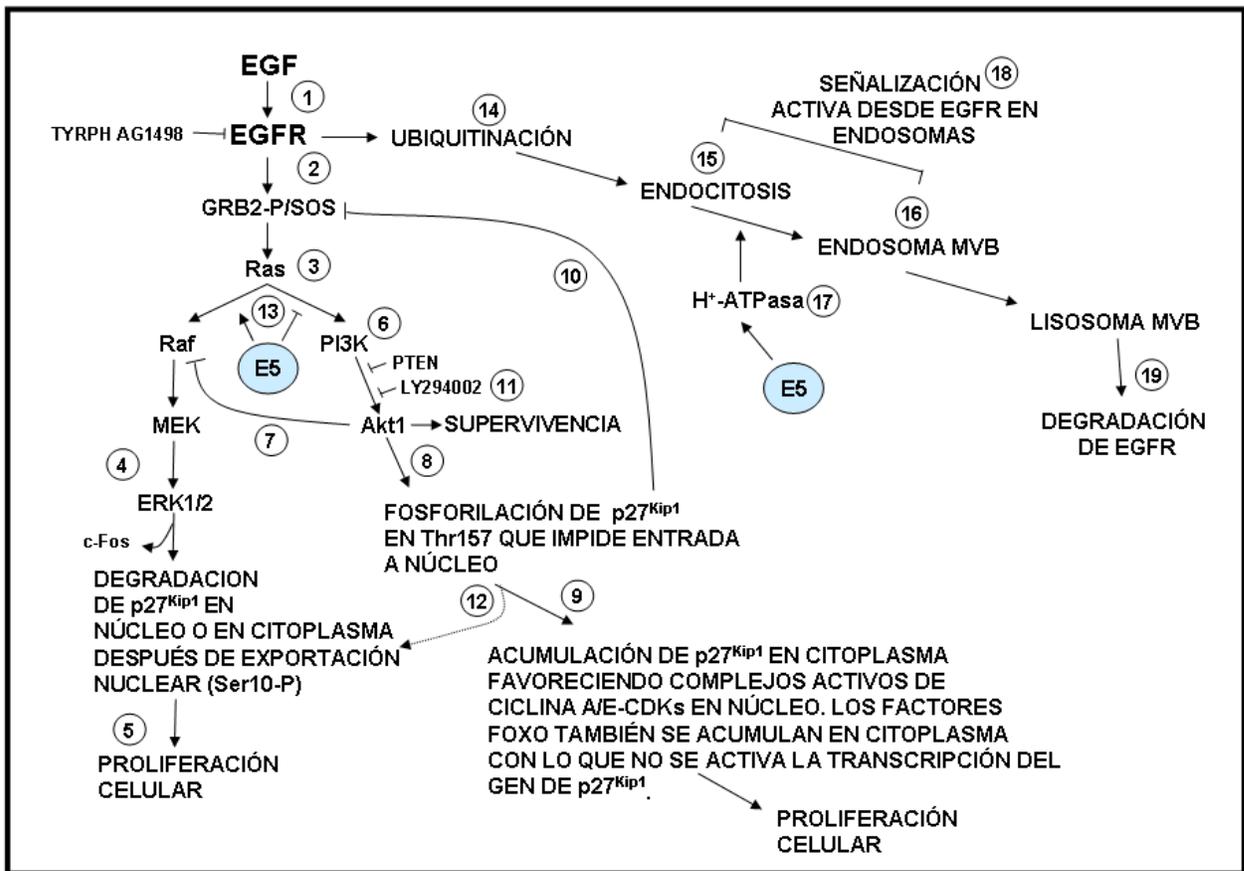


FIGURA 30. CONCLUSIONES. En este diagrama se resumen los hechos teóricos y experimentales que se tomaron para explicar lo que está sucediendo en las células con la presencia de E5 en un sistema de fibroblastos de ratón que sobre-expresan el receptor a EGF. Para detalles y descripción de cada punto encerrado en círculos recurrir al texto correspondiente.

DESCRIPCIÓN DEL MODELO:

1. La unión de EGF a su receptor hace que se active este último por auto-fosforilación (FIGURAS 25, 26, 28, 29) y de esta manera pase la señal a las siguientes moléculas de la vía. Este efecto puede ser inhibido por la tirfostina AG1478 (FIG. 28).
2. El receptor fosforilado en tirosinas, puede pasar la señal mitogénica vía unión Grb2/SOS a Ras, donde presumiblemente la fosforilación de Grb2 denota que esta vía está activa (FIG. 28). De igual manera, el receptor activado puede unir moléculas implicadas en su degradación, como c-Cbl, para modular o apagar su señal (Madhus and Stang, 2009).
3. Una vez que la señal ha llegado a Ras, ésta puede dirigirse simultáneamente por al menos 2 vías, la de las MAPKs y la de PI3K (Gupta *et al.*, 2007). En lo que respecta a la activación de las MAPKs, se ha reportado que la célula puede responder de manera diferente a los ligandos dependiendo de si el estímulo que se reciba es persistente y sostenido o transitorio, siendo la respuesta para el primer caso la diferenciación y en el segundo la proliferación (Blüthgen and Legewie, 2008). Nuestros experimentos se desarrollaron con estímulos de EGF transitorios, por lo cual se estaría favoreciendo en todos ellos la proliferación celular.
4. La señal que va hacia las MAPKs incluye a Raf, MEK y ERK1/2, éstas últimas se translocan del citoplasma al núcleo, donde entre otras cosas favorecen la degradación de p27^{Kip1} en el interior del núcleo (Belletti *et al.*, 2005). También puede favorecerse la fosforilación en Ser10 de p27^{Kip1}, lo que permite su relocalización en citoplasma en donde es degradada. Alrededor del 70% de la fosforilación de p27^{Kip1} ocurre en la Ser10 y puede darse por hKis, MAPKs y Akt (Fujita *et al.*, 2002). La activación de las MAPKs puede favorecer la expresión de c-Fos y el encendido de genes implicados en proliferación celular.
5. La disminución en los niveles de p27^{Kip1} dentro del núcleo permitirá que la célula empiece a transitar por su ciclo celular desde G0/G1, al desinhibir a las correspondientes ciclinas A/E-CDK2, y finalmente provocando proliferación celular.
6. Por otro lado, la señal de Ras también pasa por PI3K, resultando en la fosforilación de pAkt1, evento que permite la supervivencia de la célula, debido a que al regular pAkt1 regula componentes de apoptosis (Gupta *et al.*, 2007).
7. Se ha reportado que pAkt1 puede inhibir la actividad de Raf en un mecanismo tipo “*cross-talk*”, el cual permite apagar la vía de las MAPKs cuando está encendida la vía de PI3K. Por su parte, ERK1/2 no cambian su estado de fosforilación por el efecto inhibitorio de pAkt, lo que se ha observado es que se retienen activas en el citosol y no son translocadas a núcleo (Figueroa and Vojtek, 2003; Galetic *et al.*, 2003; Geoffrey *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2000;

- Mebratu and Tesfaigzi, 2009; Moelling *et al.*, 2001;). Lo anterior provoca una baja en la activación del factor transcripcional Elk1 y en la transcripción de genes de expresión temprana que dependen de este factor, además de una disminución en la expresión de c-Fos (Galetic *et al.*, 2003).
8. La activación de pAkt1 produce la retención de p27^{Kip1} en citoplasma, al fosforilarlo en Thr157 dentro de su NLS, con lo cual se impide la translocación de p27^{Kip1} al núcleo o en T198 que favorece su interacción con 14-3-3 y queda secuestrado en citoplasma (Fujita *et al.*, 2002), evitando que inhiba a las CDKs en núcleo. También la activación de pAkt conduce a la fosforilación de los factores FOXO, que al igual que p27^{Kip1} quedan retenidos en citoplasma y ya no pueden ingresar a núcleo para activar la expresión del gen de p27^{Kip1} (Dijkers *et al.*, 2000; Medema *et al.*, 2000).
 9. En principio, al no entrar p27^{Kip1} a núcleo, se favorece la proliferación celular debido a que este inhibidor no puede ejercer su función sobre las ciclinas A/E CDK2 dentro del núcleo. Sin embargo, se ha reportado que la acumulación irregular de p27^{Kip1} en citoplasma resulta tener características oncogénicas (Vervoorts and Lüscher, 2008).
 10. Adicionalmente, la acumulación de p27^{Kip1} en citoplasma puede tener un efecto inhibitorio sobre los complejos Grb2/SOS, propiciando que se apague la señal de Ras por retroalimentación negativa (Moeller *et al.*, 2003). Esto implica que la activación de la PI3K finalmente podría apagar a Ras, evitando posiblemente una exacerbación de la señal. En nuestros experimentos, se observó que a mayor fosforilación de Grb2 corresponde mayor actividad de señalización y especulativamente PI3K podría disminuir la fosforilación de Grb2 (FIG. 29).
 11. La LY294002, inhibidor de PI3K, evita la fosforilación y activación de pAkt. Esta acción puede eliminar el bloqueo que ejerce pAkt sobre la vía de las MAPKs, reactivándolas y entre otras cosas favoreciendo la degradación de p27^{Kip1} y un aumento en la expresión de c-Fos (Figuroa and Vojtek, 2003; Galetic *et al.*, 2003; Geoffrey *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2000; Mebratu and Tesfaigzi, 2009; Moelling *et al.*, 2002). Además, al no estar activo pAkt, entonces p27^{Kip1} puede ingresar a núcleo, ejercer su efecto inhibitorio, y posteriormente degradarse, sea en núcleo o en citoplasma después de ser exportado. Aunque los factores transcripcionales FOXO favorecerían la síntesis *de novo* de p27^{Kip1}, es probable que se logre un equilibrio neto en el cual p27^{Kip1} no se acumule en ningún compartimento celular, sino más bien se mantenga a niveles bajos; si PI3K estuviera activa, ayudaría a que p27^{Kip1} sea acumulada en citoplasma con efectos positivos en la proliferación celular.
 12. Especulativamente, una parte del p27^{Kip1} acumulado en citoplasma pudiera degradarse.

13. Cuando aparece en escena E5 de HPV16 podría ocurrir un hecho potencialmente muy importante e interesante que resultaría de todo este trabajo (detalles aún sujetos a verificación experimental). Lo que proponemos es que E5 pudiera estar evitando el “*cross talk*” que existe entre las vías de Ras y PI3K (Gupta *et al.*, 2007), evitando de esta manera que se active esta última, tras lo cual se pudiera favorecer la señalización exclusivamente por la vía de las MAPKs. Gupta y colaboradores (2007) establecieron en su trabajo que la interrupción de la interacción de la subunidad p110 α (junto con p85 conforman a PI3K) con Ras inhibe la transformación de fibroblastos de ratón *in vitro*, además de que el bloqueo de la interacción podría ser un mecanismo para atenuar la señal de PI3K en otros sistemas. La transformación de fibroblastos de ratón (MEFs) mutantes para p110 (no une a Ras) e inmortalizados con el antígeno T grande de SV40 se infectaron con H-Ras activo, receptor a EGF activo L858R, o con el oncogén de polioma. Los MEFs silvestres formaron colonias en agar suave, mientras que los MEFs mutantes de p110 disminuyeron o no formaron colonias en agar suave con los mutantes activos de H-Ras y EGF-r. Sin embargo, con el antígeno de polioma, la transformación se dio por igual en MEFs silvestres o con p110 mutado (Gupta *et al.*, 2007). Un fenómeno semejante al anterior se observó empleando la misma metodología de crecimiento en agar suave, cuando E5 se introdujo en las células EGFRneo que sobreexpresan al receptor a EGF, en ausencia de EGF (Tabla 1). Aunque también hemos observado reiteradamente que MEFs derivados de ratones transgénicos con E6/E7 de HPV16 y transfectados con H-Ras y E5 de HPV16 juntos tienen una tasa de transformación menor que cuando estos mismos MEFs transgénicos se transfectan por separado con E5 o con H-Ras (datos no mostrados, Tesis de Licenciatura de la Biol. Doris Arellano Quintanilla), lo cual indica que E5 podría estar regulando negativamente la vía de PI3K en base al modelo de Gupta y colaboradores. En forma análoga a este fenómeno, se ha observado que la aplicación de LY294002 en tumores de pulmón producidos por K-Ras en ratones puede revertir el estado transformado, debido a que baja la activación de pAkt y p27^{Kip1} se moviliza hacia el núcleo donde ejerce su acción inhibitoria (Kelly-Spratt *et al.*, 2009). Contrariamente, existen dos reportes donde demuestran que E5 aumenta la actividad de PI3K. Sin embargo, en uno de los reportes dicha actividad aumenta cuando las células se someten a luz ultravioleta B (Zhang *et al.*, 2002) y en el otro reporte, utilizan al factor de crecimiento vascular y no el EGF como en esta tesis (Kim *et al.*, 2006).

Sin embargo, el efecto de E5 sobre PI3K podría justificarse de otra manera. En un reporte de Bravo y colaboradores demuestran que E5 de HPV16 es capaz de modificar la composición lipídica de la membrana celular, tanto en queratinocitos humanos como en

células A31 de ratón (Bravo *et al.*, 2005). En este último reporte, los autores observan que E5 aumenta la cantidad de lisofosfatidilcolina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol, en las membranas de los fibroblastos de ratón A31. Desafortunadamente no se cuantificó al fosfatidilinositol que es el precursor del sustrato donde actúa la PI3K y que sería importante conocer para enriquecer este modelo. Estos resultados sugieren que E5 modula la actividad de PI3K como consecuencia del cambio que provoca en la composición de la bicapa lipídica, en donde la PI3K activada posiblemente tenga menos sustrato sobre el cual actuar. Por lo tanto, pudiera resultar en una inhibición indirecta de PI3K por E5 de HPV16 y no tanto por un bloqueo alostérico provocado por E5 entre Ras y PI3K. En este mismo sentido se ha reportado que E5 incrementa la actividad de forma independiente de EGF (Crusius *et al.*, 1999), ¿Acaso E5 mantendrá niveles bajos de inositol fosfato mediante la PLC- γ -1 en la membrana en ausencia de EGF y una vez que se activa la vía a partir de EGF los que están disponibles ya no son suficientes para que sobre ellos actúe PI3K, manifestándose como una baja neta en la actividad enzimática de ésta última?

Sea como fuere el posible efecto inhibitorio de E5 sobre PI3K que plantea este modelo, lo que resulta de esta acción es que hay una baja en la activación de pAkt1 (FIG. 29), con lo cual parte del p27^{Kip1} deja de fosforilarse en su señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) y entonces puede translocarse a núcleo, para llevar a cabo su función inhibitoria. La baja en el p27^{Kip1} citoplasmático hace, por un lado, que disminuya la inhibición que ejerce p27^{Kip1} sobre Grb2 fosforilado (punto 10, FIG. 30), y por otro, a su vez, que se desbloquee parte de Raf que está siendo inhibido por pAkt1 fosforilado (punto 7, FIG. 30), lo cual conduce finalmente a la reactivación de la vía de Ras/MAPKs a expensas de que E5 bloquea la vía de PI3K. Se observa que en las células EGFRneo en presencia de LY+EGF aumenta la fosforilación de Grb2 (16 h), aparentemente indicando esta reactivación (FIG. 29). Este fenómeno pudiera darse en ausencia de EGF, pero se potencia si está presente este mitógeno y se hace más evidente cuando se añade la droga LY, cuya acción aparentemente favorece la actividad de E5, como se observa en los nulos niveles de p27^{Kip1} de la FIG. 29, cuando están presentes E5, LY y EGF. Aunque no se midió, se espera que LY provoque un cambio en la proliferación celular, resultado de un equilibrio entre la intrincada red de todas estas señales que están actuando sobre su ciclo celular. La reactivación de la vía de las MAPKs tras la inhibición de la vía de PI3K por E5, podría explicar porqué este oncogén favorece la sobreexpresión de factores transcripcionales como c-Fos (integrante junto con c-Jun, del complejo AP1) como se ha observado en varios

reportes (Chen *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996b), de una manera equivalente a como actúa la LY descrito en el punto 11.

Una última posibilidad que puede relacionar a E5 con PI3K, distinta a un bloqueo estérico o al cambio en la biodisponibilidad de sustrato para PI3K, es que E5 actúe sobre la proteína supresora de tumores PTEN (fosfatasa y homóloga a la tensina) la cual es el regulador negativo más importante de la vía de señalización a partir de PI3K pues tiene la capacidad de procesar al fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato (PIP3), producto de PI3K, a PIP2. Como PIP2 no participa en la activación de pAkt1, entonces la señal disminuye o se apaga al disminuir PIP3 que es el activador de pAkt1 (Cakir *and* Grossman, 2009; Cantley *and* Neel, 1999; Cully *et al.*, 2006).

14. Hasta el punto anterior, el modelo se centra prácticamente en E5 y p27^{Kip1}, y a continuación se relacionará a E5 y con el receptor a EGF, aunque ambos fenómenos podrían darse simultáneamente, ya que se ha descrito que el receptor a EGF unido a su ligando puede estar mandando señales al núcleo incluso cuando el receptor está transitando por diferentes estructuras membranales durante la endocitosis rumbo a su degradación mediada por ubiquitinación (Fry *et al.*, 2009; McKay *and* Morrison, 2007). El modelo que se plantea para el efecto de E5 sobre EGF-r se basa a su vez en el que proponen Madhus *and* Stang (2009), en el cual es necesario mantener siempre unido al ligando correspondiente al EGF-r durante su tránsito por los diferentes compartimentos membranales para que se siga dando la señalización intracelular, pues a su vez se mantienen unidas todas las moléculas implicadas como son: Grb2, Sos, Ras, Raf, MEK y Erk1/2 (estas 3 últimas mantenidas unidas también por proteínas de andamiaje como Krf, praxilina, MP1/p14 o Sef. La acidificación de los endosomas puede provocar que se separe el EGF del receptor y se desensamble todo el complejo de señalización con la consecuente pérdida de la señal.
15. Con referencia a la FIG. 6, el EGF-r unido a su ligando es endocitado manteniendo consigo toda la maquinaria de señalización (McKay *and* Morrison, 2007).
16. El endosoma puede fusionarse al MVB (cuerpo multivesicular).
17. Si E5 está presente, se ha observado que inhibe la acidificación de endosomas (Conrad *et al.*, 1993; Straight *et al.*, 1995).
18. Lo anterior favorecería que el ligando no se despegara del EGF-r y el complejo mantuviera activo el sistema de señalización por más tiempo, al menos durante la etapa temprana de la endocitosis, para posteriormente ser degradado en los lisosomas. Si el ligando se despega, el receptor puede recircularse a membrana plasmática.

19. De esta manera observamos que el receptor a EGF-r permanece más tiempo activado, aunque la cantidad total de los receptores disminuya con respecto a células que no tienen E5, pues el complejo EGF/EGF-r es comprometido a degradación más que a reciclamiento (FIG. 25).

X. PERSPECTIVAS

Las perspectivas que ofrece mi trabajo quedan casi estrictamente circunscritas al modelo que acabo de presentar, del cual emanan al leer la explicación propuesta. De lograrse estas perspectivas, contribuirían a reforzar el modelo, re-estructurarlo o en su caso descartarlo ante los hechos experimentales que se obtengan posteriormente, Por lo anterior, las perspectivas propuestas son las siguientes:

1. Investigar si la fosforilación de Grb2 realmente involucra el paso de una señal positiva o una negativa hacia Ras.
2. Verificar si p27^{Kip1} en este sistema evita la formación de complejos Grb/Sos y cómo esto se asocia con el punto anterior.
3. Si p27^{Kip1} inhibe la formación de complejos Grb2/Sos, entonces determinar qué forma fosforilada o no de p27^{Kip1} está ejerciendo el efecto, pues el modelo establece que p27^{Kip1} podría estar fosforilado en T157 debido a pAkt, lo cual favorece su acumulación en citoplasma. Se supondría que la mayoría del p27^{Kip1} en estas condiciones esté fosforilado, pues pAkt fosforila a los factores transcripcionales FOXO y evita que se sintetice nuevo p27^{Kip1} en el citoplasma.
4. En base al punto anterior, conocer el estado de fosforilación de los factores transcripcionales FOXO en presencia y ausencia de E5, para definir su localización intracelular. Aquí podemos complementar con inmunofluorescencias para dichos factores. En su caso determinar la participación de cada subtipo de factores FOXO (FOXO 1, FOXO 2, FOXO 3 Y FOXO 4; Yang *and* Hung, 2009) en la expresión de p27^{Kip1} en presencia o ausencia de E5 de HPV16.
5. Para conocer el efecto aparentemente inhibitorio de E5 sobre PI3K, mucho ayudaría ensayar con la mutante de la subunidad p110 de PI3K que no une Ras y es capaz de revertir el proceso de transformación.
6. Determinar el contenido de inositol fosfatos y las actividades de PLC, PI3K y PTEN (o emplear inhibidores de cada una) en la membrana celular o en aquellas donde se sospeche que está presente E5 para conocer si este oncogén está regulando la actividad de PI3K por alguno de los factores propuestos.
7. Determinar si efectivamente existe una inhibición de las MAPK por pAkt activado, y en su caso cómo se modifica con la presencia de E5.

8. Investigar el efecto en las MAPKs como el PD98059 en presencia o ausencia de E5, y si es posible en combinación con LY, para conocer si E5 reactiva las MAPKs al inhibir a PI3K.
9. Debido a que celularmente el control de los niveles de p27^{Kip1} es un fenómeno muy dinámico, es necesario, por un lado, caracterizar el estado de fosforilación de p27^{Kip1} y en particular en qué residuos de aminoácidos de los que se han reportado y que están involucrados en su funcionalidad. Lo anterior puede lograrse empleando anticuerpos anti-residuos fosforilados de p27^{Kip1} (S10, T157 y T187) que nos ayudará a conocer la proporción de cada una de estas especies de p27^{Kip1} y junto con inmunofluorescencias contra las mismas especies, dónde se localiza p27^{Kip1} en cada una de las condiciones experimentales que se manejaron en esta tesis, por ejemplo, en presencia o ausencia de E5, EGF e inhibidores químicos, entre otros. Así conoceremos a detalle cómo se fosforila, moviliza o degrada p27^{Kip1} por la presencia de E5.
10. Como consecuencia del punto anterior es necesario también hacer un seguimiento de las actividades de los complejos ciclinas-CDKs, tanto de las ciclinas D-CDK4/6 que requieren de p27^{Kip1} para ser activas, como de las ciclinas A/E-CDK2 que se activan cuando bajan los niveles de dicho inhibidor.
11. Para verificar el efecto de E5 sobre p27^{Kip1} (o cualquier otra molécula o vía) en teoría dicho efecto se podría revertir si se emplearan RNAs de interferencia, que ya han sido empleados en otro estudio de E5 (Oh *et al.*, 2009).
12. En los 11 puntos anteriores, donde se requiera y sea posible, también podrían hacerse ensayos de proliferación, crecimiento en agar y de ciclo celular, para finalmente dilucidar a un nivel molecular y celular el papel de E5 en la transformación celular.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Aaronson, S.A. Growth factors and cancer. *Science* 1991, 254:1146–1153.
2. Adam, J.L., Briggs, M.W. and McCance, D.J. A mutagenic analysis of the E5 protein of human papillomavirus type 16 reveals that E5 binding to the vacuolar H⁺-ATPase is not sufficient for biological activity, using mammalian and yeast expression systems. *Virology* 2000, 272:315-325.
3. Alonso A, Reed J. Modelling of the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Nov 19;1601(1):9-18.
4. Alunni-Fabbroni, M., Littlewood, T., Deleu, L., Caldeira, S., Giarre, M., Dell' Orco, M. and Tommasino, M. Induction of S phase and apoptosis by the human papillomavirus type 16 E7 protein are separable events in immortalized rodent fibroblasts. *Oncogene* 2000, 19:2277–2285.
5. Akerman GS, Tolleson WH, Brown KL, Zyzak LL, Mourateva E, Engin TS, Basaraba A, Coker AL, Creek KE, Pirisi L. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 cooperate to increase epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels, overcoming mechanisms by which excessive EGFR signaling shortens the life span of normal human keratinocytes. *Cancer Res*. 2001 May 1;61(9):3837-43.
6. Apt, D., Watts, R.M., Suske, G., Bernard and H.U. High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology* 1996, 224(1):281-291.
7. Arteaga, C.L. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression?. *Oncologist* 2002, 7 (Suppl 4):31–39.
8. Ashby, A.D.M., Meagher, L., Campo, S. and Finbow, M.E. E5 transforming proteins of human papillomaviruses do not disturb the activity of the vacuolar H⁺-ATPase. *J Gen Virol* 2001, 82:2353-2362.
9. Bader, A. G., Kang, S., Zhao, L. and Vogt, P. K. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature Rev. Cancer* 5, 921–929 (2005).
10. Baker, T. S., W. W. Newcomb, N. H. Olson, L. M. Cowser, C. Olson, and J. C. Brown. Structures of bovine and human papillomaviruses: analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 1991, 60:1445-1456.
11. Baldassarre, G., Belletti, B., Bruni, P., Boccia, A., Trapasso, F., Pentimalli, F., Barone, M.V., Chiappetta, G., Vento, M.T., Spiezia, S., Fusco, A. and Viglietto, G. Overexpressed cyclin D3 contributes to retaining the growth inhibitor p27 in the cytoplasm of thyroid tumor cells. *J Clin Invest* 1999, 104(7):865-874.
12. Barbacid, M., 1987. ras Genes. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 779–827.
13. Barbaresi S, Cortese MS, Quinn J, Ashrafi GH, Graham SV, Campo MS. Effects of human papillomavirus type 16 E5 deletion mutants on epithelial morphology: functional characterization of each transmembrane domain. *J Gen Virol*. 2010 Feb;91(Pt 2):521-30. Epub 2009 Oct 7.
14. Barbosa, M. S., Edmonds, C., Fisher, C., Schiller, J. T., Lowy, D. R. and Vousden, K. H. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and SV40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J* 1990, 9:153–160.
15. Bartek, J. and Lukas, J. p27 destruction: Cks1 pulls the trigger. *Nat Cell Biol* 2001, 3(4):E95-E98.
16. Bauer, H.M., Ting, Y., Greer, C.E., Chambers, J.C., Tashiro, C.J., Chimera, J., Reingold, A. and Manos, M.M. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991, 265(4):472-477.
17. Belle A, Tanay A, Bitincka L, Shamir R, O'Shea EK., Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 103(35): 13004-13009.
18. Belletti B, Nicoloso MS, Schiappacassi M, Chimienti E, Berton S, Lovat F, Colombatti A, Baldassarre G. p27(kip1) functional regulation in human cancer: a potential target for therapeutic designs. *Curr Med Chem*. 2005;12(14):1589-605. Review.
19. Bloom, J. and Pagano, M. Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin Cancer Biol* 2003, 13(1):41-47.
20. Blüthgen N, Legewie S. Systems analysis of MAPK signal transduction. *Essays Biochem*. 2008; 45:95-107. Review.
21. Boehm, M., Yoshimoto, T., Crook, M.F., Nallamshetty, S., True, A., Nabel, G.J. and Nabel, E.G. A

- growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. *EMBO J* 2002, 21(13):3390-3401.
22. Bos, J.L. ras Oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989; 49, 4682–4689.
 23. Bosch FX. A scientific response to prevent cervical cancer in the world. *Vaccine.* 2008 Aug 19;26 Suppl 12:v-vi.
 24. Bosch, F.X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C.J. and Shah, K.V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002, 55(4):244-265.
 25. Bouvard, V., Matlashewski, G., Gu, Z-M., Storey, A. and Banks, L. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression *Virology* 1994, 203:73-80.
 26. Bravo IG, Crusius K, Alonso A. The E5 protein of the human papillomavirus type 16 modulates composition and dynamics of membrane lipids in keratinocytes. *Arch Virol.* 2005 Feb; 150(2):231-46.
 27. Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J. and Kouzarides, T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 1998, 391:597–601.
 28. Brehm, A., Nielsen, S.J., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A. J. and Kouzarides, T. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J* 1999, 18:2449–2458.
 29. Bryan, J.T. and Brown, D.R. Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology* 2001, 281(1):35-42.
 30. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics.* 2009;12(5-6):281-90. Epub 2009 Aug 11. Review.
 31. Cakir M, Grossman AB. Targeting MAPK (Ras/ERK) and PI3K/Akt pathways in pituitary tumorigenesis. *Expert Opin Ther Targets.* 2009 Sep;13(9):1121-34. Review.
 32. Cantley, L. C. and Neel, B. G. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 4240–4245 (1999).
 33. Carpenter, G. The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling. *Bioessays* 2000, 22:697–707.
 34. Carpenter, G. and Cohen, S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1990, 265:7709–7712.
 35. Carrano, A.C. and Pagano, M. Role of the F-box protein Skp2 in adhesion-dependent cell cycle progression. *J Cell Biol* 2001, 153(7):1381-1390.
 36. Carraway, K.L. 3rd and Cantley, L.C. A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell* 1994, 78(1):5-8.
 37. Catzavelos, C., Bhattacharya, N., Ung, Y. C., Wilson, J.A., Roncari, L., Sandhu, C., Shaw, P., Yeger, H., Morava-Protzner, I., Kapusta, L., Franssen, E., Pritchard, K.I. and Slingerlans, J.M. *Nat. Med.* 1997, 3:227-230. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med.* 1997, 3(2): 227-230.
 38. Ciaparrone, M., Yamamoto, H., Yao, Y., Sgambato, A., Cattoretti, G., Tomita, N., Monden, T., Rotterdam, H. and Weinstein, I.B. Localization and expression of p27KIP1 in multistage colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 1998, 58(1):114-122.
 39. Cohen, R.B. Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer* 2003, 2:246–251.
 40. Conrad, M., Bubb, V.J. and Schlegel, R. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* 1993, 67:6170-6178.
 41. Conrad M, Goldstein D, Andresson T, Schlegel R. The E5 protein of HPV-6, but not HPV-16, associates efficiently with cellular growth factor receptors. *Virology.* 1994 May 1;200(2):796-800.
 42. Cortese, M.S., G. Hossein Ashrafi and M. Saveria Campo. All 4 di-leucine motifs in the first hydrophobic domain of the E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 are essential for surface MHC class I downregulation activity and E5 endomembrane localization. *International Journal of Cancer* 126, 1675–1682 (2010).
 43. Crusius, K., Auvinen, E. and Alonso, A. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene* 1997, 15(12):1437-1444.

44. Crusius K, Auvinen E, Steuer B, Gaissert H, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT. *Exp Cell Res.* 1998 May 25;241(1):76-83.
45. Crusius, K., Kaszkin, M., Kinzel, V. and Alonso, A. The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates phospholipase C- γ -1 activity and phosphatidyl inositol turnover in mouse fibroblasts. *Oncogene* 1999, 18:6714-6718.
46. Crusius, K., Rodriguez, I., and Alonso, A. The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. *Virus Genes* 2000, 20(1):65-69.
47. Cuadrado M, Gutierrez-Martinez P, Swat A, Nebreda AR, Fernandez-Capetillo O. p27Kip1 stabilization is essential for the maintenance of cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cancer Res.* 2009 Nov 15;69(22):8726-32. Epub 2009 Oct 20.
48. Cullen, A.P., Reid, R., Campion, M. and Lorincz, A.T. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 1991, 65(2):606-612.
49. Cully, M., You, H., Levine, A. J. and Mak, T. W. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nature Rev. Cancer* 6, 184–192 (2006).
50. Cuzick, J., Terry, G., Ho, L., Hollingworth, T. and Anderson, M. Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 1994, 69(1):167-171.
51. Chan, F.K.M., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D.N. and Winoto, A. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16^{ink4}. *Mol Cell Biol* 1995, 15:2682-2688.
52. Chang, J.L., Tsao, Y.P., Liu, D.W., Huang, S.J., Lee, W.H. and Chen, S.L. The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix. *J Biomed Sci* 2001, 8(2):206-213.
53. Channing J. Der and Terry Van Dyke. Stopping Ras in Its Tracks. *Cell* 129, June 1, 2007, 855-857.
54. Chen SL, Huang CH, Tsai TC, Lu KY, Tsao YP. The regulation mechanism of c-jun and junB by human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. *Arch Virol.* 1996;141(5):791-800.
55. Chen, S.L., Huang, C.H., Tsai, T.C., Lu, K.Y. and Tsao, Y.P. The regulation mechanism of c-jun and junB by human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. *Arch Virol* 1996a, 141:791-800.
56. Chen, S.L., Lin, Y.K., Li, L.Y., Tsao, Y.P., Lo, H.Y., Wang, W.B. and Tsai, T.Ch. E5 proteins of human papillomavirus types 11 and 16 transactivate the c-fos promoter through the NF1 binding element. *J Virol* 1996b, 70(12):8558-8563.
57. Chen, S.L., Mounts P., 1990. Transforming activity of E5a protein of human papillomavirus type 6 in NIH 3T3 and C127 cells. *J. Virol.* 64, 3226-3233.
58. Chen, S.L., Tsai, T.Z., Han, C.P. and Tsao, Y.P. Mutational analysis of human papillomavirus type 11 E5a oncoprotein. *J Virol* 1996c, 70(6):3502-3508.
59. Chen, S.L., Tsao, Y.P., Yang, C.M., Lin, Y.K., Huang, C.H. and Kuo, S.W. Differential induction and regulation of the c-jun, junB, junD and c-fos by human papillomavirus type 11 E5a oncoprotein. *J Gen Virol* 1995, 76:2653-2659.
60. Chen, X.S., Garcea, R.L., Goldberg, I., Casini, G. and Harrison, S.C. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* 2000, 5:557-567.
61. Cheng M, Sexl V, Sherr CJ, Rousset MF. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Feb 3;95(3):1091-6.
62. Cheng, M, Olivier, P, Diehl, JA, Fero, M, Rousset, MF, Roberts, JM, Sherr, CJ., 1999. The p21 (Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* 18 (6), 1571–1583.
63. Chesters, P. M., Vousden, K. H., Edmonds, C. and McCance, D. J. Analysis of human papillomavirus type 16 open reading frame E7 immortalizing function in rat embryo fibroblast cells. *J Gen Virol* 1990, 71:449–453.
64. Chesters, P.M. and McCance, D.J. Human papillomavirus types 6 and 16 in cooperation with Ha-ras transform secondary rat embryo fibroblasts. *J Gen Virol* 1989, 70:353–365.
65. Chiarle, R., Yan, P., Piva, R., Boggino, H., Skolnik, J., Novero, D. et al. Skp2 expression in non-

- Hodgkin lymphomas inversely correlates with p27 expression and defines cells in S-phase. *Am J Pathol* 2002, 160:1457-1466.
66. Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987, 162: 156-159.
 67. Chong, T., Apt, D., Gloss, B., Isa, M. and Bernard, H. The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1 and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol* 1991, 65(11):5933-5943.
 68. Choo, K.B., Cheung, W.F., Liew, L.N., Lee, H.H. and Han, S.H. Presence of catenated human papillomavirus type 16 episomes in a cervical carcinoma cell line. *J Virol* 1989, 63(2):782-789.
 69. Choo, K.B., Pan, C.C., Liu, M.S., Ng, H.T., Chen, C.P., Lee, Y.N., Chao, C.F., Meng, C.L., Yeh, M.Y., and Han, S.H. Presence of episomal and integrated human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinoma. *J Med Virol* 1987, 21(2):101-107.
 70. Chow, L.T., Reilly, S.S., Broker, T.R. and Taichman, L.B. Identification and mapping of human papillomavirus type 1 RNA transcripts recovered from plantar warts and infected epithelial cell cultures. *J Virol* 1987, 61(6):1913-1918.
 71. Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008 Apr;8(4):253-67. Review.
 72. Chung, C.T., Miller, R.H. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acid Res* 1988; 16(8):3580.
 73. Davis RJ. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103: 239–252.
 74. Davy, C.E., Jackson, D.J., Wang, Q., Raj, K., Masterson, P.J., Fenner, N.F., Southern, S., Cuthill, S., Millar, J.B. and Doorbar, J. Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol* 2002, 76(19):9806-9818.
 75. DeFeo, D., Gonda, M.A., Young, H.A., Chang, E.H., Lowy, D.R., Scolnick, E.M., Ellis, R.W., 1981. Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 78, 3328–3332.
 76. Demers, G.W., Espling, E., Harry, J.B., Etscheid, B.G. and Galloway, D.A. Abrogation of growth arrest signals by human papillomavirus type 16 E7 is mediated by sequences required for transformation. *J Virol* 1996, 70:6862–6869.
 77. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27.
 78. Di Domenico, F., Foppoli, C., Blarmino, C., Perluigi, M., Paolini, F., Morici, S., Coccia, R., Cini, C., De Marco, F. 2009. Expression of Human papillomavirus type 16 E5 protein in amelanotic melanoma cells regulates endo-cellular pH and restores tyrosinase activity. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 28:4.
 79. Dijkers PF, Medema RH, Pals C, Banerji L, Thomas NS, Lam EW, Burgering BM, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol Cell Biol* 2000;20:9138–9148.
 80. DiMaio, D. and Mattoon, D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* 2001, 20(54):7866-7873.
 81. Doorbar, J., Elston, R.C., Napthine, S., Raj, K., Medcalf, E., Jackson, D., Coleman, N., Griffin, H.M., Masterson, P., Stacey, S., Mengistu, Y. and Dunlop, J. The E1E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with a putative RNA helicase through sequences in its C terminus. *J Virol* 2000, 74(21):10081-10095.
 82. Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C. and Crawford, L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991, 352(6338):824-827.
 83. Doorbar, J. and Gallimore, P. H. Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. *J Virol* 1987, 61:2793-2799.
 84. Doorbar, J., Parton, A., Hartley, K., Banks, L., Crook, T., Stanley, M. and Crawford, L. Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology* 1990, 178(1):254-262.
 85. Durand, B., Fero, M.L., Roberts, J.M., Raff, M.C., 1998. p27Kip1 alters the response of cells to mitogen and is part of a cell-intrinsic timer that arrests the cell cycle and initiates differentiation. *Curr. Biol*. 8, 431-440.
 86. Durst, M., Kleinheinz, A., Hotz, M. and Gissman, L. The physical state of human papillomavirus

- type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* 1985, 66 (Pt 7):1515-1522.
87. Dvir A, Milner Y, Chomsky O, Gilon C, Gazit A, Levitzki A. The inhibition of EGF-dependent proliferation of keratinocytes by tyrphostin tyrosine kinase blockers. *J Cell Biol.* 1991 May; 113(4):857-65.
 88. Dyson, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998, 12:2245–2262.
 89. Dyson, N., Guida, P., Munger, K. and Harlow, E. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol* 1992, 66:6893–6902.
 90. Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K. and Harlow, E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989, 243:934–937.
 91. Earp, H.S.III., Calvo, B.F. and Sartor, C.I. The EGF receptor family—multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 2003, 114:315–333. .
 92. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993, 75: 817-825.
 93. Ellis, R.W., DeFeo, D., Shih, T.Y., Gonda, M.A., Young, H.A., Tsuchida, N., Lowy, D.R.S., 1981. The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature* 292, 506–511.
 94. El Mehdaoui, S., Touze, A., Laurent, S., Sizaret, P.Y., Rasschaert, D. and Coursaget, P. Gene transfer using recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsids with genetically modified DNA encapsidation capacity by addition of packaging sequences from the L1 or L2 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol* 2000, 74:10332-10340.
 95. Embers, M. E., Budgeon, L. R., Pickel, M. and Christensen, N. D. Protective immunity to rabbit oral and cutaneous papillomaviruses by immunization with short peptides of L2, the minor capsid protein. *J Virol* 2002, 76:9798-9805.
 96. Engelman, J. A., Luo, J. & Cantley, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Rev. Genet.* 7, 606–619 (2006). A recent comprehensive review on PI3K.
 97. Esposito, V., Baldi, A., De Luca, A., Groger, A.M., Loda, M., Giordano, G.G., Caputi, M., Baldi, F., Pagano, M., Giordano, A. Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997, 57(16):3381-3385.
 98. Favre, M. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. *J Virol* 1975, 15(5):1239-1247.
 99. Nicole Fehrenbacher, Dafna Bar-Sagi, Mark Philips. Ras/MAPK signaling from endomembranes. *Molecular Oncology* 2009; 3(4):297–307.
 100. Fehrmann F, Klumpp DJ, Laimins LA. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol.* 2003 Mar; 77(5):2819-31.
 101. Feig LA. Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol.* 1999 Jun;1(2):E25-7. Review.
 102. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Lyon: IARC Press; 2004 [IARC CancerBase No. version 2.0].
 103. Figueroa C, Vojtek AB. Akt negatively regulates translation of the ternary complex factor Elk-1. *Oncogene.* 2003 Aug 28;22(36):5554-61.
 104. Flores, Y., Bishai, D., Lazcano, E., Shah, K., Lorincz, A., Hernandez, M. and Salmeron, J. Improving cervical cancer screening in Mexico: results from the Morelos HPV Study. *Salud Publica Mex.* 2003, 45 Suppl 3:S388-S398.
 105. Franco, E.L. Epidemiology of anogenital warts and cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1996, 23(3):597-623.
 106. Fry WH, Kotelawala L, Sweeney C, Carraway KL 3rd. Mechanisms of ErbB receptor negative regulation and relevance in cancer. *Exp Cell Res.* 2009 Feb 15; 315(4):697-706. Epub 2008 Jul 31. Review.
 107. Fujita, N., Sato, S., Katayama, K. and Tsuruo, T. Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem* 2002, 277(32):28706-28713. Epub 2002 May 31.

108. Galetic I, Maira SM, Andjelkovic M, Hemmings BA. Negative regulation of ERK and Elk by protein kinase B modulates c-Fos transcription. *J Biol Chem*. 2003 Feb 14;278(7):4416-23. Epub 2002 Dec 4.
109. Gao, Q., Srinivasan, S., Boyer, S.N., Wazer, D.E. and Band, V. The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation. *Mol Cell Biol* 1999, 19(1):733-744.
110. Genther Williams SM, Disbrow GL, Schlegel R, Lee D, Threadgill DW, Lambert PF. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer Res*. 2005 Aug 1;65(15):6534-42.
111. Geoffrey Koh, Huey Fern Carol Teong, Marie-Veronique Clement David Hsu and P.S. Thiagarajan. A decompositional approach to parameter estimation in pathway modeling: a case study of the Akt and MAPK pathways and their crosstalk. *Bioinformatics* 2006; 22(14):e271–e280
112. Gill, D.K., Bible, J.M., Biswas, C., Kell, B., Best, J.M., Punchard, N.A. and Cason, J. Proliferative T-cell responses to human papillomavirus type 16 E5 are decreased amongst women with high-grade neoplasia. *J Gen Virol* 1998, 79 (Pt 8):1971-1976.
113. Gissmann, L., Wolnik, L., Ikenberg, H., Koldovsky, U., Schnurch, H.G. and zur Hausen, H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, 80(2):560-563.
114. Giuliano, A. Cervical carcinogenesis: the role of co-factors and generation of reactive oxygen species. *Salud Publica Mex*. 2003, 45 Suppl 3:S354-S360.
115. Goldstein, D.J., Kulke, R., Dimaio, D. and Schlegel, R. A glutamine residue in the membrane-associating domain of the bovine papillomavirus type 1 E5 oncoprotein mediates its binding to a transmembrane component of the vacuolar H(+)-ATPase. *J Virol* 1992, 66(1):405-413.
116. Goldstone, S.E., Winkler, B., Ufford, L.J., Alt, E. and Palefsky, J.M. High prevalence of anal squamous intraepithelial lesions and squamous-cell carcinoma in men who have sex with men as seen in a surgical practice. *Dis Colon Rectum* 2001, 44(5):690-698.
117. González Martín A. Molecular biology of cervical cancer. *Clin Transl Oncol*. 2007 Jun;9(6):347-54. Review.
118. Grant, S., Qiao, L. and Dent, P. Roles of ERBB family receptor tyrosine kinases, and downstream signaling pathways, in the control of cell growth and survival. *Frontiers in Bioscience* 2002, 7:d376–d389.
119. Grunstein, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997, 389:349–352.
120. Grunwald, V. and Hidalgo, M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2003, 95:851–867.
121. Gryfe, R., Swallow, C., Bapat, B., Redston, M., Gallinger, S., Couture, J., 1997. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr. Prob. Cancer* 21, 233-300.
122. Gstaiger, M., Jordan, R., Lim, M., Catzavelos, C., Mestan, J., Slingerland, J. and Krek, W. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98(9):5043-5048. Epub 2001 Apr 17.
123. Gu, Z. and Matlashewski, G. Effect of human papillomavirus type 16 oncogenes on MAP kinase activity. *J Virol* 1995, 69(12):8051-8056.
124. Gu, Y., Turck, C.W. and Morgan, D.O. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 1993, 366:707-710.
125. Guan KL, Figueroa C, Brtva TR, Zhu T, Taylor J, Barber TD, et al. Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *J Biol Chem* 2000; 275:27354-9.
126. Guan, K.L., Jenkins, C.W., Li, Y., Nichlos, M.A., Wu, X., O'Keefe, C.L., Matera, A.G. and Xiong, Y. Growth suppression by p18, a p16^{INK4/MTS1}- and p14^{INK4B/MTS2}-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 1994, 8:2939-2952.
127. Gupta S, Ramjaun AR, Haiko P, Wang Y, Warne PH, Nicke B, Nye E, Stamp G, Alitalo K, Downward J. Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell*. 2007 Jun 1;129(5):957-68.
128. Hagensee, M.E., Yaegashi, N. and Galloway, D.A. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 1993, 67:315-322.
129. Halbert, C. L., Demers, G.W. and Galloway, D.A. The E7 gene of human papillomavirus type 16

- is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol* 1991, 65:473–478.
130. Halbert CL, Galloway DA. *J Virol*. 1988 Mar;62(3):1071-5. Identification of the E5 open reading frame of human papillomavirus type 16.
 131. Hannon, G.J. and Beach, D. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature* 1994, 371:257-261.
 132. Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer*. 2004 Dec;11(4):689-708. Review.
 133. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin dependent kinases. *Cell* 1993, 75:805-816.
 134. Harvey, J.J., 1964. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature* 204, 1104–1105.
 135. Heck, D. V., Yee, C.L., Howley, P.M. and Munger, K. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:4442–4446.
 136. Hengst L, Dulic V, Slingerland JM, Lees E, Reed SI. A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 7; 91(12):5291-5.
 137. Hengst, L. and Reed, S.I. Translational control of p27^{Kip1} accumulation during the cell cycle. *Science* 1996, 271:1861-1864.
 138. Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y. & Mills, G. B. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature Rev. Drug Discov*. 4, 988–1004 (2005).
 139. Herbst, R.S. Targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Oncology* 2002, 16:19–24.
 140. Hershko, D., Bornstein, G., Ben-Izhak, O., Carrano, A., Pagano, M., Krausz, M.M. and Hershko, A. Inverse relation between levels of p27(Kip1) and of its ubiquitin ligase subunit Skp2 in colorectal carcinomas. *Cancer* 2001, 91(9):1745-1751.
 141. Hirai, H., Roussel, M.F., Kato, J., Ashmun, R.A. and Sherr, C.J. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 1995, 15:2672-2681.
 142. Hirama, T. and Koeffler, H.P. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 1995, 86(3):841-854.
 143. Ho, G.Y., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C.J. and Burk, R.D. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998, 338(7):423-428.
 144. Ho, G.Y., Burk, R.D., Klein, S., Kadish, A.S., Chang, C.J., Palan, P., Basu, J., Tachezy, R., Lewis, R. and Romney, S. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87(18):1365-1371.
 145. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*. 2009 Feb 20; 384(2):324-34. Epub 2008 Dec 10. Review.
 146. Howley, P.M. Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res* 1991, 51(18 Suppl):5019s-5022s.
 147. Huang, P.S., Patrick, D.R., Edwards, G., Goodhart P.J., Huber, H.E, Miles, L., Garsky, V.M., Oliff, A. and Heimbrook, D.C. Protein domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. *Mol Cell Biol* 1993, 13:953–960.
 148. Hudson, J. B., Bedell, M. A., McCance, D.J. and Laiminis, L.A. Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J Virol* 1990, 64:519–526.
 149. Hurteau JA, Allison BM, Brutkiewicz SA, Goebel MG, Heilman DK, Bigsby RM, Harrington MA. Expression and subcellular localization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2001 Nov;83(2):292-8.
 150. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Human papillomaviruses Vol. 64, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 1995.
 151. Iost, I. and Dreyfus, M. mRNAs can be stabilized by DEAD-box proteins. *Nature* 1994, 372(6502):193-196.
 152. Jewers, R. J., Hildebrandt, P., Ludlow, J.W., Kell, B. and McCance, D.J. Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *J Virol* 1992, 66:1329–1335.

153. Johnston, D., Hall, H., DiLorenzo, T.P., Steinberg, B.M., 1999. Elevation of the epidermal growth factor receptor and dependent signaling in human papillomavirus-infected laryngeal papillomas. *Cancer Res.* 59, 968–974.
154. Kabsch K, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol.* 2002 Dec;76(23):12162-72.
155. Kabsch K, Mossadegh N, Kohl A, Komposch G, Schenkel J, Alonso A, Tomakidi P. The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in human keratinocyte raft cultures. *Intervirology.* 2004; 47(1):48-56.
156. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Jul; 9(7):517-31. Review.
157. Kato, J.Y., Matsuoka, M., Polyak, K., Massague, J. and Sherr, C.J. Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 1994, 79(3):487-496.
158. Kato, A., Takahashi, H., Takahashi, Y. and Matsushime, H. Inactivation of the cyclin D-dependent kinase in the rat fibroblast cell line, 3Y1, induced by contact inhibition. *J Biol Chem* 1997, 272:8065-8070.
159. Kawana, K., Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Kawana, T., Yoshiike, K. and Kanda, T. A surface immunodeterminant of human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2. *Virology* 1998, 245:353-359.
160. Kawana, H., Tamaru, J., Tanaka, T., Hirai, A., Saito, Y., Kitagawa, M., Mikata, A., Harigaya, K. and Kuriyama, T. Role of p27Kip1 and cyclin-dependent kinase 2 in the proliferation of non-small cell lung cancer. *Am J Pathol* 1998, 153(2):505-513.
161. Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. and Kanda T. Common neutralization epitope in minor capsid protein L2 of human papillomavirus types 16 and 6. *J Virol* 1999, 73:6188-6190.
162. Kawana, Y., Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. and Kanda T. Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J Virol* 2001, 75:2331-2336.
163. Kelly-Spratt KS, Philipp-Staheli J, Gurley KE, Hoon-Kim K, Knoblaugh S, Kemp CJ. Inhibition of PI-3K restores nuclear p27Kip1 expression in a mouse model of Kras-driven lung cancer. *Oncogene.* 2009 Oct 15;28(41):3652-62. Epub 2009 Aug 3.
164. Kersemaekers AM, Fleuren GJ, Kenter GG et al (1999) *Oncogene* alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 5:577–586.
165. Kim SH, Juhn YS, Kang S, Park SW, Sung MW, Bang YJ, Song YS. Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ ERK1,2 and PI3K/Akt. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Apr;63(7-8):930-8.
166. Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:12180-12184.
167. Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone, H., Roden, R., Durst, M., Gissmann, L., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 1993, 67:6929-6936.
168. Kirsten, W.H., Mayer, L.A., 1969. Malignant lymphomas of extrathymic origin induced in rats by murine erythroblastosis virus. *J. Natl Cancer Inst.* 43, 735–746.
169. Kreider, J.W., Howett, M.K., Leure-Dupree, A.E., Zaino, R.J. and Weber, J.A. Laboratory production in vivo of infectious human papillomavirus type 11. *J Virol* 1987, 61(2):590-593.
170. Kreider, J.W., Howett, M.K., Wolfe, S.A., Bartlett, G.L., Zaino, R.J., Sedlacek, T. and Mortel, R. Morphological transformation in vivo of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata. *Nature* 1985, 317(6038):639-641.
171. Kivi N, Greco D, Auvinen P, Auvinen E. Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene.* 2008 Apr 17; 27(18):2532-41. Epub 2007 Nov 5.
172. Koutsky, L.A., Holmes, K.K., Critchlow, C.W., Stevens, C.E., Paavonen, J., Beckmann, A.M.,

- DeRouen, T.A., Galloway, D.A., Vernon, D. and Kiviat, N.B. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992, 327(18):1272-1278.
173. Kudo, Y., Kitajima, S., Sato, S., Miyauchi, M., Ogawa, I. and Takata, T. High expression of S-phase kinase-interacting protein 2, human F-box protein, correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 2001, 61(19):7044-7047.
 174. Kuhne, C. and Banks, L. E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. *J Biol Chem* 1998, 273(51):34302-34309.
 175. Kukimoto, I., Aihara, S., Yoshiike, K. and Kanda, T. Human papillomavirus oncoprotein E6 binds to the C-terminal region of human minichromosome maintenance 7 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 249(1):258-262.
 176. Kyriakis JM, Avruch J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807–869.
 177. Latres, E., Chiarle, R., Schulman, B.A., Pavletich, N.P., Pellicer, A., Inghirami, G. and Pagano, M. Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98(5):2515-2520. Epub 2001 Feb 20.
 178. Lee, M.H., Reynisdottir, I. and Massague, J. Cloning of p57^{Kip2} a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 1995, 9:639-649.
 179. Leechanachai P, Banks L, Moreau F, Matlashewski G. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene* 1992 Jan; 7(1):19-25.
 180. Lehn, H., Villa, L.L., Marziona, F., Hilgarth, M., Hillemans, H.G. and Sauer, G. Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. *J Gen Virol* 1988, 69 (Pt 1):187-196.
 181. Lehoux M, D'Abramo CM, Archambault J. Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Public Health Genomics*. 2009; 12(5-6):268-80. Epub 2009 Aug 11. Review.
 182. Leptak, C., Ramon, Y., Cajal, S., Kulke, R., Horwitz, B.H., Riese II, D.J., Dotto, G.P. and diMaio. Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 gene of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. *J Virol* 1991, 65:7078-7083.
 183. Leykauf K, Salek M, Schlüter H, Lehmann WD, Alonso A. Identification of membrane proteins differentially expressed in human papillomavirus type 16 E5-transfected human keratinocytes by nanoelectrospray ionization mass spectrometry. *J Gen Virol*. 2004 Jun; 85(Pt 6):1427-31.
 184. Lewis C, Baro MF, Marques M, Grüner M, Alonso A, Bravo IG. The first hydrophobic region of the HPV16 E5 protein determines protein cellular location and facilitates anchorage-independent growth. *Virol J*. 2008 Feb 26; 5:30.
 185. Li, S., Couvillon, A.D., Brasher, B.B., Van Etten, R.A., 2001. Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling. *EMBO J*. 20, 6793-6804.
 186. Liu, Y., Chen, J.J., Gao, Q., Dalal, S., Hong, Y., Mansur, C.P., Band, V. and Androphy, E.J. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *J Virol* 1999, 73(9):7297-7307.
 187. Liu, W. J., Gissmann, L., Sun, X.Y., Kanjanahaluethai, A., Muller, M., Doorbar J. and Zhou, J. Sequence close to the N terminus of L2 protein is displayed on the surface of bovine papillomavirus type 1 virions. *Virology* 1997, 227:474-483.
 188. Loda, M., Cukor, B., Tam, S.W., Lavin, P., Fiorentino, M., Draetta, G.F., Jessup, J.M. and Pagano, M. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 1997, 3(2):231-234.
 189. Longva KE, Blystad FD, Stang E, Larsen AM, Johannessen LE, Madshus IH. Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J Cell Biol*. 2002 Mar 4; 156(5):843-54. Epub 2002 Feb 25.
 190. Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest*. 2006 May; 116(5):1167-73. Review.
 191. Lowy, D.R., Willumsen, B.M., 1993. Function and regulation of ras. *Ann. Rev. Biochem.* 62, 851–891.
 192. Lu, Z., Hu, X., Li, Y., Zheng, L., Zhou, Y., Jiang, H., Ning, T., Basang, Z., Zhang, C. and Ke, Y.

- Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein interferences with insulin signaling pathway by binding to tuberlin. *J Biol Chem* 2004, 20;279(34):35664-35670.
193. McKay MM, and Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3113-21. Review.
 194. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*. 2009 Feb 20; 384(2):335-44. Epub 2008 Nov 12. Review.
 195. Madshus IH, Stang E. Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *J Cell Sci*. 2009 Oct 1;122(Pt 19):3433-9.
 196. Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J.P., Troalen, F., Trouche, D. and Harel-Bellan, A. Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* 1998, 391:601–605.
 197. Mallon, R. G., Wojciechowicz, D. and Defendi, V. DNA-binding activity of papillomavirus proteins. *J Virol* 1987, 61:1655-1660.
 198. Mantovani, F. and Banks, L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001, 20(54):7874-7887.
 199. Martin, P., Vass, W.C., Schiller, J.T., Lowy, D.R., Velu, T.J., 1989. The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1 receptors. *Cell* 59, 21-32.
 200. Masuda, T.A., Inoue, H., Sonoda, H., Mine, S., Yoshikawa, Y., Nakayama, K., Nakayama, K. and Mori, M. Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis. *Cancer Res* 2002, 62(13):3819-3825.
 201. Mathur SP, Mathur RS, Young RC (2000) Cervical epidermal growth factor-receptor (EGF-R) and serum insulin-like growth factor II (IGF-II) levels are potential markers for cervical cancer. *Am J Reprod Immunol* 44:222–230.
 202. Matsukura, T., Koi, S. and Sugase, M. Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers. *Virology*. 1989, 172(1):63-72.
 203. Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W. and Elledge, S.J. p57^{Kip2} a structurally distinct member of the p21^{Cip1} Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 1995, 9:650-662.
 204. Maufort, J.P., Genter Williams, S.M., Pitot, H.C., Lambert, P.F., 2007. Human papillomavirus 16 E5 oncogene contributes to two stages of skin carcinogenesis. *Cancer Res*. 67, 6106-6112.
 205. Mebratu Y, Tesfaigzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle*. 2009 Apr 15;8(8):1168-75. Epub 2009 Apr 11. Review.
 206. Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cellcycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 2000; 404:782–787.
 207. Mendelsohn, J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocrine-Related Cancer* 2001, 8:3–9.
 208. Mendelsohn, J. and Baselga, J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2003, 21:2787–2799.
 209. Meyers, C., Frattini, M.G., Hudson, J.B. and Laimins, L.A. Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science* 1992, 257(5072):971-973.
 210. Milligan SG, Veerapraditsin T, Ahamet B, Mole S, Graham SV. Analysis of novel human papillomavirus type 16 late mRNAs in differentiated W12 cervical epithelial cells. *Virology*. 2007 Mar 30;360(1):172-81. Epub 2006 Nov 13.
 211. Mizrachy-Schwartz S, Kravchenko-Balasha N, Ben-Bassat H, Klein S, Levitzki A. Optimization of energy-consuming pathways towards rapid growth in HPV-transformed cells. *PLoS One*. 2007 Jul 11;2(7):e628.
 212. Moeller, S.J., Head, E.D. and Sheaff, R.J. p27^{Kip1} inhibition of GRB2-SOS formation can regulate Ras activation. *Mol. Cell. Biol*. 2003, 23(11):3735-3752.
 213. Moelling, K., Schad, K., Bosse, M., Zimmermann, S. and Schweneker, M. (2002) Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *J Biol Chem*, 277(34), 31099–31106.
 214. Morgan, D.O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997, 13:261-291.
 215. Mori, M., Mimori, K., Shiraishi, T., Tanaka, S., Ueo, H., Sugimachi, K. and Akiyoshi, T. p27

- expression and gastric carcinoma. *Nat Med.* 1997 Jun; 3(6): 593.
216. Munger, K., Werness, B.A., Dyson, N., Phelps, W.C., Harlow, E. and Howley P.M. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 1989, 8:4099–4105.
 217. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med* 2003;348:518–527.
 218. Muraoka RS, Lenferink AE, Law B, Hamilton E, Brantley DM, Roebuck LR, Arteaga CL. ErbB2/Neu-induced, cyclin D1-dependent transformation is accelerated in p27-haploinsufficient mammary epithelial cells but impaired in p27-null cells. *Mol Cell Biol.* 2002 Apr;22(7):2204-19.
 219. Nakagawa, S. and Huibregtse, J.M. Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol* 2000, 20(21):8244-8253.
 220. Nasserli, M., Hirochika, R., Broker, T.R. and Chow, L.T. A human papilloma virus type 11 transcript encoding an E1--E4 protein. *Virology* 1987, 159(2):433-439.
 221. Nath, R., Mant, C.A., Kell, B., Cason, J., Bible, J.M., 2006. Analyses of variant human papillomavirus type-16 E5 proteins for their ability to induce mitogenesis of murine fibroblasts. *Cancer Cell Int.* 6, 19-27.
 222. National Cancer Institute Workshop: The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *JAMA.* 1989; 262:931-934.
 223. Nguyen, D.X., Westbrook, T.F. and McCance, D.J. Human papillomavirus type 16 E7 maintains elevated levels of the cdc25A tyrosine phosphatase during deregulation of cell cycle arrest. *J Virol* 2002, 76(2):619-632.
 224. Nicholson, R.I., Gee, J.M. and Harper, M.E. EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer* 2001, 37 (Suppl 4) S9–S15.
 225. Oelze, I., Kartenbeck, J., Crusius, K. and Alonso, A. Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in a epithelial cell line. *J Virol* 1995, 69(7):4489-4494.
 226. Oetke, C., Auvinen, E., Pawlita, M. and Alonso, A. Human papillomavirus type 16 E5 protein localizes to the Golgi apparatus but does not grossly affect cellular glycosylation. *Arch. of Virol* 2000, 145:2183-2191.
 227. Ogiso, Y., Gutierrez, L., Wrathall, L.S., Lu, Y.Y., Blair, D.G., Clanton, D.J., Hwang, Y.W., Shih, T.Y., 1990. Transdominant suppressor mutations of the H-ras oncogene. *Cell Growth Diff.* 1, 217-224.
 228. Oh JM, Kim SH, Lee YI, Seo M, Kim SY, Song YS, Kim WH, Juhnn YS. Human papillomavirus E5 protein induces expression of the EP4 subtype of prostaglandin E2 receptor in cyclic AMP response element-dependent pathways in cervical cancer cells. *Carcinogenesis.* 2009 Jan; 30(1):141-9. Epub 2008 Oct 9.
 229. Orend, G., Hunter, T. and Ruoslahti, E. Cytoplasmic displacement of cyclin E-cdk2 inhibitors p21Cip1 and p27Kip1 in anchorage-independent cells. *Oncogene* 1998, 16(20):2575-2583.
 230. Pagano, M., Tam, S., Theodoras, S., Beer, P., Delsal, S., Chau, I. et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995, 269:682-685.
 231. Palefsky, J.M. and Holly, E.A. Molecular virology and epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995, 4(4):415-428.
 232. Patel, D., Huang, S.M., Baglia, L.A. and McCance, D.J. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J* 1999, 18(18):5061-5072.
 233. Pater, M.M. and Pater, A. Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology* 1985, 145(2):313-318.
 234. Patrick, D.R., Oliff, A. and Heimbrook, D.C. Identification of a novel retinoblastoma gene product binding site on human papillomavirus type 16 E7 protein. *J Biol Chem* 1994, 269:6842–6850.
 235. Paulovich, A.G., Toczyski, D.P. and Hartwell, L.H. When checkpoints fail. *Cell* 1997, 88(3):315-321.
 236. Pause, A. and Sonenberg, N. Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J* 1992, 11(7):2643-2654.
 237. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K et al. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr*

Rev 22: 153–183.

238. Pedroza-Saavedra A, Lam EW, Esquivel-Guadarrama F, Gutierrez-Xicotencatl L. The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein synergizes with EGF-receptor signaling to enhance cell cycle progression and the down-regulation of p27(Kip1). *Virology* 2010, 400(1): 44-52. Feb 6. [Epub ahead of print].
239. Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol.* 2007 Aug;212(4):356-67. Review.
240. Phelps, W.C., Munger, K., Yee, C.L., Barnes, J.A. and Howley, P.M. Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol* 1992, 66:2418–2427.
241. Pim, D., Collins, M. & Banks, L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 1992,7:27-32.
242. Pirami, L., Giache, V. and Becciolini, A. Analysis of HPV16, 18, 31, and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 1997, 50(7):600-604.
243. Piva, R., Cancelli, I., Cavalla, P., Bortolotto, S., Dominguez, J., Draetta, G.F. and Schiffer, D. Proteasome-dependent degradation of p27/kip1 in gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999, 58(7):691-696.
244. Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempest and Massague, J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994a, 78(1):59-66.
245. Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M. and Koff, A. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 1994b Jan;8(1):9-22.
246. Ponce-Castaneda, M.V., Lee, M.H., Latres, E., Polyak, K., Lacombe, L., Montgomery, K., Mathew, S., Krauter, K., Sheinfeld, J., Massague, J. et al. p27Kip1: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res* 1995, 55(6):1211-1214.
247. Qu, C.K. Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002, 1592: 297–301.
248. Raj, K., Berguerand, S., Southern, S., Doorbar, J. and Beard, P. E1⁺E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. *J Virol* 2004, 78(13):7199-7207.
249. Reed, J.A., Loganzo, F. Jr, Shea, C.R., Walker, G.J., Flores, J.F., Glendening, J.M., Bogdany, J.K., Shiel, M.J., Haluska, F.G., Fountain, J.W. et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* 1995, 55(13):2713-2718.
250. Reynisdottir, I., Poliak, K., Iavarone, A. and Massague, J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF. *Genes Dev* 1995, 9:1831-1845.
251. Rodriguez, M.I., Finbow, M.E., Alonso, A., 2000. Binding of human papillomavirus 16 E5 to the 16 kDa subunit c (proteolipid) of the vacuolar H⁺-ATPase can be dissociated from the E5-mediated epidermal growth factor receptor overactivation. *Oncogene* 19, 3727-3732.
252. Ronco, L.V., Karpova, A.Y., Vidal, M. and Howley, P.M. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* 1998, 12(13):2061-2072.
253. Rose, R.C., Bonne, W., Reichman, R.C. and Garcea, R.L.. Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of viruslike particles. *J Virol* 1993, 67:1936-1944.
254. Ruta, M., Wolford, R., Dhar, R., Defeo-Jones, D., Ellis, R.W., Scolnick, E.M., 1986. Nucleotide sequence of the two rat cellular rasH genes. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1706–1710.
255. Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F. and Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 1995, 19:183–232.
256. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second Edition, 1989.
257. Sasagawa, T., Pushko, P., Steers, G., Gschmeissner, S.E., Hajibagheri, M.A., Finch, J., Crawford, L. and Tommasino, M. Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology* 1995, 206:126-135.
258. Schaeffer HJ, Weber MJ. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from

- ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19: 2435–2444.
259. Schiffman, M.H. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1992, 84(6):394-398.
260. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Jun 16;85(12):958-64.
261. Schlecht, N.F., Kulaga, S., Robitaille, J., Ferreira, S., Santos, M., Miyamura, R.A., Duarte-Franco, E., Rohan, T.E., Ferenczy, A., Villa, L.L. and Franco, E.L. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 2001, 286(24):3106-3114.
262. Schwartz, R.H., 1997. T cell clonal anergy. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 351–357.
263. Schwarz, E., Freese, U.K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. and zur Hausen, H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985, 314(6006):111-114.
264. Seedorf, K., Krammer, G., Dürst, M., Suhai, S. and Röwekamp, W.G. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* 1985, 145:181-185.
265. Senderowicz, A.M. Small-molecule cyclin-dependent kinase modulators. *Oncogene* 2003, 22(42):6609-6620.
266. Serrano, M., Hannon, G.J. and Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993, 366:704-707.
267. Signoretti, S., Di Marcotullio, L., Richardson, A., Ramaswamy, S., Isaac, B., Rue, M., Monti, F., Loda, M. and Pagano, M. Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer. *J Clin Invest* 2002, 110(5):633-641.
268. Singh, S.P., Lipman, J., Goldman, H., Ellis, F.H. Jr, Aizenman, L., Cangi, M.G., Signoretti, S., Chiari, D.S., Pagano, M. and Loda, M. Loss or altered subcellular localization of p27 in Barrett's associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998, 58(8):1730-1735.
269. Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol.* 1999 May; 73(2):223-8.
270. Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol.* 2005 Mar;32 Suppl 1:S25-33. Review.
271. Stoler, M.H., Rhodes, C.R., Whitbeck, A., Wolinsky, S.M., Chow, L.T. and Broker, T.R. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol* 1992, 23(2):117-128.
272. Stoppler, M.C., Straight, S.W., Tsao, G., Schlegel, R. and McCance, D.J. The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology* 1996, 223(1):251-254.
273. Straight, S.M., Hinkle, P.M., Jewers, R.J., McCance, D.J., 1993. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and affects the down-regulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J. Virol.* 67, 4521-4532.
274. Straight, S.W., Herman, B., McCance, D.J., 1995. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J. Virol.* 69, 3185-3192.
275. Supryniewicz, F.A., Disbrow, G.L., Krawczyk, E., Simic, V., Lantzky, K., Schlegel, R. HPV-16 E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells. *Oncogene* 2008, 27, 1071-1078.
276. Swanson, C., Ross, J., Jackson, P.K., 2000. Nuclear accumulation of cyclin E/Cdk2 triggers a concentration-dependent switch for the destruction of p27^{Xic1}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7796-7801.
277. Swat A, Dolado I, Rojas JM, Nebreda AR. Cell density-dependent inhibition of epidermal growth factor receptor signaling by p38 α mitogen-activated protein kinase via Sprouty2 downregulation. *Mol Cell Biol.* 2009 Jun;29(12):3332-43. Epub 2009 Apr 13.
278. Taichman, L.B. and LaPorta, R. The expression of Papillomaviruses in Epithelial Cells, 1986, pp. 109-139. New York, Plenum.
279. Takami, K., Yana, I., Kurahashi, H., Nishisho, I., 1995. Multistep carcinogenesis in colorectal cancers. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 26, 190-196.

280. Takuwa, N. and Takuwa, Y. Ras activity late in G1 phase required for p27^{Kip1} downregulation, passage through the restriction point, and entry into S phase in growth factor stimulated NIH3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1997, 17(9):5348-5358.
281. Taylor, E.R., Dornan, E.S., Poner, W., Connolly, J.A., Mcnair, Sh., Kannouche, P., Lehmann, A.R. and Morgan, I.M. The fidelity of HPV16 E1/E2-mediated DNA replication. *J Biol Chem* 2003, 278(52):52223-52230.
282. Tomakidi P, Cheng H, Kohl A, Komposch G, Alonso A. Modulation of the epidermal growth factor receptor by the human papillomavirus type 16 E5 protein in raft cultures of human keratinocytes. *Eur J Cell Biol.* 2000 Jun;79(6):407-12.
283. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
284. Toyoda, H., Komurasaki, T., Uchida, D. and Morimoto, S. Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. *Biochemical Journal* 1997, 326:69–75.
285. Toyoshima, H. and Hunter, T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994, 78(1):67-74.
286. Trus, B. L., Roden, R.B., Greenstone, H.L., Vrhel, M., Schiller, J.T. and Booy, F.P. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nat Struct Biol* 1997, 4:413-420.
287. Tsai, T.C. and Chen, S.L. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol* 2003, 148(8):1445-1453.
288. Tsao, Y.P., Li, L.Y., Tsai, T.C. and Chen, S.L. Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21^{Waf1/Cip1} gene expression in fibroblasts and keratinocytes. *J Virol* 1996, 70(11):7535-7539.
289. Ullman, C.G., Haris, P.I., Kell, B., Cason, J., Jewers, R.J., Best, J.M., Emery, V.C. and Perkins, S.J. Hypothetical structure of the membrane-associated E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *Biochem Soc Trans* 1994, 22(4):439S.
290. Ungermannova, D, Gao, Y., Liu, X., 2005. Ubiquitination of p27Kip1 requires physical interaction with cyclin E and probable phosphate recognition by SKP2. *J. Biol. Chem.* 280, 30301-30309.
291. Valle, G.F. and Banks, L. The human papillomavirus (HPV)-6 and HPV-16 E5 proteins cooperate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells. *J Gen Virol* 1995, 76 (Pt 5):1239-1245.
292. Velu T.J., Beguinot L., Vass W.C., Zhang K., Pastan I. and Lowy D.R. Retroviruses expressing different levels of the normal epidermal growth factor receptor. *J Cell Biochem* 1989, 39:153- 166.
293. Vervoorts J, Lüscher B. Post-translational regulation of the tumor suppressor p27(KIP1). *Cell Mol Life Sci.* 2008 Oct;65(20):3255-64. Review.
294. Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science.* 2001 Nov 9;294(5545):1299-304. Review.
295. Vivanco, I. and Sawyers, C. L. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Rev. Cancer* 2, 489–501 (2002).
296. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem.* 1994 Feb 18;269(7):5241-8.
297. Watanabe, T., Shintani, A., Nakata, M., Shing, Y., Folkman, J., Igarashi, K. and Sasada, R. Recombinant human betacellulin. Molecular structure, biological activities, and receptor interaction. *Journal of Biological Chemistry* 1994, 269:9966–9973.
298. Wells, A. EGF receptor. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 1999, 31:637–643.
299. Werness, B.A., Levine, A.J. and Howley, P.M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990, 248(4951):76-79.
300. Whiteside MA, Siegel EM, Unger ER. Human papillomavirus and molecular considerations for cancer risk. *Cancer.* 2008 Nov 15; 113(10 Suppl):2981-94. Review.
301. WHO-Mexico. World Health Organization. HPV Information Center. Human Papillomavirus and Related Cancers. Summary Report Update (Mexico). January 29,2010.

http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/country_pdf/MEX.pdf?CFID=3446067&CFTOKEN=63571647

302. WHO-World. World Health Organization. HPV Information Center. Human Papillomavirus and Related Cancers. Summary Report Update (World). Jan 29,2010. http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/country_pdf/XWX.pdf?CFID=3446067&CFTOKEN=63571647
303. Wiley HS. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res.* 2003 Mar 10; 284(1):78-88. Review.
304. Wirbelauer, C., Sutterluty, H., Blondel, M., Gstaiger, M., Peter, M., Reymond, F., Krek, W. The F-box protein Skp2 is a ubiquitylation target of a Cul1-based core ubiquitin ligase complex: evidence for a role of Cul1 in the suppression of Skp2 expression in quiescent fibroblasts. *EMBO J* 2000, 19(20):5362-5375.
305. Woodburn, J.R. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics* 1999, 82:241–250.
306. Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993, 366(6456):701-704.
307. Yanagisawa, K., Kosaka, A., Iwahana, H., Nakamishi, M. and Taminaga, Sh. Opposite regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors during contact inhibition. *J Biochem* 1999, 125:36-40.
308. Yang JY, Hung MC. A new fork for clinical application: targeting forkhead transcription factors in cancer. *Clin Cancer Res.* 2009 Feb 1; 15(3):752-7. Review.
309. Yang DH, Wildeman AG, Sharom FJ. Overexpression, purification, and structural analysis of the hydrophobic E5 protein from human papillomavirus type 16. *Protein Expr Purif.* 2003 Jul;30(1):1-10.
310. Yarden, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer* 2001, 37 (Suppl 4) S3–S8.
311. Yokoi, S., Yasui, K., Saito-Ohara, F., Koshikawa, K., Iizasa, T., Fujisawa, T., Terasaki, T., Horii, A., Takahashi, T., Hirohashi, S. and Inazawa, J. A novel target gene, SKP2, within the 5p13 amplicon that is frequently detected in small cell lung cancers. *Am J Pathol* 2002, 161(1):207-216.
312. Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol.* 2009 Mar;19(2):97-113. Review.
313. Takashi Yugawa and Tohru Kiyono. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev. Med. Virol.* 2009; 19: 97–113.
314. Zarubin T, Han J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15: 11–18.
315. Zhang, K., Sun, J., Liu, N., Wen, D., Chang, D., Thomason, A. and Yoshinaga, S.K. Transformation of NIH 3T3 cells by HER3 or HER4 receptors requires the presence of HER1 or HER2. *J Biol Chem* 1996, 271(7):3884-3890.
316. Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H.P., Lane, W.S. and Reinberg, D. The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* 1998, 95:279–289.
317. Zhang B, Spandau DF, Roman A. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *J Virol.* 2002 Jan; 76(1):220-31.
318. Zhang B, Srirangam A, Potter DA, Roman A. HPV16 E5 protein disrupts the c-Cbl-EGFR interaction and EGFR ubiquitination in human foreskin keratinocytes. *Oncogene* 2005; 24:2585-2588.
319. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006 Sep 1; 11:2286-302. Review.
320. Zhou, J., Sun, X. Y., Louis, K. and Frazer, I. H. Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J Virol* 1994, 68:619-625.
321. Zhou, J., Sun X.Y., Stenzel, D.J. and Frazer, I.H.. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* 1991, 185:251-257.

322. Zhu, X.F., Liu, Z.C., Xie, B.F., Li, Z.M., Feng, G.K., Yang, D., Zeng, Y.X., 2001. EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 inhibits cell proliferation and arrests cell cycle in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett.* 169, 27-32.
323. Zimmermann, H., Degenkolbe, R., Bernard, H.U. and O'Connor, M.J. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol* 1999, 73(8):6209-6219.
324. zur Hausen, H. Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians* 1999, 111:581-587.
325. zur Hausen, H., and de Villiers, E.M. Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* 1994, 48:427-447.
326. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002 May; 2(5):342-50. Review.

XII. ANEXO I

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

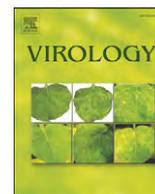
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yviro

The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein synergizes with EGF-receptor signaling to enhance cell cycle progression and the down-regulation of p27^{Kip1}

Adolfo Pedroza-Saavedra^a, Eric W-F Lam^b,
Fernando Esquivel-Guadarrama^c, Lourdes Gutierrez-Xicotencatl^{a,*}

^a Center for Research on Infectious Diseases, National Institute of Public Health, Cuernavaca, Morelos 62100, Mexico

^b Department of Oncology, Cancer Research UK Laboratories, MRC Cyclotron Building, Imperial College of London, Hammersmith Hospital, London W12 0NN, UK

^c School of Medicine, Autonomous University of Morelos State, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 August 2009

Returned to author for revision

16 September 2009

Accepted 7 January 2010

Available online 7 February 2010

Keywords:

HPV-16

E5 oncoprotein

High-risk papillomaviruses

p27^{Kip1}

Cell cycle regulation

EGF-receptor

ABSTRACT

E5 oncoprotein activity from high risk human papillomaviruses (HPVs) is associated with growth factor receptor signaling, but the function of this protein is not well understood. In this study, we investigated the role of HPV-16 E5 on the cell cycle progression during EGF-stimulation. Wild-type and NIH 3T3 cells over-expressing human EGF-receptor were transfected with HPV-16 E5 gene and the cell cycle progression was characterized. This analysis showed that the E5-expressing cells increased DNA synthesis (S-phase) by around 40%. Cell cycle protein analysis of E5-expressing cells showed a reduction in the half-life of p27^{Kip1} protein as compared to control cells (18.4 vs. 12.7 h), an effect that was enhanced in EGF-stimulated cells (12.8 vs. 3.6 h). Blockage of EGF-receptor activity abrogated E5 signals as well as p27^{Kip1} down-regulation. These results suggest that E5 and the EGF-receptor cooperate to enhance cell cycle entry and progression through regulating p27^{Kip1} expression at protein level.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

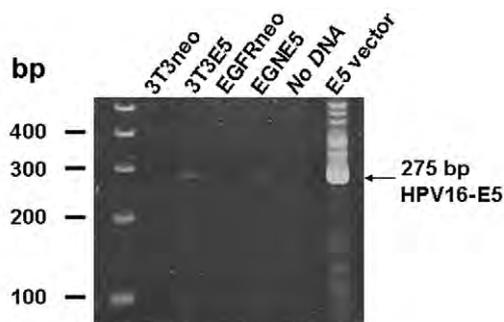
Introduction

Mammalian cell proliferation is controlled by extra-cellular growth factors that initiate a cascade of events, ultimately leading to cell growth, division and proliferation. Progression through the cell cycle is regulated by a series of cyclin-dependent protein kinases (CDKs) and the association of CDKs with cyclins is required for their activation. In addition to positive regulation by cyclins, CDK activity is also negatively controlled through association with CDK inhibitors (CKIs) to block the cell cycle progression (Besson et al., 2008; Morgan, 1995; Sherr and Roberts, 1995; Sherr and Roberts, 1999). The mammalian CKIs fall into two families. The first family, denominated Ink4 (Cánepa et al., 2007), includes p16^{Ink4A} (Serrano et al., 1993), p15^{Ink4B} (Hannon and Beach, 1994), p18^{Ink4C} (Guan et al., 1994; Hirai et al., 1995), and p19^{Ink4D} (Chan et al., 1995; Hirai et al., 1995), that specifically inhibit CDK4 and CDK6. The second family includes p21^{Cip1} (Abbas and Dutta, 2009; El-Deiry et al., 1993; Gu et al., 1993; Harper et al., 1993), p27^{Kip1} (Borriello et al., 2007; Hengst and Reed, 1996; Polyak et al., 1994b; Vervoorts and Lüscher, 2008) and p57^{Kip2} (Lee et al., 1995; Matsuoka et al., 1995), that interact and inhibit a broad range of CDKs. One of the most abundant CKIs is p27^{Kip1} which

is expressed at high levels in quiescent cells (Hengst and Reed, 1996; Hitomi et al., 2006), in cells arrested in G1 by cell–cell contact inhibition (Kato et al., 1997; Yanagisawa et al., 1999), in the presence of transforming growth factor beta (TGF-β) (Polyak et al., 1994a; Reynisdottir et al., 1995), or cyclic AMP (Kato et al., 1994). Conversely, some growth factor signals such as IL-2 and epidermal growth factor (EGF) appear to stimulate cell proliferation in part through degradation of p27^{Kip1} (Nourse et al., 1994; Takuwa and Takuwa, 1997). Recently, it has been proposed that p27^{Kip1} protein works in a negative feedback loop regulating Grb2 in response to mitogen stimulation, inhibiting the Ras signal transduction pathway (Moeller et al., 2003). Other reports have shown that low levels of p27^{Kip1} protein correlate with tumor progression and poor patient survival in many human cancers (Abukhdeir and Park 2008; Bahnassy et al., 2007; Catzavelos et al., 1997; Mori et al., 1997).

On the other hand, during cancer development, it has been observed that viral oncoproteins from papillomavirus, adenovirus or SV40, target cell cycle proteins and manipulate the cell towards the transformed phenotype. In the case of HPV, the main etiological agent for cervical cancer, the E6 and E7 are the main viral oncoproteins (Muñoz et al., 1994; Wise-Draper and Wells, 2008; zur Hausen, 1996). The E7 oncoprotein binds to and inactivates the cellular tumor suppressor retinoblastoma protein pRb and related proteins (Berezutskaya et al., 1997; Dyson et al., 1992). Meanwhile, E6 promotes the degradation of the cellular tumor suppressor p53 through the association of E6-AP by the ubiquitin proteolytic pathway (Hubbert

* Corresponding author. Department of Virus and Cancer Center for Research on Infectious Diseases National Institute of Public Health Av. Universidad No. 655, Col. Santa María Ahuacatitlan Cuernavaca, Morelos, Mexico, CP 62100. Fax: +77 73 17 54 85.
E-mail address: mlxico@correo.insp.mx (L. Gutierrez-Xicotencatl).



Cell line produced	Parental cell line	Plasmid	E5	EGF receptor
3T3neo	NIH-3T3	pcDNA	---	---
3T3E5		pcDNAE5	+	---
EGFRneo	EGFR	pcDNA	---	++
EGNE5		pcDNAE5	+	++

Fig. 1. Expression of HPV-16 E5 transcripts in transfected cells. RT-PCR reactions were carried out to amplify the E5 specific fragment of 275 bp as described in Materials and methods. The pcDNAE5 plasmid was used as positive control. DNA molecular weight markers are in base pairs (bp). The characteristics of the different transfected cell lines are shown in the table.

et al., 1992; Huijbregtse et al., 1991; Scheffner et al., 1993; Tungteakkhun and Duerksen-Hughes, 2008; Werness et al., 1990).

Recently, the E5 gene from HPV-16 was identified as another potential oncogene (Bouvard et al., 1994; Genther Williams et al., 2005; Leptak et al., 1991; Maufort et al., 2007; Pim et al., 1992). The E5 protein is highly hydrophobic and it is associated with cell membranes (Conrad et al., 1993; Lewis et al., 2008; Oetke et al., 2000; Suprynowicz et al., 2008). A number of reports have demonstrated that E5 increases the half-life of EGF-receptor (Genther Williams et al., 2005; Martin et al., 1989; Rodriguez et al., 2000; Straight et al., 1993, 1995; Tomakidi et al., 2000), possibly by interacting with the 16 kDa subunit of the H⁺-ATPase and then inhibiting the acidification of endosomes (Briggs et al., 2001; Conrad et al., 1993; Di Domenico et al., 2009; Straight et al., 1995). In contrast, results from other studies indicate that HPV-16 E5 protein binds to, but does not disturb the activity of the vacuolar H⁺-ATPase (Adam et al., 2000; Ashby et al., 2001; Rodriguez et al., 2000), suggesting that E5 exerts its function through another mechanism (Kivi et al., 2008). Moreover, E5 also affects the activity of other members of the EGF-receptor family like ErbB2 (Crusius et al., 1998) or ErbB4 (isoform JM-b/cyt-1) (Chen et al., 2007) and components of the EGF signaling pathway, like MAPKs (ERK1 and ERK2) (Crusius et al., 1997; Gu and Matlashewski, 1995; Kim et al., 2006; Zhang et al., 2002). It was also reported that E5 favors the over-expression of transcriptional factors

involved in cell growth such as c-Fos and c-Jun that form the AP-1 complex (Chen et al., 1995, 1996a, 1996b). However, c-jun antisense DNA treatment can only partially suppress the transforming function of HPV-11 E5, suggesting the existence of other mechanisms for E5-mediated cell transformation (Chen et al., 1994; Kivi et al., 2008). In this sense, it has been demonstrated that E5 proteins from HPV-11 and -16 repress p21^{Waf1} gene expression in fibroblasts and keratinocytes promoting cell proliferation (Nath et al., 2006; Tsao et al., 1996). Another CKI modified by the oncogenic E5 protein, but from bovine papillomavirus type 4, is p27^{Kip1}. It has been shown that E5/E8 protein promotes the elevation of p27^{Kip1} protein levels and prevents the correct function of this protein, allowing cell proliferation in the absence of mitogens (O'Brien et al., 2001). A similar role of HPV-16 E5 protein has not been described up to date. Because of this, we set out to elucidate the molecular pathway by which E5 regulates cell cycle progression and allows the initiation of the transformation process. We found that HPV-16 E5 is able to enhance the down-regulation of p27^{Kip1} protein in an EGF-receptor dependent pathway, as the downstream target Grb2 protein is maintained active for a longer period of time than the controls after the receptor stimulation. These events, generated by the presence of HPV-16 E5 oncoprotein, allow cells to enter to and prolong the S-phase of the cell cycle, which may be important for the transformation process.

Results

Characterization of cells expressing the HPV-16 E5 oncogene

To characterize for the expression of HPV-16 E5 transcripts in the transfected NIH3T3 cells (as no antibodies are available for E5 protein); total RNA was extracted from all transfected cell lines and RT-PCR assays were performed. The results revealed that only the 3T3E5 and the EGNE5 cells showed a band of approximately 275 bp that corresponds to the ORF of E5 cloned into the pcDNA3 plasmid. At the same time, RT-PCR of parental cells (3T3neo and EGFRneo) was carried out as negative control of the system (Fig. 1).

After examination of E5 expression in the transfected cell lines, we next studied the transforming/oncogenic activity of this protein (Table 1). Growth kinetics analysis revealed that there were no differences on the doubling time in the EGFRneo cells in the absence or presence of EGF (19 vs. 19.6 h, respectively). However, the EGNE5 cells (expressing E5 and EGF-receptor) showed the slower doubling time (21.3 h in –EGF) than the rest of the cell lines. Interestingly, the doubling time decreased to 18.5 h when EGF was added to the system, difference that was statistically significant when compared to the parental EGFRneo cells (*p*<0.05). This result suggests that E5 expression in the EGNE5 cells could be modifying the length of the cell cycle. Under the same conditions, the saturation density was 40% higher in the EGNE5 cells than in the parental EGFRneo cells, in the presence of EGF (2.96 × 10⁶ vs. 2.11 × 10⁶, respectively) difference that was statistically significant (*p*<0.05), even though the cell densities

Table 1
Growth kinetics and transforming activity of different cell lines expressing HPV-16 E5.

Cell lines	Transfected DNA	Doubling time (h) ^a		Saturation density (10 ⁶) ^b		No. of colonies in soft agar ^c	
		–EGF	+EGF	–EGF	+EGF	–EGF (ratio) ^d	+EGF (ratio) ^d
3T3neo	pcDNA3	17.2	17.3	1.71 ± 0.04	2.43 ± 0.35	1.5 (1)	5.5 (1)
3T3E5	pcDNAE5	17.1	17.3	2.03 ± 0.04	2.56 ± 0.10	0.0 (0)	1.0 (0.2)
EGFRneo	pcDNA3	19.0	19.6	0.98 ± 0.03	2.11 ± 0.12	132 (88)	296 (54)
EGNE5	pcDNAE5	21.3	18.5 ^e	1.28 ± 0.04	2.96 ± 0.11 ^e	16 (11)	702 (128)

^a Numbers given are average of triplicate determinations.

^b Number of cells are given by 1 × 10⁶. Average of duplicate experiments and their intervals are presented.

^c Cells were seeded at 1 × 10⁴ and grown in soft agar for 15 days in the absence or presence of 25 ng/ml EGF. Similar results were obtained in another independent experiment. Numbers given are average of duplicate determinations.

^d Ratio, number of colonies in agar relative to control 3T3neo cells.

^e *p* value <0.05 when comparing EGFRneo vs. EGNE5 cells calculated by Mann–Whitney test.

were similar in the absence of EGF (1.28×10^6 vs. 0.98×10^6 , respectively). In the case of 3T3E5 cells, the doubling time and the saturation density were similar to the parental 3T3neo cells.

We then sought to determine the transforming capacity of E5 associated to EGF-receptor activity as it has been reported (Genther Williams et al., 2005; Pim et al., 1992), by measuring anchorage-independent growth in soft agar (Table 1). It was observed that EGNE5 cells expressing E5 and over-expressing the EGF-receptor had reduced transformation capacity in the absence of EGF, as a lower number of colonies were detected (ratio 11 vs. 88 from EGFRneo cells), an effect that was consistently observed in three independent experiments (data not shown). However, the transforming capacity of E5 in EGNE5 cells was totally restored and sometimes, even higher than the parental EGFRneo cells, when EGF was added to the system (ratio 128 vs. 54, respectively). On the other hand, the 3T3E5 cells were unable to form colonies in agar, either in the absence or presence of EGF as previously reported (Pim et al., 1992). The 3T3neo cells were used as negative control for transformation (-/+EGF conditions; 1.5 and 5.5 colonies, respectively). Meanwhile, the positive control EGFRneo cells over-expressing the EGF receptor proto-oncogene had increased levels of colony formation in agar in conditions with or without EGF (ratio 88 and 54, respectively). The different behaviors observed between the E5-expressing cells (3T3E5 and EGNE5) could be due to the fact that over-expression of the EGF-receptor in the EGNE5 cells amplifies the activity of the E5 protein.

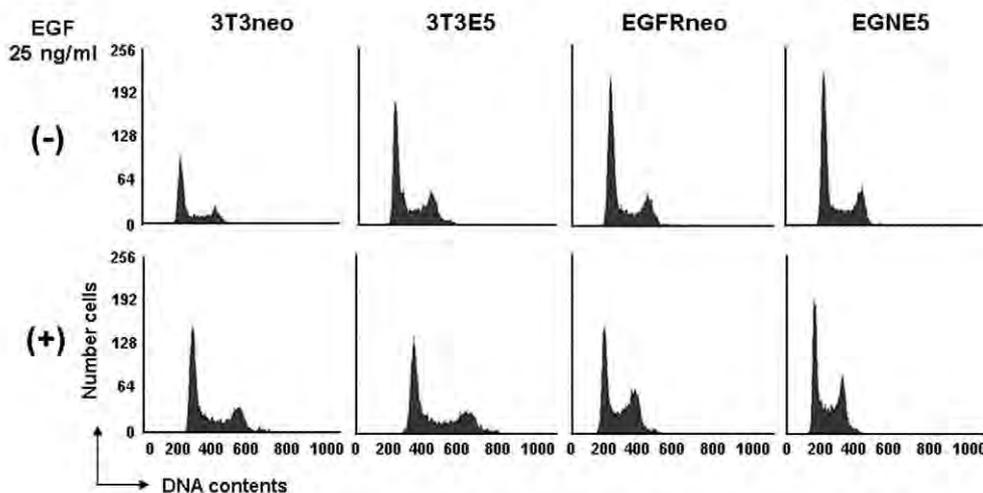
Cell cycle distribution is altered by the presence of E5 from HPV-16

After demonstrating that E5-expressing cells have modified proliferation rate and increased transforming activity, we looked for alterations in cell cycle phases through FACS analysis (Fig. 2). Cells

were grown in the presence or absence of EGF for 16 h prior to FACS analysis. Cells expressing E5 (3T3E5 and EGNE5) and stimulated with EGF showed an important increase in S-phase cells of 37% (from 15.5% to 21.2%) and of 44% (from 17.7% to 25.5%) respectively, when compared with non-stimulated cells. It is notable that in parental cells (3T3neo and EGFRneo), the increase in S-phase in the presence of EGF was only around 17%, as compared with non-stimulated cells. These results suggest that E5 expression increases the S-phase cell population, independent of the number of EGF-receptors, as the EGFRneo cell line that over-expresses the receptor was unable to increase the S-phase to the same extent as the E5-expressing cell lines.

E5 from HPV-16 alters p27^{Kip1} protein levels in EGF stimulated cells

As expected, our results confirmed that E5 possesses transforming activity. However, it was also important to show that HPV-16 E5 is able to alter the S-phase of the cell cycle. A possible explanation is that E5 protein might regulate the levels of one or several cell cycle regulators. To test this hypothesis, we analyzed the cell cycle protein expression pattern by Western blot in the presence of EGF at different times in parental and E5-expressing cells (Fig. 3). The results showed that 3T3E5 and EGNE5 cells, but not the parental cells (3T3neo and EGFRneo) showed a remarkable decrease in the p27^{Kip1} protein levels after 16 h of EGF-stimulation (<35% left in E5-expressing cells as compared to parental cells) and stayed low even after 24 h post-stimulation (<27% left in E5-expressing cells vs. 67% in EGFRneo cells and 105% in 3T3neo cells) (Fig. 3, 3T3E5 and EGNE5). These results showed that p27^{Kip1} protein levels decreased in E5-expressing cells and remained low for longer time when the EGF-receptor was activated.



Cell Lines	Cell Cycle Phases					
	G1		S*		G2/M	
	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF
3T3neo	59.7	52.3	18.1	21.2	22.8	26.7
3T3E5	56.9	50.9	15.5	21.2	28.8	28.3
EGFRneo	62.7	45.5	12.1	14.3	24.9	38.0
EGNE5	59.2	43.0	17.7	25.5	23.1	36.1

* The increment in the S-phase was calculated by the difference between -EGF and +EGF.

Fig. 2. Cell cycle analysis of E5-expressing cells. Cells were grown in the presence of 50 ng/ml EGF for 16 h, harvested, fixed with ethanol and stained with 10 µg/ml PI. Cell cycle distribution of the population was determined by FACS analysis. Cell cycle histograms are shown from the different cell lines stimulated with EGF at 0 (-) and 16 h (+) times. The table shows the distribution of cells in the different cell cycle phases, as determined by the WinMDI 2.8 software.

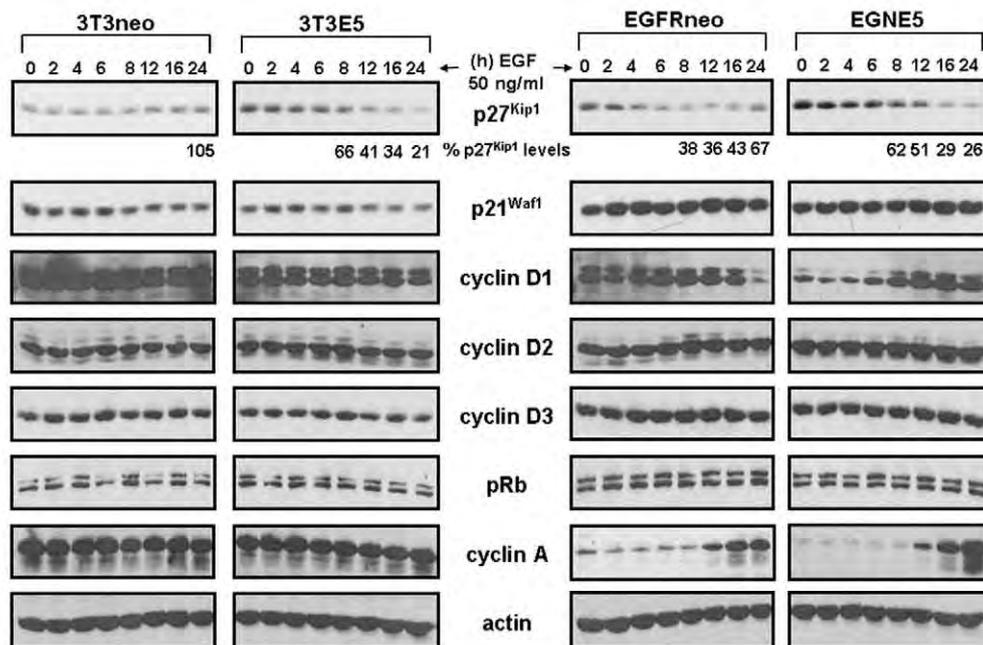


Fig. 3. Effect of HPV-16 E5 protein on cell cycle proteins. Transfected cells were stimulated with 50 ng/ml EGF at different times. Forty micrograms of total protein from each cell line was separated by SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis with antibodies against different cell cycle proteins, and developed by chemiluminescence. Immunoblots from 3T3neo and EGFRneo (control cells), and 3T3-E5 and EGNE5 (E5-expressing cells) were tested with different cell cycle protein antibodies. Actin blots were used as loading controls of the system.

Due to the fact that over-expression of the EGF-receptor amplifies the E5 signal and clear differences between the parental EGFRneo and the EGNE5 cell lines were observed, subsequent experiments were carried out only with these two cell lines.

HPV-16 E5 oncoprotein down-regulates p27^{Kip1} through reduction of protein half-life

To further characterize the mechanism for p27^{Kip1} down-regulation, we treated cells with cycloheximide to stop protein synthesis and then stimulated the cells with EGF at different times (described in [Materials and methods](#)), to examine p27^{Kip1} protein degradation and calculate its half-life. Western blot analysis showed that right from the start p27^{Kip1} protein levels were lower in the E5-expressing cells than in parental EGFRneo cells. However, the down-regulation of p27^{Kip1} was enhanced in the E5-expressing cells following EGF-stimulation. This effect became evident at 6 h and the protein levels were almost depleted by 8 h (Fig. 4A, EGNE5). Through densitometric analysis, we calculated the total pixels contained in each p27^{Kip1} band using the ImageJ program (version 1.33u, NIH-USA). The data was plotted in a graph (Fig. 4B) and used to calculate the half-life of p27^{Kip1} protein according to [Belle et al. \(2006\)](#). Throughout these data, it was clear that the half-life of p27^{Kip1} protein in E5-expressing cells was slightly reduced in the absence of EGF when compared with parental EGFR cells (from 18.4 to 12.7 h). At the same time, in the presence of EGF, p27^{Kip1} half-life was reduced four-fold when compared with control cells (from 12.8 to 3.6 h) (Fig. 4C). Together, these results suggest that E5 cooperates with the EGF-receptor to promote cell proliferation by maintaining low levels of p27^{Kip1} protein through reducing the protein stability of p27^{Kip1}.

Consistent with our results, it has been reported that p27^{Kip1} expression is mainly regulated at post-translational level by ubiquitination mediated proteolysis ([Swanson et al., 2000](#); [Ungermann et al., 2005](#)). Despite this, we also investigated the regulation of p27^{Kip1} by E5 and EGF-signaling. Northern blot analysis for p27^{Kip1} showed similar p27^{Kip1} mRNA levels in parental and E5-expressing cells when stimulated with EGF (data not shown). Based on these

results, we propose that E5 has little or no effect on p27^{Kip1} regulation at the transcriptional level, but functions predominantly at post-translational level.

EGF-receptor protein levels are down-regulated in E5-expressing cells, but receptor activity is maintained for a longer period of time

Many studies have reported that E5-expressing cells have a prolonged EGF-receptor activity as a result of receptor recycling ([Martin et al., 1989](#); [Rodriguez et al., 2000](#); [Straight et al., 1993, 1995](#)). Therefore, we investigated the levels and activity of the EGF-receptor through Western blotting and correlated the tyrosine phosphorylation with p27^{Kip1} down-regulation in response to E5 oncoprotein signaling. The results showed that EGF-receptor activity (observed by receptor tyrosine phosphorylation) was similar in the E5-expressing cells as in EGFRneo cells at time 0, but receptor activity was kept high for a longer period of time (up to 24 h) in EGNE5 cells than the parental EGFRneo cells (Fig. 5A, EGF-r-Tyr-P). However, lower EGF-receptor protein levels were detected in EGNE5 cells than in parental EGFRneo cells by 24 h post receptor-stimulation (Fig. 5A, EGF-r). At the same time, EGF-receptor activity correlated with the down-regulation of p27^{Kip1} protein levels in E5-expressing cells (Fig. 5A, p27^{Kip1}). Comparative analysis of the EGF-receptor tyrosine phosphorylated bands showed that the basal activity of the EGF-receptor was similar in both cell lines, however after 16 h post EGF-stimulation the receptor activity was 3.5 fold higher in the E5-expressing cells than in the parental EGFRneo and remained high (3 fold) in EGNE5 cells even after 24 h post EGF-stimulation (Fig. 5B). We also found that EGF-receptor transcripts were not modified by EGF stimulation, since the Northern blot of the different cell lines showed similar levels of receptor mRNA (data not shown), which suggests that E5 was modulating the EGF-receptor at the post-translational level. Taken together, these results indicate that E5-expressing cells maintained a higher activity of the receptor (tyrosine phosphorylation), than parental EGFRneo cells, although parental cells showed twice as much receptor protein (Fig. 5A).

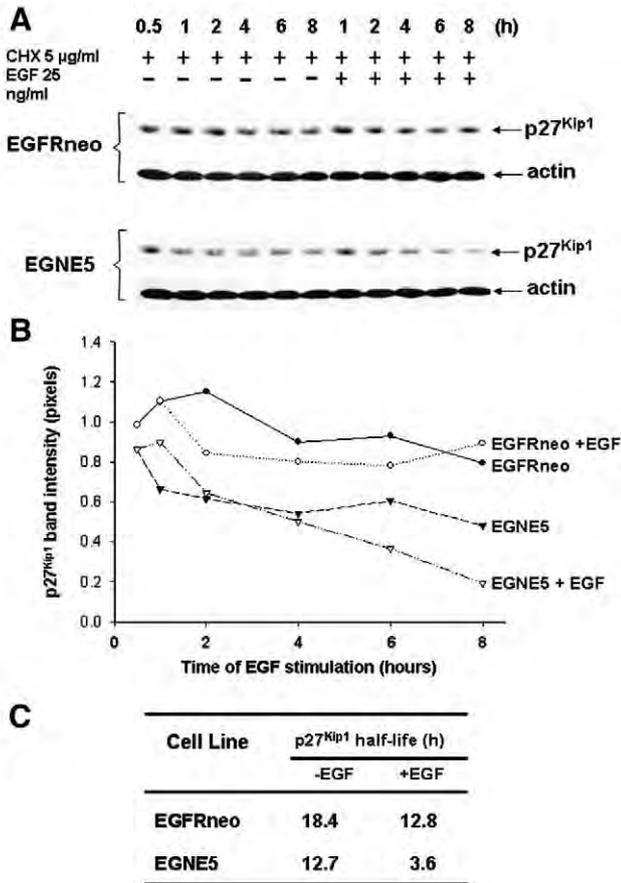


Fig. 4. E5 from HPV-16 alters p27^{Kip1} half-life. Parental EGFRneo and EGNE5 cells were pre-treated with 5 µg/ml CHX for 30 min and later stimulated with 25 ng/ml EGF at different times. Immunoblot analysis was performed with 40 µg of total protein and developed with monoclonal anti-p27^{Kip1} antibody by chemiluminescence. (A) Blots from the different cell lines showing the p27^{Kip1} protein after different times of EGF stimulation. (B) Bands from panel (A) were scanned and relative amounts of p27^{Kip1} protein were plotted in a graph versus time of EGF stimulation. (C) p27^{Kip1} protein half-life was calculated from data taken from (B) according to Belle et al. (2006).

E5 activity on p27^{Kip1} depends specifically on EGF-receptor signaling

To verify that the effect of E5 on p27^{Kip1} down-regulation depends on EGF-receptor activity, we used tyrphostin-AG1478, a specific inhibitor of the receptor kinase activity to block EGF-receptor signaling (Zhu et al., 2001). PDGF-receptor tyrosine phosphorylation was used as a negative control for the system. Cells were grown and stimulated with EGF as described in Materials and methods. Western blot analysis showed that EGF-receptor was activated after 30 min post EGF-stimulation in the presence or absence of E5 protein (Fig. 6; lanes 2 and 14). However, in E5-expressing cells there was an increased activity of the EGF-receptor in every measurement (Fig. 6; EGNE5, upper panel). Addition of tyrphostin-AG1478 to the cells prior to EGF-stimulation demonstrated inhibition of EGF-receptor activity as revealed by the absence of tyrosine phosphorylation (Fig. 6; lanes 3 and 15, upper panels). By 16 h post-EGF stimulation, higher levels of phosphorylated EGF-receptor and lower levels of p27^{Kip1} protein were observed in EGNE5 cells compared with EGFRneo cells (Fig. 6; lanes 8 and 20, upper and p27^{Kip1} panels). In the presence of tyrphostin-AG1478, p27^{Kip1} down-regulation was blocked as a consequence of specific EGF-receptor activity inhibition (Fig. 6; lanes 10 and 22, upper and p27^{Kip1} panels). On the other hand, p27^{Kip1} protein levels were not affected by the inhibitor in the PDGF system at any time (Fig. 6; p27^{Kip1} panel, lanes 12 and 24). To identify if the signal transduction system of the EGF-receptor was completely

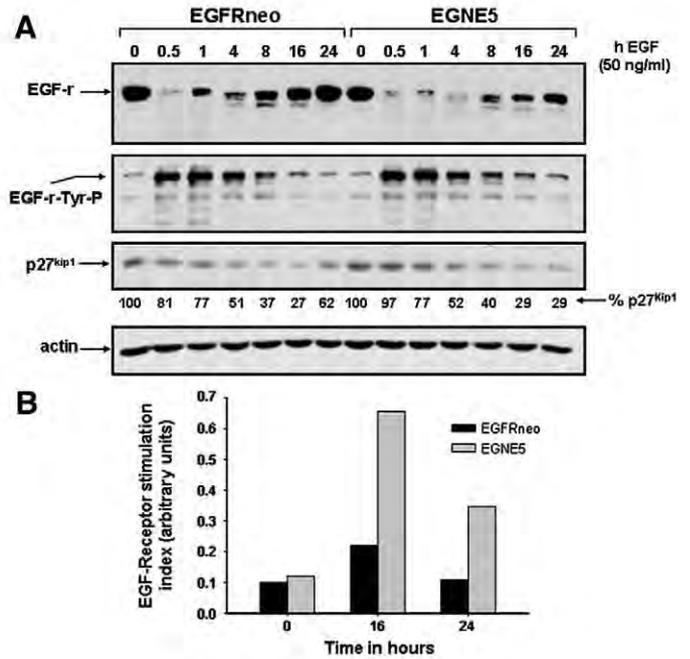


Fig. 5. Protein and phosphorylation levels of EGF-receptor in E5-expressing cells. (A) Cells were stimulated with EGF for 16 h, lysed, separated on 15% SDS-PAGE and tested by immunoblot with anti-EGF-receptor and anti-phosphotyrosine (PY99) antibodies. Blots were developed by chemiluminescence. Actin was used as loading control of the system. (B) EGF-receptor protein and phosphorylated bands from the immunoblots were scanned and the relative intensity of bands calculated with the ImageJ program (version 1.33u, NIH-USA). A receptor stimulation index was calculated by dividing intensity of phosphorylated bands vs. intensity of EGF-receptor total protein. A graph of receptor stimulation index was plotted versus time of EGF stimulation.

blocked by tyrphostin-AG1478, we studied the phosphorylation of the downstream EGF-receptor target Grb2 protein (Li et al., 2001). The results for the parental EGFRneo cells showed a normal pattern of Grb2 protein phosphorylation in the presence of EGF at short time points, although this activity was reduced to 13% after 16 h post-stimulation (Fig. 6; lanes 2 vs. 8, respectively). However, for E5-expressing cells 28% of Grb2 protein remained phosphorylated by 16 h post-stimulation, suggesting the presence of a positive stimulation of the EGF-receptor signal-transduction system (Fig. 6; lanes 14 vs. 20). These results showed that E5 requires an active EGF-receptor (receptor phosphorylation) and an active receptor pathway (Grb2-phosphorylation) to enhance the down-regulation of p27^{Kip1} protein levels. However, at this point we still do not know which pathway from the EGF-receptor is involved in the down-regulation of p27 associated to E5 activity, as more experiments need to be done to dissect this part.

Discussion

In this paper, we report that HPV-16 E5 protein is involved in the down-regulation of p27^{Kip1} levels, a CDK inhibitor important for G1 cell cycle arrest. This novel property of HPV-16 E5 protein requires an active EGF-receptor as well as an active receptor signal cascade (Grb2-phosphorylation), a finding that has also been demonstrated for other signals associated with this oncoprotein (Crusius et al., 1997, 1998; Leechanachai et al., 1992; Pim et al., 1992; Straight et al., 1993). Recently, the HPV-16 E5 gene is regarded as a potent oncogene, because of its ability to promote persistent growth of spontaneous tumors in E5 transgenic mice in the absence of E6/E7 oncogenes. Moreover, the cooperation between E5 and EGF-receptor was also supported in those experiments (Genther Williams et al., 2005).

When we studied transformation activity in E5-expressing cells, we observed that E5 requires the activation of the EGF-receptor to

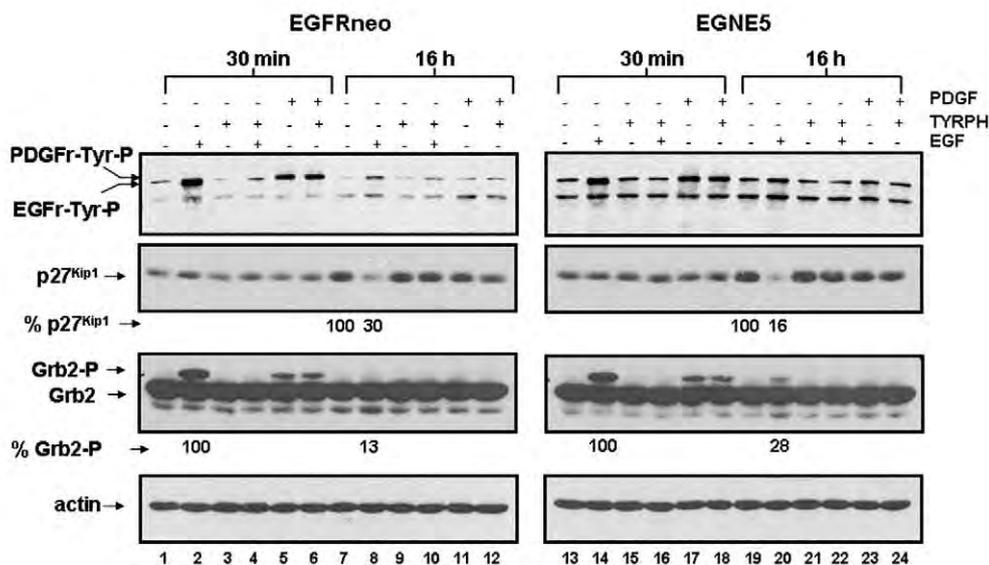


Fig. 6. HPV-16 E5 down-regulation of p27^{Kip1} protein levels is dependent of EGF-receptor activity. EGFRneo and EGNE5 cells were treated with 1 μ M tyrphostin-AG1478 for 1 h prior to EGF (50 ng/ml) or PDGF (25 ng/ml) stimulation. Cells were lysed in RIPA buffer supplemented with 10 mM sodium orthovanadate and 0.5 mM DTT. Forty micrograms of total protein was separated on 12.5% SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis with anti-phosphotyrosine (PY99), anti-p27^{Kip1}, anti-Grb2 or anti-actin antibodies as control. Proteins were visualized by chemiluminescence.

generate this phenotype. This is based on the observation that E5-expressing cells (EGNE5) induced the highest saturation density and colony formation in soft agar (characteristics associated with a transformed phenotype), only in the presence of EGF as previously reported (Leechanachai et al., 1992; Martin et al., 1989; Pim et al., 1992; Straight et al., 1993). Over-expression of the EGF-receptor confers transforming capacity in the cells, as shown by the high number of colonies in EGFRneo cells. However, it was striking that colony formation was reduced in E5-expressing cells in the absence of EGF, but enhanced 128 fold over the control (3T3neo) cells in the presence of EGF. At this moment, it is not clear how E5 could abrogate the transformation process, but it was apparent that activation of the EGF-receptor is required for the E5 signaling pathway to function and induce transformation. One possibility is that, in the absence of ligand, E5 decreases spontaneous dimerization and signaling of EGF-receptor, allowing the modulation of the transformation process or could lead the cells to another cellular process like senescence or differentiation. Our results are in agreement with the recent report of Genter Williams et al. (2005), who demonstrated in transgenic mice that E5 was able to direct cells to differentiation and not only to transformation, however, it was not clear if these events depend on EGF-receptor activation.

Our results also showed that E5, in cooperation with EGF-receptor signaling, promoted cellular proliferation; this was demonstrated by an increase in the S-phase cell population in EGNE5 cells (Fig. 2). These results are consistent with another report that showed that HPV-31 E5 protein supports cell cycle progression in epithelial differentiating cells (Fehrmann et al., 2003), although these researchers postulate that EGF-receptor is not involved in the process. This result, disagrees with our findings, might be due to the presence of E6 and E7 in the same cellular system. It is possible that E6 and E7 override the E5 signal pathway as previous reports have shown that E6 and E7 oncogenes increase the levels and activity of EGF-receptor (Akerman et al., 2001; Johnston et al., 1999). It could also be possible that the differential activity of E5 from HPV-16 and HPV-31 over the EGF-receptor could be due to a difference in expression levels or different functional properties attributed to sequence variations.

When we investigated the mechanisms through which E5 promotes cell cycle progression, we found that HPV-16 E5 has the ability to enhance the down-regulation of p27^{Kip1} protein levels. Also, we propose that E5 activity depends on the presence of an active EGF-

receptor, as the system could be blocked by the EGF-receptor inhibitor, tyrphostin-AG1478. Finally, we identified that Grb2 protein remains phosphorylated for a longer period of time in E5-expressing cells, which could suggest that an active signal transduction through the Ras protein is going on, although this is only a speculation as more experiments need to be done to define this part. All together, these results suggest that HPV-16 E5 regulates entry to the cell cycle, through the down-regulation of p27^{Kip1} protein in an EGF dependent manner and this could be the reason for the larger S-phase cell population observed in our experiments; probably, this could be an initiator stage of the transformation process, as has been shown to happen with the Ras oncoprotein (Gryfe et al., 1997; Takami et al., 1995). Alternatively, it has been shown that p27^{Kip1} regulates cytoplasmic Grb2 in response to EGF-stimulation in a negative feedback system (Moeller et al., 2003). It has also been shown that regulation of Grb2/Ras activities has the potential to influence cell fate decisions (Schwartz, 1997) and this could be fundamental for E5. Probably, this oncoprotein plays a key role in the viral life cycle, maintaining partially differentiated cells into the cell cycle, in order to generate viral particles.

Because p27^{Kip1} controls cell division, the deregulation of p27^{Kip1} has been implicated not only in oncogenesis, but also in tumor aggressiveness and poor patient survival in many human cancers (Bloom and Pagano, 2003; Catzavelos et al., 1997; Mori et al., 1997). It is possible that p27^{Kip1} protein, an important CDK activity regulator, could affect cell cycle entry and exit in cancerous cells. It was also shown that p27^{Kip1} protein is expressed at high levels in differentiated, non-cycling cells and is low or absent in proliferating cells (Durand et al., 1998). More recently, it was demonstrated that low levels of p27^{Kip1} in transgenic mice (haploinsufficient for p27^{+/-}) were more susceptible to transformation by the ErbB2/Neu receptor (member of the ErbB family, which includes the EGF-receptor). These researchers also showed that loss of both p27^{Kip1} alleles result in a decreased susceptibility to ErbB2-mediated transformation (Muraoka et al., 2002). Thus, it seems that titration levels of p27^{Kip1} into the cell may determine the function of this protein into the cell cycle. In this context, we can speculate that HPV-16 E5 maintains low levels of p27^{Kip1} in the cell, as this protein is required for cyclin D/Cdk4 activity (Cheng, et al., 1998, 1999). This Cdk4 activity allows progression through early G1 and entry to the S phase, final effect that was observed in E5-expressing cells (Fig. 2). At this point, it is not clear,

whether a “decision point” is established by the presence of E5 that deregulates p27^{Kip1} protein levels impairing the role of this protein as a cell cycle inhibitor and allowing the cells to switch into a proliferation stage to permit production of viral proteins. However, if p27^{Kip1} low levels persist for long time, because E5 regulation, this may drive the cells to a transformation process, as it was observed for the haploinsufficient p27^{+/-} transgenic mice.

We also looked for alterations in EGF-receptor protein levels and its activity, since it has been reported that E5 can modulate this receptor (although this point is controversial). Our results support the hypothesis that E5 prolongs the activity of the EGF-receptor, but without increasing the protein receptor levels, as has been reported elsewhere (Gu and Matlashewski, 1995). However, there is a report demonstrating an elevated number of EGF-receptors, as well as an increase in the degree of phosphorylation (Straight et al., 1995). Impaired down-regulation and recycling of the receptors to the cell membrane has been observed in E5-expressing cells (Straight et al., 1993). The discrepancy among reports of EGF-receptor modulation through E5 could be related to the use of different cell lines that express different levels of the EGF-receptor family members (i.e. EGFR, erbB-2, erbB-3, and erbB-4). It has been shown that transphosphorylation of ligand-induced homo or hetero-dimers are generated to modulate the growth regulatory signal (Carraway and Cantley, 1994; Zhang et al., 1996). It is likely that cells used in this work specifically amplified the EGF-receptor signal pathway, since the cells over-express this receptor. At the same time, it is also possible that homo-dimers of EGF-receptor switch on a specific signal cascade that culminates in the down-regulation of p27^{Kip1}.

In summary, we have examined the role of HPV-16 E5 in cell cycle progression and found that E5 enhances the down-regulation of p27^{Kip1} protein levels in an EGF-receptor-dependent pathway as the Grb2 protein remains active for longer time in this system. These data suggest that p27^{Kip1} is an indirect downstream E5 target that allows the cells to stay longer into the cell cycle and permits the initiation of a transformation phenotype.

Materials and methods

Generation of HPV-16 E5-expressing cells

The 1.2 kb fragment from HPV-16 DNA (nucleotides 3761 to 4986) containing the complete E5 gene (Seedorf et al., 1985) was cloned into the *Bam*HI site of pcDNA3 plasmid (Invitrogen). The correct orientation was confirmed by enzymatic restriction analysis and sequencing. The constructed E5 plasmid was named pcDNAE5 capable of expressing the HPV-16 E5 gene.

All cell lines were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). NIH 3T3 mouse fibroblasts were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The EGFR cell line was a gift of Dr. D. Lowy (Lab. Cellular Oncology, NCI, NIH, Bethesda, MD, USA) and this is a NIH 3T3 cell line that over-expresses the human EGF-receptor (Velu et al., 1989).

Cells were transfected as described previously (Ogiso et al., 1990) by the lipofection method (Invitrogen) with 5 µg of pcDNAE5 plasmid which also codes for G418 resistance. After 15 days of selection in DMEM containing 800 µg/ml G418, a pool of cells from each transfection was obtained and named 3T3E5 and EGNE5 (NIH 3T3 and EGFR cells expressing E5, respectively). Parental NIH 3T3 and EGFR cells transfected with pcDNA plasmid alone were used as controls and labeled as 3T3neo and EGFRneo cells, respectively. We chose the NIH 3T3 cells to isolate the EGF system, given to the fact that EGF-receptor is not the primary driver of proliferation in this cell line. In this way, specific signals delivery from the EGF-receptor could be identified without the interference of endogenous receptor.

Due to the fact that p27^{Kip1} protein levels are regulated in part by cell density, we had to adjust the system to a certain cell concentration in such a way that this factor did not affect the results. Cell densities were adjusted for all the experiments to 5×10^3 cells/cm² for 3T3 and 3T3E5, and to 3.5×10^4 cells/cm² for EGFRneo and EGNE5 (approximately 90% confluence). These conditions ensure that the results were reproducible all the time.

RT-PCR analysis

Five micrograms of total RNA was used for reverse transcription with oligo(dT) primers and the enzyme Mo-MLV RT (Invitrogen). Amplification of each target cDNA was detected after 30 cycles of PCR at 94 °C for 45 s, 54 °C for 1 min and 72 °C for 2 min, using 1 U of ULTMA enzyme in each reaction (PerkinElmer Co.). The flanking primers that include the E5 region (3851 to 4098 bp) of the HPV-16 were used for the amplification step: forward oligo-nucleotide E5-GST1 (5'-GCCCCGAATTCGGACAAATCTTGATACT-3'); reverse oligo-nucleotide E5-GST2 (5'-GCGCCGCTCGCGTTCATGTAATTAAGCG-3'). The oligonucleotides amplified a fragment of 275 bp long that corresponded to HPV-16 E5 ORF.

Cycloheximide (CHX) treatment

CHX was purchased from Sigma and a stock solution of 5 mg/ml was prepared in ultrapure water and sterilized by filtration. For all the experiments with CHX, exponentially growing cells were culture for 72 h in DMEM-10% FBS. Finally, cells were exposed 30 min to CHX treatment (5 µg/ml) prior to EGF-stimulation (25 ng/ml) (Roche) for the times indicated in the Results section.

Assay for growth in soft agar

For colony formation in suspension, cells were plated on 60 mm dishes with a bottom layer of 1% agar as described previously (Chen and Mouts, 1990). Briefly, 1×10^4 cells were seeded in quadruplicate in DMEM-10% FBS and 0.4% Noble agar and poured onto previously prepared 60 mm agar dishes. After 15 days of culture at 37 °C the number of colonies was counted. Half of the culture cells were stimulated every other day with 25 ng/ml EGF.

Cell proliferation assays

Cells were seeded at 3×10^4 cells/35 mm dish in DMEM-10% FBS in duplicate and stimulated with 25 ng/ml EGF, every other day for 15 days. Cells were harvested at different periods of time (1, 2, 5 and 7 days) and the total cell number was calculated by counting cells in a Neubauer chamber. From these data, cell curves were plotted in a graph and doubling time and saturation density of the different cell lines were calculated from three independent experiments. A Mann-Whitney test was run to compare the difference observed between parental cell lines and the E5-expressing cells and a *p* value <0.05 was considered statistically significant.

Western blot analysis

Cells were trypsinized, pelleted and lysed in cold RIPA-PBS buffer (2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA pH 7.3 and protease inhibitors from Roche), and supplemented with 10 mM sodium orthovanadate, and 0.5 mM DTT when looking for protein phosphorylation. Forty micrograms of total protein were resolved by SDS-PAGE and transferred to PROTEAN nitrocellulose membranes (Whatman International Ltd.) as described previously (Towbin et al., 1979). The filters were blocked with PBS-T buffer (PBS including 0.05% Tween 20) containing 10% skim milk for 2 h at 4 °C. The filters

were incubated overnight with the indicated antibody. Specific antibody binding was detected by using horseradish peroxidase-linked goat anti-mouse or anti-rabbit IgG (DAKO) and visualized by the enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (PerkinElmer Co.). Antibodies against p21^{Waf1}, cyclin A, cyclin D1, p27^{Kip1}, anti-phosphotyrosine and actin were purchased from Santa Cruz Biotechnology and monoclonal anti-EGF-receptor from Zymed.

Bands were analyzed by densitometric analysis by using the ImageJ program (version 1.33u, NIH-USA). In all cases, the density of the bands was adjusted to the density of the corresponding actin bands, and the bands of control cells in basal conditions were arbitrary taken as 100.

Cell cycle analysis by flow cytometry

Cells were seeded at low cell density as mentioned before in 60 mm dishes in DMEM-10% FBS in duplicate and grown for 32 h at 37 °C in 5% CO₂/95% air. Cells were stimulated with 25 ng/ml EGF for 16 h, after which cells were trypsinized, re-suspended in DMEM-10% FBS and counted. Equal number of cells from each treatment was fixed in 75% ethanol. Cells were centrifuged and stained with 10 µg/ml of propidium iodide (PI) in PBS containing 10 µg/ml RNase for 1 h at room temperature in the dark. Finally cells were analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, Beckton Dickinson & Co.) and results analyzed by the WinMDI 2.8 software.

Acknowledgments

We acknowledge the technical support of Humberto Valdovinos-Torres from the Department Epidemiological Interaction, National Institute of Public Health. We are thankful for the technical advice of MSc Edgar E. Esquivel-Soto during the Flow cytometry experiments. We are grateful to Dr. Robert Tindle and to MSc Tanya Plett-Torres for revising the manuscript.

Adolfo Pedroza-Saavedra is PhD student of the postgraduate program of "Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México", Cuernavaca, Morelos Mexico, supervised by Dr. Lourdes Gutierrez-Xicotencatl.

This work was supported by CONACYT-SEP grant 38906-M and by Miguel Aleman Foundation grant.

References

- Abbas, T., Dutta, A., 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer* 9, 400–414.
- Abukhdeir, A.M., Park, B.H., 2008. p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev. Mol. Med.* 10, e19.
- Adam, J.L., Briggs, M.W., McCance, D.J., 2000. A mutagenic analysis of the E5 protein of human papillomavirus type 16 reveals that E5 binding to the vacuolar H⁺-ATPase is not sufficient for biological activity, using mammalian and yeast expression systems. *Virology* 272, 315–325.
- Akerman, G.S., Tolleson, W.H., Brown, K.L., Zyzak, L.L., Mourateva, E., Engin, T.S., Basaraba, A., Coker, A.L., Creek, K.E., Pirisi, L., 2001. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 cooperate to increase epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels, overcoming mechanisms by which excessive EGFR signaling shortens the life span of normal human keratinocytes. *Cancer Res.* 61, 3837–3843.
- Ashby, A.D.M., Meagher, L., Campo, S., Finbow, M.E., 2001. E5 transforming proteins of human papillomaviruses do not disturb the activity of the vacuolar H⁺-ATPase. *J. Gen. Virol.* 82, 2353–2362.
- Bahmassy, A.A., Zekri, A.R., Saleh, M., Lotayef, M., Moneir, M., Shawki, O., 2007. The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. *BMC Clin. Pathol.* 7, 4–15.
- Belle, A., Tanay, A., Bitincka, L., Shamir, R., O'Shea, E.K., 2006. Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (35), 13004–13009.
- Berezutskaya, E., Yu, B., Morozov, A., Raychaudhuri, P., Bagchi, S., 1997. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ.* 8, 1277–1286.
- Besson, A., Dowdy, S.F., Roberts, J.M., 2008. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev. Cell* 14, 159–169.
- Bloom, J., Pagano, M., 2003. Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin. Cancer Biol.* 13, 41–47.
- Borriello, A., Cucciolla, V., Oliva, A., Zappia, V., Della Ragione, F., 2007. p27Kip1 metabolism: a fascinating labyrinth. *Cell Cycle* 6, 1053–1061.
- Bouvard, V., Matlashewski, G., Gu, Z.-M., Storey, A., Banks, L., 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.
- Briggs, M.W., Adam, J.L., McCance, D.J., 2001. The human papillomavirus type 16 E5 protein alters vacuolar H(+)ATPase function and stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology* 280, 169–175.
- Cánepa, E.T., Scassa, M.E., Ceruti, J.M., Marazita, M.C., Carcagno, A.L., Sirkin, P.F., Ogara, M.F., 2007. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life* 59, 419–426.
- Carraway III, K.L., Cantley, L.C., 1994. A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor hetero-dimerization in growth signaling. *Cell* 78, 5–8.
- Catzavelos, C., Bhattacharya, N., Ung, Y.C., Wilson, J.A., Roncari, L., Sandhu, C., Shaw, P., Yeger, H., Morava-Protzner, I., Kapusta, L., Franssen, E., Pritchard, K.I., Slingerland, J.M., 1997. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat. Med.* 3, 227–230.
- Chan, F.K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D.N., Winoto, A., 1995. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16^{ink4}. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2682–2688.
- Chen, S.L., Mounts, P., 1990. Transforming activity of E5a protein of human papillomavirus type 6 in NIH 3T3 and C127 cells. *J. Virol.* 64, 3226–3233.
- Chen, S.L., Tsao, L.T., Tsao, Y.P., 1994. Antisense oligodeoxynucleotides to c-jun inhibits proliferation of transformed NIH 3T3 cells induced by E5a of HPV11. *Cancer Lett.* 85, 119–123.
- Chen, S.L., Tsao, Y.P., Yang, C.M., Lin, Y.K., Huang, C.H., Kuo, S.W., 1995. Differential induction and regulation of the c-jun, junB, junD and c-fos by human papillomavirus type 11 E5a oncoprotein. *J. Gen. Virol.* 76, 2653–2659.
- Chen, S.L., Huang, C.H., Tsai, T.C., Lu, K.Y., Tsao, Y.P., 1996a. The regulation mechanism of c-jun and junB by human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. *Arch. Virol.* 141, 791–800.
- Chen, S.L., Lin, Y.K., Li, L.Y., Tsao, Y.P., Lo, H.Y., Wang, W.B., Tsai, T.C., 1996b. E5 proteins of human papillomavirus types 11 and 16 transactivate the c-fos promoter through the NF1 binding element. *J. Virol.* 70, 8558–8563.
- Chen, S.L., Lin, S.T., Tsai, T.C., Hsiao, W.C., Tsao, Y.P., 2007. ErbB4 (JM-b/CYT-1)-induced expression and phosphorylation of c-Jun is abrogated by human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene* 26, 42–53.
- Cheng, M., Sexl, V., Sherr, C.J., Rousset, M.F., 1998. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27^{Kip1} regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (3), 1091–1096.
- Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Rousset, M.F., Roberts, J.M., Sherr, C.J., 1999. The p21 (Cip1) and p27 (Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* 18 (6), 1571–1583.
- Conrad, M., Bubb, V.J., 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.
- Crusius, K., Auvinen, E., Alonso, A., 1997. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene* 15, 1437–1444.
- Crusius, K., Auvinen, E., Steuer, B., Gaissert, H., Alonso, A., 1998. The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCat. *Exp. Cell Res.* 241, 76–83.
- Di Domenico, F., Foppoli, C., Blarzino, C., Perluigi, M., Paolini, F., Morici, S., Coccia, R., Cini, C., De Marco, F., 2009. Expression of Human papillomavirus type 16 E5 protein in amelanotic melanoma cells regulates endo-cellular pH and restores tyrosinase activity. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 28, 4.
- Dyson, N., Guida, P., Münger, K., Harlow, E., 1992. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J. Virol.* 66, 6893–6902.
- Durand, B., Fero, M.L., Roberts, J.M., Raff, M.C., 1998. p27Kip1 alters the response of cells to mitogen and is part of a cell-intrinsic timer that arrests the cell cycle and initiates differentiation. *Curr. Biol.* 8, 431–440.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817–825.
- Fehrmann, F., Klumpp, D.J., Laimins, L.A., 2003. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J. Virol.* 77, 2819–2831.
- Genther Williams, S.M., Disbrow, G.L., Schlegel, R., Lee, D., Threadgill, D.W., Lambert, P.F., 2005. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncoprotein. *Cancer Res.* 65, 6534–6542.
- Gryfe, R., Swallow, C., Bapat, B., Redston, M., Gallinger, S., Couture, J., 1997. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr. Prob. Cancer* 21, 233–300.
- Gu, Y., Turck, C.W., Morgan, D.O., 1993. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 366, 707–710.
- Gu, Z., Matlashewski, G., 1995. Effect of human papillomavirus type 16 oncogenes on MAP kinase activity. *J. Virol.* 69, 8051–8056.
- Guan, K.L., Jenkins, C.W., Li, Y., Nichols, M.A., Wu, X., O'Keefe, C.L., Matera, A.G., Xiong, Y., 1994. Growth suppression by p18, a p16^{INK4}/MTS1- and p14^{INK4B}/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev.* 8, 2939–2952.
- Hannon, G.J., Beach, D., 1994. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF-β-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257–261.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J., 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805–816.
- Hengst, L., Reed, S.I., 1996. Translational control of p27^{Kip1} accumulation during the cell cycle. *Science* 271, 1861–1864.

- Hirai, H., Roussel, M.F., Kato, J.Y., Ashmun, R.A., Sherr, C.J., 1995. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol. Cell Biol.* 15, 2672–2681.
- Hitomi, M., Yang, K., Guo, Y., Fretthold, J., Harwalkar, J., Stacey, D.W., 2006. p27Kip1 and cyclin dependent kinase 2 regulate passage through the restriction point. *Cell Cycle* 5, 2281–2289.
- Hubbert, N.L., Sedman, S.A., Schiller, J.T., 1992. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J. Virol.* 66, 6237–6241.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Howley, P.M., 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 10, 4129–4135.
- Johnston, D., Hall, H., DiLorenzo, T.P., Steinberg, B.M., 1999. Elevation of the epidermal growth factor receptor and dependent signaling in human papillomavirus-infected laryngeal papillomas. *Cancer Res.* 59, 968–974.
- Kato, J.Y., Matsuoka, M., Polyak, K., Massague, J., Sherr, C.J., 1994. Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27^{Kip1}) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 79, 487–496.
- Kato, A., Takahashi, H., Takahashi, Y., Matsushime, H., 1997. Inactivation of the cyclin D-dependent kinase in the rat fibroblast cell line, 3Y1, induced by contact inhibition. *J. Biol. Chem.* 272, 8065–8070.
- Kim, S.H., Juhn, Y.S., Kang, S., Park, S.W., Sung, M.W., Bang, Y.J., Song, Y.S., 2006. Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ERK1, 2 and PI3K/Akt. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 930–938.
- Kivi, N., Greco, D., Auvinen, P., Auvinen, E., 2008. Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene* 27, 2532–2541.
- Lee, M.H., Reynisdottir, I., Massague, J., 1995. Cloning of p57^{Kip2} a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* 9, 639–649.
- Leechanchai, P., Banks, L., Moreau, F., Matlashewski, G., 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.
- Leptak, C., Ramon y Cajal, S., Kulke, R., Horwitz, B.H., Riese, D.J., Dotto, G.P., diMaio, D., 1991. Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 gene of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 65, 7078–7083.
- Lewis, C., Baro, M.F., Marques, M., Grüner, M., Alonso, A., Bravo, I.G., 2008. The first hydrophobic region of the HPV16 E5 protein determines protein cellular location and facilitates anchorage-independent growth. *Virology* 475, 30–39.
- Li, S., Couvillon, A.D., Brasher, B.B., Van Etten, R.A., 2001. Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling. *EMBO J.* 20, 6793–6804.
- Martin, P., Vass, W.C., Schiller, J.T., Lowy, D.R., Velu, T.J., 1989. The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1 receptors. *Cell* 59, 21–32.
- Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W., Elledge, S.J., 1995. p57^{Kip2} a structurally distinct member of the p21^{Cip1} Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* 9, 650–662.
- Maufort, J.P., Genter Williams, S.M., Pitot, H.C., Lambert, P.F., 2007. Human papillomavirus 16 E5 oncogene contributes to two stages of skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 67, 6106–6112.
- Moeller, S.J., Head, E.D., Sheaff, R.J., 2003. p27Kip1 inhibition of GRB2-SOS formation can regulate Ras activation. *Mol. Cell Biol.* 23, 3735–3752.
- Morgan, D.O., 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131–134.
- Mori, M., Mimori, K., Shiraiishi, T., Tanaka, S., Ueo, H., Sugimachi, K., Akiyoshi, T., 1997. p27 expression and gastric carcinoma. *Nat. Med.* 3, 593.
- Muñoz, N., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., Shah, K.V., 1994. The role of HPV in the etiology of cervical cancer. *Mutat. Res.* 305, 293–301.
- Muraoka, R.S., Lenferink, A.E.G., Law, B., Hamilton, E., Brantley, D.M., Roebuck, L.R., Arteaga, C.L., 2002. Erb2/Neu-induced cyclin D1-dependent transformation is accelerated in p27-haploinsufficient mammary epithelial cells but impaired in p27-null cells. *Mol. Cell Biol.* 22 (7), 2204–2219.
- Nath, R., Mant, C.A., Kell, B., Cason, J., Bible, J.M., 2006. Analyses of variant human papillomavirus type-16 E5 proteins for their ability to induce mitogenesis of murine fibroblasts. *Cancer Cell Int.* 6, 19–27.
- Nourse, J., Firpo, E., Flanagan, W.M., Coats, S., Polyak, K., Lee, M.H., Massague, J., Crabtree, G.R., Roberts, J.M., 1994. Interleukin-2 mediates elimination of p27^{Kip1} cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 372, 570–573.
- O'Brien, V., Grindlay, G.J., Campo, M.S., 2001. Cell transformation by the E5/E8 protein of bovine papillomavirus type 4. p27(Kip1), elevated through increased protein synthesis, is sequestered by cyclin D1-CDK4 complexes. *J. Biol. Chem.* 276, 33861–33868.
- Oetke, K., Auvinen, E., Pawlita, M., Alonso, A., 2000. Human papillomavirus type 16 E5 protein localizes to the Golgi apparatus but does not grossly affect cellular glycosylation. *Arch. Virol.* 145, 2183–2191.
- Ogiso, Y., Gutierrez, L., Wrathall, L.S., Lu, Y.Y., Blair, D.G., Clanton, D.J., Hwang, Y.W., Shih, T.Y., 1990. Transdominant suppressor mutations of the H-ras oncogene. *Cell Growth Differ.* 1, 217–224.
- Pim, D., Collins, M., Banks, L., 1992. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 7, 27–32.
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M., Koff, A., 1994a. p27^{Kip1}, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 8, 9–22.
- Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P., Massague, J., 1994b. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78, 59–66.
- Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A., Massague, J., 1995. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF- β . *Genes Dev.* 9, 1831–1845.
- Rodriguez, M.I., Finbow, M.E., Alonso, A., 2000. Binding of human papillomavirus 16 E5 to the 16 kDa subunit c (proteolipid) of the vacuolar H⁺-ATPase can be dissociated from the E5-mediated epidermal growth factor receptor overactivation. *Oncogene* 19, 3727–3732.
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., Howley, P.M., 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495–505.
- Schwartz, R.H., 1997. T cell clonal anergy. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 351–357.
- Seedorf, K., Krammer, G., Dürst, M., Suhai, S., Röwekamp, W.G., 1985. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* 145, 181–185.
- Serrano, M., Hannon, G.J., Beach, D., 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704–707.
- Sherr, C.J., Roberts, J.M., 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 9, 1149–1163.
- Sherr, C.J., Roberts, J.M., 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512.
- Straight, S.M., Hinkle, P.M., Jewers, R.J., McCance, D.J., 1993. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and affects the down-regulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J. Virol.* 67, 4521–4532.
- Straight, S.W., Herman, B., McCance, D.J., 1995. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J. Virol.* 69, 3185–3192.
- Suprynovicz, F.A., Disbrow, G.L., Krawczyk, E., Simic, V., Lantzky, K., Schlegel, R., 2008. HPV-16 E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells. *Oncogene* 27, 1071–1078.
- Swanson, C., Ross, J., Jackson, P.K., 2000. Nuclear accumulation of cyclin E/Cdk2 triggers a concentration-dependent switch for the destruction of p27^{Kip1}. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 7796–7801.
- Takami, K., Yana, I., Kurahashi, H., Nishisho, I., 1995. Multistep carcinogenesis in colorectal cancers. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 26, 190–196.
- Takuwa, N., Takuwa, Y., 1997. Ras activity late in G1 phase required for p27^{Kip1} down-regulation, passage through the restriction point, and entry into S phase in growth factor stimulated NIH3T3 fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 17, 5348–5358.
- Tomakidi, P., Cheng, H., Kohl, A., Komposch, G., Alonso, A., 2000. Modulation of the epidermal growth factor receptor by the human papillomavirus type 16 E5 protein in raft cultures of human keratinocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 407–412.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350–4354.
- Tsao, Y.P., Li, L.Y., Tsai, T.C., Chen, S.L., 1996. Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21^{Waf1/Cip1} gene expression in fibroblasts and keratinocytes. *J. Virol.* 70, 7535–7539.
- Tungteakkhun, S.S., Duerksen-Hughes, P.J., 2008. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch. Virol.* 153, 397–408.
- Ungermannova, D., Gao, Y., Liu, X., 2005. Ubiquitination of p27Kip1 requires physical interaction with cyclin E and probable phosphate recognition by SKP2. *J. Biol. Chem.* 280, 30301–30309.
- Velu, T.J., Beguinot, L., Vass, W.C., Zhang, K., Pastan, I., Lowy, D.R., 1989. Retroviruses expressing different levels of the normal epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biochem.* 39, 153–166.
- Vervoorts, J., Lüscher, B., 2008. Post-translational regulation of the tumor suppressor p27(KIP1). *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3255–3264.
- Werness, B.A., Levine, A.J., Howley, P.M., 1990. Association of the human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248, 76–79.
- Wise-Draper, T.M., Wells, S.J., 2008. Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. *Front. Biosci.* 13, 1003–1017.
- Yanagisawa, K., Kosaka, A., Iwahana, H., Nakanishi, M., Tominaga, S.I., 1999. Opposite regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors during contact inhibition. *J. Biochem.* 125, 36–40.
- Zhang, B., Spandau, D.F., Roman, A., 2002. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *J. Virol.* 76, 220–231.
- Zhang, K., Sun, J., Liu, N., Wen, D., Chang, D., Thomason, A., Yoshinaga, S.K., 1996. Transformation of NIH 3T3 cells by HER3 or HER4 receptors requires the presence of HER1 or HER2. *J. Biol. Chem.* 271, 3884–3890.
- Zhu, X.F., Liu, Z.C., Xie, B.F., Li, Z.M., Feng, G.K., Yang, D., Zeng, Y.X., 2001. EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 inhibits cell proliferation and arrests cell cycle in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett.* 169, 27–32.
- zur Hausen, H., 1996. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* 1288, F55–F78.