



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

*"CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE VARIANTES DE E6 DE HPV18  
EN EL  
PROCESO DE PROLIFERACIÓN CELULAR"*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A

*Imelda Martínez Ramírez*

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

*México D. F.*

*Febrero, 2006.*



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# **CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES DE E6 DE HPV18 EN EL PROCESO DE PROLIFERACIÓN CELULAR**

## **RECONOCIMIENTOS**

Esta Tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Marcela Lizano Soberón en el Departamento de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo constituido por:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa  
Dr. Julio Morán Andrade  
Dra. Marcela Lizano Soberón

Instituto de Fisiología Celular, UNAM  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM  
Instituto Nacional de Cancerología

El Jurado de Examen de grado estuvo constituido por:

Presidente: Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal: Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario: Dra. Leticia Rocha Zavaleta	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente: Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordáz	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplante: Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM

A quienes les agradezco todos sus comentarios y sugerencias para el mejoramiento de este trabajo de tesis.

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo recibido por:

El Instituto Nacional de Cancerología, México, DF  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Proyecto 41313

Durante mis estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

## DEDICATORIA

*A quien me motivó para emprender este hermoso camino de la ciencia y a quien amo profundamente: Elías, mi amado esposo.*

*A quienes han dado toda su vida a cambio de la mía y cuyas enseñanzas permanecerán en mí por siempre, mis padres: Salvador y Cristina, Los amo con todo mi corazón.*

*A mis hermanos Irene y Marcos, a quienes amo, admiro y extraño y siempre me motivan para seguir adelante.*

*A mis otros dos seres amados, Rosy y Kelly. Muchas gracias por estar conmigo.*

*A la Doctora Marcela Lizano Soberón quien se ha ganado mi admiración y respeto además de mi más profundo cariño.*

## *AGRADECIMIENTOS*

*A ti padre, porque todas y cada una de mis vivencias siempre valdrán la pena porque pude encontrarte. Gracias por darle un nuevo sentido a mi vida.*

*A la doctora Marcela Lizano por la oportunidad que me brindó para formar parte de su Grandioso equipo de trabajo aún sin conocerme y por haber participado en gran medida en mi formación.*

*A Elías y al Dr. Pedro Z. por su gran apoyo y entusiasmo para seguir adelante en esta forma de vida.*

*A todos mis compañeros y amigos que saben que sin su apoyo mi vida no sería la misma.*

*A Lety García, porque no se que haríamos sin ti! Gracias por todo tu apoyo y amistad. Felicidades por tu excelente trabajo.*

*El que ama la Instrucción, ama la Sabiduría.  
Proverbios. 12:1*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>Cáncer</b> -----	<b>5</b>
<b>El cáncer Cérvico-uterino</b> -----	<b>7</b>
<b>El CaCU y su relación con el HPV</b> -----	<b>9</b>
<b>El virus de papiloma humano</b> -----	<b>11</b>
<b>Generalidades</b> -----	<b>11</b>
<b>Estructura y regulación del genoma viral</b> -----	<b>12</b>
<b>E6</b> -----	<b>14</b>
<b>Alteraciones del ciclo celular inducidas por E6</b> -----	<b>18</b>
<b>Modulación de apoptosis por E6</b> -----	<b>20</b>
<b>E6*I, un producto del procesamiento de E6</b> -----	<b>21</b>
<b>Variantes de HPV</b> -----	<b>23</b>
<b>ANTECEDENTES</b> -----	<b>25</b>
<b>HIPÓTESIS</b> -----	<b>30</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> -----	<b>30</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> -----	<b>30</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> -----	<b>31</b>
<b>Cultivo celular</b> -----	<b>31</b>
<b>Ensayos de PCR</b> -----	<b>31</b>
<b>Ensayos de RT-PCR</b> -----	<b>32</b>
<b>Obtención de proteínas celulares</b> -----	<b>33</b>



<b>Cuantificación de proteínas (Ácido Bicinónico)-----</b>	<b>33</b>
<b>Separación de proteínas y ensayo de Western Blot-----</b>	<b>33</b>
<b>Proliferación celular por el método de cristal violeta-----</b>	<b>35</b>
<b>Proliferación celular por el método de Citometría de flujo-----</b>	<b>35</b>
<b>RESULTADOS-----</b>	<b>37</b>
<b>DISCUSIÓN-----</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSIONES-----</b>	<b>59</b>
<b>REFREFERENCIAS-----</b>	<b>60</b>

## RESUMEN

El virus del Papiloma Humano (HPV) es el principal agente etiológico del cáncer Cérvico uterino. Solo una mínima proporción de las infecciones con HPV de alto riesgo progresan a cáncer invasor, por lo que se requiere de factores adicionales; uno de estos podría ser la variación intratipo de HPV. En México se han aislado 3 variantes de HPV18: el aislado de referencia (As-Ai), la variante Europea (E) y la Africana (Af). Esta última, asociada a un comportamiento biológico menos agresivo.

**OBJETIVO.-** Determinar si las proteínas E6 de las variantes de HPV18 presentan diferencias funcionales, en la degradación de proteínas blanco (p53, Bax y hDLG), y en el proceso de proliferación celular.

**MÉTODOS.-** Células C33 y MCF7 transfectadas con E6 variantes fueron analizadas en su capacidad de proliferación por Cristal violeta y Citometría de Flujo. Los niveles de proteínas blanco de HPV en las células transfectadas con E6 fueron analizados mediante ensayos de Western Blot.

**RESULTADOS.-** Las E6 variantes de HPV18 mostraron un patrón de comportamiento diferencial medido por los niveles de sus proteínas blanco. La tasa de proliferación celular fue significativamente diferente en las células transfectadas con las variantes de E6. La variante E6Af presentó los mayores niveles de estas proteínas y menor proliferación celular. Se demostró que la proliferación celular promovida por las variantes de E6 de HPV18 es independiente de p53.

**CONCLUSIONES.-** Pequeñas diferencias en la secuencia de E6 de HPV18 son suficientes para repercutir en diferencias tanto a nivel de su acción sobre proteínas

blanco, como en la proliferación celular. Esto podría explicar en parte porqué infecciones con un mismo tipo de HPV, presentan comportamientos biológicos diferentes.

## INTRODUCCIÓN

### CÁNCER

Después de un cuarto de siglo de rápidos avances, la investigación sobre el cáncer ha generado un vasto cuerpo de conocimiento con una complejidad importante. Esta investigación muestra que el cáncer es una enfermedad que involucra cambios dinámicos en el genoma celular. Estas alteraciones son mutaciones sobre oncogenes que confieren ganancia en la función celular o en genes supresores tumorales que inducen pérdida en alguna función celular. Aunque las reglas que gobiernan la transformación de las células humanas normales en cancerosas no se conoce por completo, el proceso tumoral en los humanos es un proceso multifacético que refleja alteraciones, principalmente genéticas, que dirigen esta transformación progresiva en células malignas (Hanahan y Weinberg, 2000). Recientemente se ha propuesto, en base a evidencias acumuladas, que modificaciones epigenéticas tienen un papel crucial en el desarrollo del cáncer. Tales modificaciones epigenéticas pueden inducir hipometilación conduciendo a activación de oncogenes e inestabilidad del cromosoma; hipermetilación resultando en el silenciamiento de genes supresores de tumores; remodelamiento de la cromatina, y silenciamiento asociado a RNA (Hsin Pai et al., 2005).

El genoma de las células tumorales se encuentra alterado en múltiples sitios lo cual conduce a un desarrollo tumoral a través de un proceso análogo a la evolución Darwiniana, en el cual una sucesión de cambios genéticos, confieren

algún tipo de ventaja en el desarrollo conduciendo a la transformación progresiva de célula normal a cancerosa.

Las células cancerosas tienen defectos en los sistemas reguladores que gobiernan la proliferación y la homeostasis celular normal. Estos defectos conducen a una gran variedad de tipos y subtipos de cáncer que provocan múltiples preguntas principalmente encaminadas a saber como una célula adquiere malignidad.

La investigación actual sobre el cáncer muestra que estos tipos celulares se encuentran alterados en seis puntos de su fisiología que dictan el crecimiento maligno de los mismos: a) independencia a las señales de crecimiento, b) potencial replicativo ilimitado, c) insensibilidad a las señales que inhiben el crecimiento, d) angiogénesis sostenida, e) evasión de apoptosis, y f) invasión tisular y metástasis (**Figura 1**). Cada uno de estos cambios fisiológicos refleja la ruptura de los mecanismos de defensa anticancerígenos en las células y los tejidos (Hanahan y Weinberg, 2000).



Figura 1. **Alteraciones en una célula cancerosa.** Se esquematizan las alteraciones celulares en seis puntos de su fisiología que dictan el crecimiento maligno.

## EL CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

El cáncer cervical (CaCu) es un tipo de cáncer que se sitúa en el cérvix uterino, en la porción inferior y estrecha del útero que desemboca en la vagina. Es en esta porción donde las células se malignizan originando el cáncer (**Figura 2**). El 90% de los tumores invasores del cérvix ocurren en la zona de transformación del cuello uterino, que es la unión entre el epitelio columnar del endocérvix y el epitelio escamoso del ectocérvix.

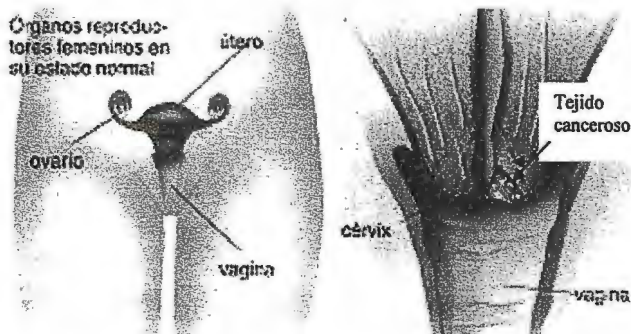


Figura 2. Localización del cáncer cervical. El cáncer cervical se puede desarrollar en cualquier porción del cervix aunque predomina en la zona de transformación.

A nivel mundial, el CaCU es un problema de salud pública importante que ocupa el segundo lugar de frecuencia de cáncer entre mujeres (Bekkers RL et al., 2004). Asimismo, al año se diagnostican más de 400,000 nuevas víctimas (Hwang et al., 1995), con una tasa de mortalidad del 50% (Parkin et al., 1999, Da Silva et al., 2001) y de estos, el 80% ocurren en países en vías de desarrollo (Alonso et al., 2000). En México el CaCU ocupa el primer lugar en mortalidad en mujeres de 25 a 64 años y el tercer lugar en la población general (Mohar et al., 2000). Por lo anterior, el CaCU sigue siendo una de las principales causas de muerte relacionada con cáncer en la mujer (Da Silva et al., 2001). La causa precisa, como ocurre en la mayoría de los cánceres, es desconocida. Sin embargo, se cree que los siguientes factores incrementan el riesgo:

- a) Tener una vida sexual activa precoz (antes de los 18 años).
- b) Tener múltiples compañeros sexuales.
- c) Haber tenido verrugas genitales.
- d) Fumar durante mucho tiempo.

- e) Tener displasia cervical (anomalías en el tamaño, forma y número de células cervicales).
- f) El uso de anticonceptivos orales.
- g) Haber tenido herpes genital.
- h) Haber estado expuesta a la hormona sintética dietilestilbestrol antes del nacimiento.

Entre las causas que se asocian al desarrollo de CaCU destaca la participación del virus de Papiloma Humano (HPV) como la causa principal (Figura 3).

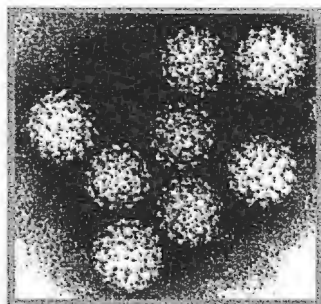


Figura 3. Microscopía electrónica del Papilomavirus Humano.

## EL CaCU Y SU RELACIÓN CON EL HPV

Un estudio conjunto realizado por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) concluyó que, en base a la epidemiología y a datos de laboratorio, la infección con papilomavirus humano debería ser considerada como la causa del desarrollo del cáncer cervical (Bosch FX et al., 1992). El HPV se clasifica en base a su asociación con tumores invasores, lesiones precursoras de alto grado o proliferaciones epiteliales benignas en dos categorías: de alto y bajo riesgo (Schiffman MH et al., 1993)



(**Tabla 1**), asimismo, también se pueden dividir en aquéllos que infectan superficies cutáneas y los que infectan las superficies mucosas. Esta clasificación del HPV se debe a las alteraciones genéticas provocadas por las oncoproteínas del virus en los mecanismos de control del ciclo celular (White A., et al, 1994; Demers G., et al, 1994; Slebos R., et al, 1994). Dado que no existe un consenso que se refiera a la categorización de muchos tipos de HPV con baja prevalencia de acuerdo al riesgo, se ha propuesto una clasificación en base a su relación filogenética. Para hacer esta agrupación, se utilizó un árbol filogenético de 106 tipos de papilomavirus en base al alineamiento de las secuencias. Entre los 33 tipos de HPV que fueron examinados, los tipos 16, 31, 33, 35, 52, 58, 18, 39, 45, 59, 68, 70, 26, 51, 82, 53, 56 y 66, fueron filogenéticamente clasificados como tipos de alto riesgo. En contraste, tipos 6, 11, 44, 34, 73, 40, 43, 42, 72, 81, 83, 84, CP6108 y 57 fueron clasificados como tipos de bajo riesgo. Posteriormente el estudio realizado por Muñoz et al., (2003) mostró una fuerte coincidencia entre esta clasificación epidemiológica y la filogenético (**Tabla 1**).

<b>Tabla 1. Clasificación filogenética y epidemiológica de HPV</b>		
<b>Clasificación Filogenética</b>	<b>Clasificación epidemiológica</b>	
	Alto Riesgo	Bajo Riesgo
Alto Riesgo	16, 18,31,33,35,39, 45,51,52,56,58,59 68,82,26*,53*,66*	70
Bajo Riesgo	73	6,11,40,42,43,44 54,61,72,81, CP6108

\*La clasificación epidemiológica de esos tipos como probables de alto riesgo es en base sobre cero controles y uno de tres casos positivos. Muñoz N et al. 2003.

## EL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

### Generalidades

El virus de Papiloma Humano está formado por DNA de doble cadena, el cual cuenta con aproximadamente 8000 pb, que está contenido en la cápside viral compuesta de 72 capsómeros y tiene un diámetro entre 52 y 55 nm. Este virus tiene forma icosaédrica y, como característica, infecta las células del epitelio estratificado multiplicándose en el núcleo de las mismas. En la actualidad se conocen más de 200 tipos de HPV, los HPVs considerados de "bajo" riesgo son aquellos localizados en verrugas epiteliales o genitales mientras que los tipos de "alto riesgo" son detectados en carcinomas y displasias (Clavel C et al., 1999, Lörinez AT, et al., 1992).

En más del 99% de las lesiones precursoras y de cáncer invasor del cérvix se ha encontrado el genoma de algunos tipos de HPV de alto riesgo (Bosch et al.,

1995: Walboomers et al., 1999), entre los cuales los tipos de HPV16 y HPV18 son los que se encuentran con mayor frecuencia en los carcinomas cervicales (50% y 25% de los casos, respectivamente). El DNA de HPV16 se encuentra en aproximadamente el 50% de carcinomas de células escamosas, mientras que el DNA de HPV18 está en el 50% de los adenocarcinomas (Milde-Langosch et al., 1993), siendo estos últimos los más agresivos, ya que estos no se han encontrado relacionados con el desarrollo de lesiones preinvasoras

### **Estructura y regulación del genoma viral**

El genoma de los papilomavirus comprende 2 regiones codificantes, una denominada región temprana o E (Early) y la otra conocida como región tardía, L (Late), las cuales se encuentran separadas por una región no codificante llamada Región Larga de Control (LCR) de aproximadamente 1.0 kb (Zur Hausen H., 1996). La región E, está formada por los genes E1, E2, E4-E7 que se expresan en infecciones tempranas y latentes por el virus, estos genes contienen la información necesaria para la replicación viral y la transformación de la célula. La región L, contiene los genes L1 y L2, que codifican proteínas estructurales del virus y que se expresan en la infección productiva. La región LCR, que cubre alrededor del 10% del genoma, se localiza entre el final del marco abierto de lectura (ORF) de L1 y al principio del ORF de E6 (**Figura 4**).

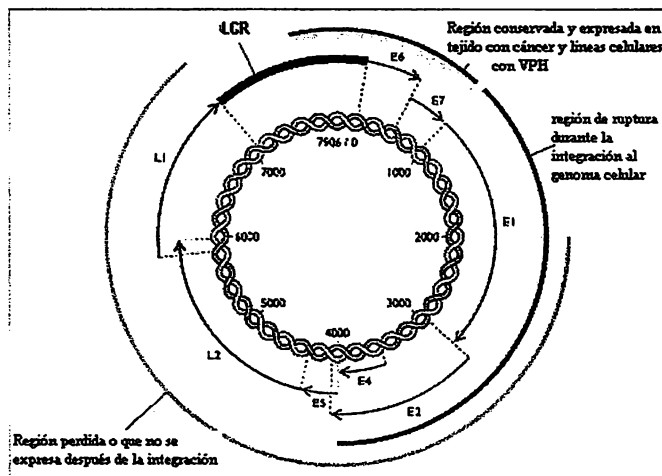


Figura 4. Estructura del Genoma viral. Se muestra un esquema del genoma viral en estado episomal donde se señalan los marcos de lectura que conforman el genoma viral, genes de expresión temprana y genes de expresión tardía. Además se señala la región que se conserva en tejidos con cáncer y líneas celulares; la región de ruptura durante la integración al genoma celular y la región que no se expresa después de la integración.

La regulación de la expresión del genoma viral es compleja y está controlada tanto por factores de transcripción virales como celulares. La mayor parte de esta regulación ocurre dentro de la región LCR. La proteína E1 se une a sitios específicos del DNA, interactúa con la DNA polimerasa alfa, posee actividad de helicasa dependiente de ATP, interactúa con la proteína E2 e interviene en la replicación del virus.

Por su parte la proteína E2 actúa como factor de transcripción afectando la expresión de los genes E6 y E7 (Bauvard et al., 1994).

Aunque la participación de la proteína E4 en el ciclo de vida del HPV no está clara, se sabe que no es requerida para la transformación ni para la

persistencia episomal del DNA del virus, pero desestabiliza estructuras de citoqueratinas.

La proteína E5 posee actividad transformante, expresándose en infecciones productivas, aunque el marco de lectura que codifica para esta proteína frecuentemente se encuentra suprimido en las células de cáncer de cérvix, lo que sugiere la ausencia de función de este gen en el mantenimiento del fenotipo maligno de las células cancerígenas (Crusius et al., 1997).

Los principales genes transformantes de HPV los constituyen E6 y E7. Estudios moleculares han demostrado que las proteínas E6 y E7 son capaces de immortalizar queratinocitos humanos *in vitro* y probablemente están involucradas en la transformación maligna del epitelio cervical interactuando fuertemente con proteínas reguladoras del ciclo celular, como son p53 y pRb (Dyson N., et al., 1989; Werness B. A., et al, 1990). La expresión continua de E6 y E7 es necesaria para mantener la proliferación y el carácter anti-apoptótico de las células derivadas de cáncer cervical (Francis et al., 2000).

Por otro lado, las proteínas L1 y L2 son los constituyentes de la cápside viral, la proteína L1 es la más abundante y forma aproximadamente el 80% del total de la cápside viral mientras que la proteína L2 forma el resto.

## E6

La proteína E6 es un polipéptido pequeño que contiene aproximadamente 150 aminoácidos, dependiendo del tipo de HPV del que provenga, con un peso molecular aproximado de 18 Kda. Las proteínas E6 de diferentes tipos de HPVs muestran homología moderada entre aminoácidos. La característica común de la mayoría de estas proteínas es la presencia de cuatro dominios de Cys-X-X-Cys



En cuanto a la interacción con proteínas, E6 puede unirse con la proteína celular p53 a través de la proteína E6AP que funciona como ubiquitin ligasa conduciendo a su degradación por ubiquitinación (Huibregtse et al., 1991; Scheffner et al., 1993), lo que da como resultado la pérdida de un punto de control en la fase G1 y resistencia a la apoptosis mediada por p53, viéndose afectados genes blanco de p53, tal es el caso del gen *bax* (Lechnert y Laimins, 1994).

Se ha visto que E6 interactúa con múltiples proteínas celulares que incluyen: E6BP (también referida como ERC55) una proteína de posible unión a calcio (Chen et al., 1995); paxilina, una proteína involucrada en procesos de adhesión celular, relacionada con la transducción de señales de la membrana plasmática al citoesqueleto de actina (Tong y Howley et al., 1997); clatrina, un adaptador del complejo Ap-1, homólogo de la proteína supresora de tumores de discos grandes de la *Drosophila* (hDlg) (Gardioli et al., 1999); además la proteína proapoptótica Bak, receptor 1 del factor de necrosis tumoral y las proteínas reparadoras del DNA MGMT y XRCC1 (Filippova et al., 2002; Iftner et al., 2002) entre otras (Mantovani y Banks, 2001; Rapp y Chen, 1998) (**Tabla 2**).

Se ha demostrado que la proteína hDlg resulta esencial como un regulador de las uniones intercelulares y se clasifica como un potente supresor de tumores en eucariontes superiores. El gen hDIG humano se expresa en células epiteliales en los sitios de contacto célula-célula y actúa como un regulador negativo de la proliferación celular. Se ha demostrado que el gen E6 de HPV18 se une más fuertemente a hDIG, promoviendo su degradación, que E6 de HPV16 (Gardioli, 1999).

<b>Tabla 2. Proteínas con las que interactúa E6</b>		
<b>1.- ASOCIACIÓN A PROTEÍNAS</b>	<b>TIPOS DE E6</b>	<b>FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA BLANCO</b>
E6-AP	HPVs de alto riesgo y BPV1	Ubiquitín ligasa
E6-BP	HPVs de alto riesgo y BPV1	Proteína de unión a calcio
Paxilina	HPV16 y BPV1	Proteína de adhesión focal
AP-1	BPV1	Adaptador de claritina (trans-Golgi)
Tuberina	HPV16	Supuesto supresor de tumor
IRF-3	HPV16	Interferón regulatory factor-3
CBP/p300	HPV16 y BPV1	Coactivador transcripcional
PKN	HPV16	Serina/Treonin cinasa
Tyk2	HPV18	Tirosin cinasa
Zyxin	HPV6	Proteína de adhesión focal
TNF R1	HPV16	Receptor I del Factor de Necrosis Tumoral
Fibulin-1	HPVs de alto riesgo HPV	Proteína de Matriz extracelular
XRCC1	HPV1, 8, 16	Reparador de una sola cadena de DNA.
<b>2.- PROTEÍNAS QUE DEGRADA</b>		
P53	HPVs de alto riesgo	Supresor de Tumor
Myc	HPV16	Oncoproteína
Bak	HPV18 y HPVs cutáneos	Proteína proapoptótica
hMCM7	HPVs de bajo y alto riesgo	
E6TP1	HPVs de alto riesgo	
hDlg	HPVs de alto riesgo	Supresor de Tumor
MUPP1	HPV18	Adaptador en señalización?
hScrib	HPV16	Supresor de Tumor
Gps2/AMF-1	HPVs de bajo y alto riesgo	Factor de Transcripción
MAGIs	HPVs de alto riesgo	Relacionado a Dlg
MGMT	HPVs de alto riesgo	Proteína de reparación del DNA
hADA3	HPVs de alto riesgo	Coactivador transcripcional



### **Alteraciones del ciclo celular inducidas por E6**

La progresión del ciclo celular eucariótico es estimulado por complejos de proteínas cinasas, cada uno de los cuales consiste de una ciclina y una cinasa dependiente de ciclina (CDK) (Stewart et al., 2003). La actividad de las CDKs está regulada por ciclinas, inhibidores de CDK y fosforilación (Sherr y Roberts, 1999). La progresión del ciclo celular es regulada en puntos de supervisión que representan puntos de control dentro del ciclo celular que aumentan la eficacia de reparación del DNA (Paulovich et al., 1997). Los defectos en la función de estos puntos contribuyen a la inestabilidad genética observada en el cáncer (Hartwell y Kastan, 1994).

La proteína E6 interrumpe estos puntos de control del ciclo celular (**Figura 6**); lo que contribuye a la inestabilidad observada en células que expresan esta proteína viral (Renznikoff et al., 1994; White et al., 1994; Xiong et al., 1996). La forma en la cual E6 realiza estas alteraciones es por interacción con proteínas que reparan el DNA o por duplicación de centrosomas de la división del ciclo celular (Duensing et al., 2000, 2001a,b; Ifner et al., 2002).

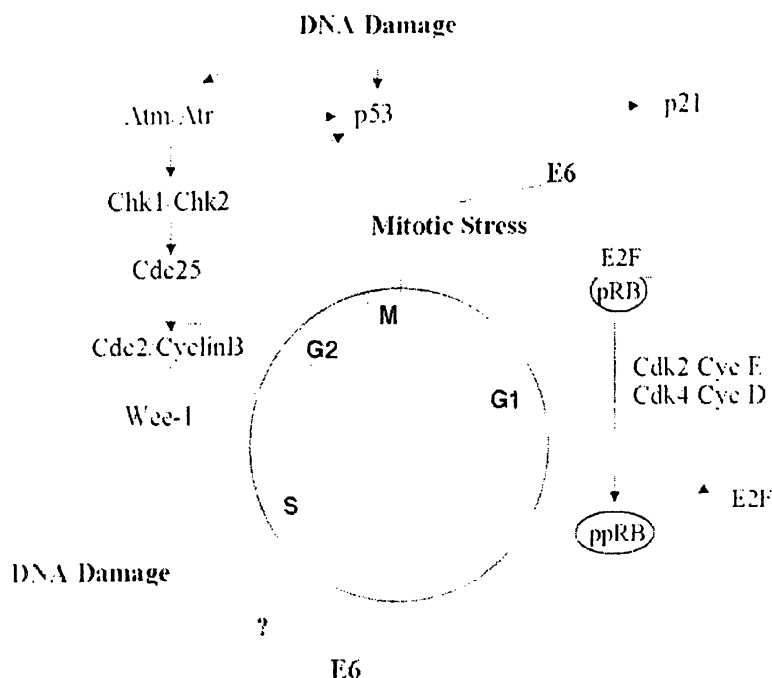


Figura 6. Interrupción de puntos de regulación del ciclo celular por E6. Bajo condiciones de estrés, p53, proteína importante para la inducción de arresto en G1 y transición G2/M, es activada. Por lo tanto la degradación de p53 por E6 interrumpe el arresto en G1 afectando también el punto de control G2/M.

E6 tiene la capacidad de interactuar con p53 (regulador del daño al DNA) promoviendo su degradación impidiendo que el daño en el DNA sea reparado.

Entre otras posibles asociaciones de HPV con los procesos de proliferación celular se encuentran las interacciones de la oncoproteína E6 con las proteínas, c-myc (Veldman T. et al., 2003) y proteínas guanilato quinasa asociadas a membrana (MAGUK) incluyendo Dlg. La familia de proteínas myc son un grupo de factores de transcripción estructuralmente relacionados, involucrados en una gran variedad de procesos de regulación celular. El oncogen c-myc ha sido implicado en el control de la proliferación celular normal y apoptosis. Estudios recientes muestran que la

expresión celular de E6 de HPV16 estimula la degradación de la proteína c-myc *in vitro*, aunque también se ha visto que E6 puede activar la transcripción de esta (Gross-Mesilaty et al., 1998). Las proteínas MAGUKs son localizadas en regiones de contacto célula-célula. Se ha demostrado que E6 también degrada a la proteína DLg, esencial para la regulación de ciclo celular y polaridad en *Drosófila*, aunque también se ha visto que esta proteína tiene como función estabilizar en la membrana a la proteína PTEN, un inhibidor de la ruta de AKT responsable de la activación de NFkB proteína relacionada con proliferación celular.

### **Modulación de apoptosis por E6**

La apoptosis es un proceso de muerte celular que elimina aquellas células ineficientes o con alteraciones en su DNA que no pueden ser reparadas. La apoptosis inapropiada puede causar enfermedades degenerativas y la falla de una apoptosis apropiada contribuye a enfermedades como el cáncer. Se sabe que hay proteínas virales que pueden modular la apoptosis, tal es el caso de la proteína E6 cuya actividad antiapoptótica se le atribuye en parte a su capacidad para degradar proteínas involucradas en el proceso apoptótico, como p53, c-Myc, FADD y Bak, a través de la ruta proteosómica (**Figura 7**).

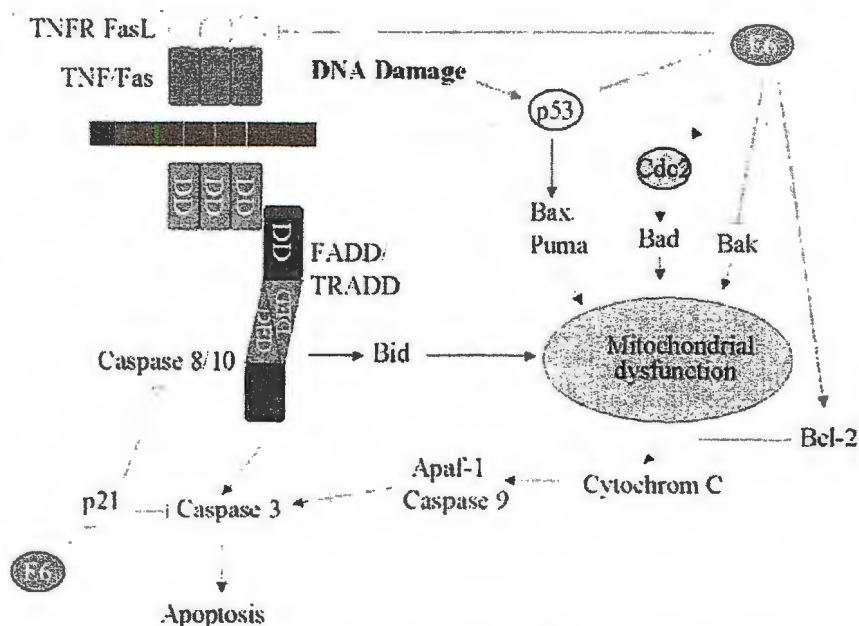


Figura 7. Regulación de apoptosis por E6. Se han propuesto múltiples niveles de regulación de apoptosis por E6. E6 se une a TNFR o puede reducir la superficie de expresión de Fas para inhibir el estado inicial de apoptosis o se puede presentar una disminución de la regulación de Bak/p53 y una regulación aumentada de Bcl-2 contribuyendo a la función antiapoptótica de E6.

### E6\*1, un producto del procesamiento de E6

Los HPVs difieren marcadamente en los patrones de transcripción de los genes de la región temprana tal es el caso de E6 (Smotkin et al., 1989). Los patrones de transcripción de E6 de los HPVs de alto riesgo dan lugar a diversas alternativas de procesamiento, las cuales generan un patrón complejo de RNAs (Czeglédy et al., 1994). La regulación de este procesamiento aún no se comprende bien, pero en la mayoría de los casos se relaciona tanto con el sitio donador, cuya posición es aproximadamente en el nucleótido 233 del marco de

lectura de E6, y una serie de receptores de ajuste hacia abajo del marco de lectura. Entre los polipéptidos codificados por tales transcritos se encuentran cuatro proteínas truncadas de E6, llamadas E6\* I-IV (Figura 8).

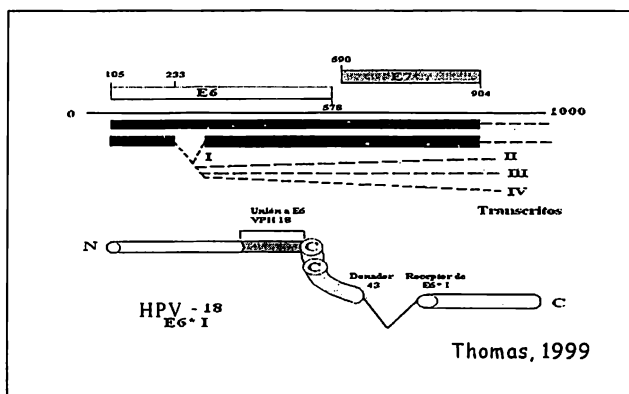


Figura 8. Procesamiento del gen E6 de HPV18. El gen E6 de HPV18 sufre un procesamiento alternativo produciendo proteínas más pequeñas conocidas como E6\* 1-4.

Aparentemente, la proteína E6\*I traducida *in vitro* es inestable, lo que explicaría los bajos niveles de la misma observados en líneas celulares (Pim et al., 1997). La traducción *in vitro* de E6\*I puede inhibir la degradación de p53 por E6 dependiente de ubiquitina (Pim et al., 1997). En células que carecen de p53 se observó que la coexpresión de E6\*I con p53 en presencia de E6, resulta en la inhibición de la degradación de p53 por E6 (Pim D y Banks L, 1999).

Se sugiere que E6\*I es capaz de unirse a E6 y a E6-AP, pero no a p53 dado que pierde los sitios de unión a la misma (Thomas et al., 1999) (Figura 9). Sin embargo, el análisis mutacional de E6\*I ha mostrado que la actividad

antiproliferativa de esta proteína se correlaciona principalmente con la habilidad de interactuar con E6, más que con E6-AP (Pim y Banks et al., 1999). Esto sugiere que una de las funciones de E6\*I es modular la degradación de p53 durante la replicación viral. La expresión ectópica de E6\*I tiene un efecto antiproliferativo en líneas celulares derivadas de tumores cervicales (Pim D y Banks L. 1999, y Pim D, Massimi P y Banks, 1997) seguramente debido a la protección de p53.

---

**MARFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVPAVP  
ETVESSRKT\***

Figura 9. Secuencia de la proteína E6\*I. Se utilizó una sola letra para designar los aminoácidos. En negritas se señala el dominio de zinc (CXXC) conservado. La secuencia subrayada indica los aminoácidos modificados en E6\*I después del splicing debido a un cambio en el marco de lectura. El asterisco indica un codón de paro en la secuencia. Se señala el dominio de unión a E6 conservado en E6\*I.

## VARIANTES DE HPV

Actualmente se conocen más de 200 tipos de HPVs identificados de acuerdo a su homología en su secuencia nucleotídica la cual varía en un 10% de cualquier otro tipo conocido.

Las variantes se definen como aquellos aislados de HPV que varían en menos del 2% con respecto al tipo viral de referencia en regiones conservadas del genoma, como E6, E7, L1 y L2 (Bernard et al., 1994).

Aunque se sabe que el HPV, tiene un papel crucial como agente etiológico del cáncer cérvico-uterino, sólo una pequeña proporción de las lesiones cervicales infectadas con el virus de alto riesgo avanzan a cáncer, lo cual indica la presencia

de factores adicionales. Un factor viral muy importante podría ser la variación intratipo.

Ciertas evidencias epidemiológicas sugieren que las variaciones genéticas en HPV pueden estar involucradas en el desarrollo de infecciones persistentes o en un mayor riesgo al desarrollo de cáncer de cérvix (Xi et al., 1997; Zehbe et al, 1998).

Algunos de los cambios en aminoácidos de ciertas proteínas de los HPVs podrían afectar dominios antigénicos funcionales, lo que a su vez, al cambiar propiedades biológicas e inmunológicas, daría diferencias en comportamiento y patogenicidad de ciertas variantes de HPVs de alto riesgo (Ellis et al., 1995, Hecht et al., 1995; Stöppler et al., 1996).

La diversidad intra-tipo de HPV-18 guarda muchas similitudes con HPV-16. Actualmente se han detectado 3 ramas filogenéticas principales para HPV-18 (Europea, Africana y Asiática/Amerindia; Ong et al., 1993) (**Figura 10**).

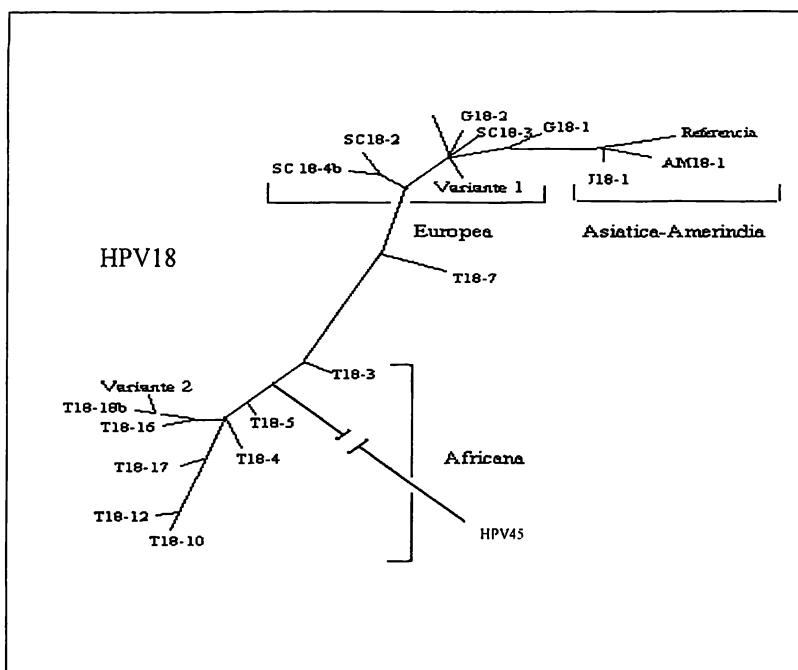


Figura 10. Clasificación filogenética de HPV 18. Se muestra la clasificación de las variantes de E6 de HPV18 de la población mexicana. La variante de referencia se ha ubicado en la rama Asiático-Amerindia, variante 1 en la rama Europea y la variante 2, ubicada a la rama Africana (Ong et al., 1993).

## ANTECEDENTES

Dentro de los tipos de HPV de alto riesgo, HPV18 es de particular importancia puesto que se ha observado que este virus se asocia preferentemente con los tumores más agresivos y menos diferenciados (Arends et al; 1993). La presencia de HPV18 se correlaciona con una mayor posibilidad de recurrencia tumoral y de metástasis a nódulos linfáticos. Sin embargo, a pesar de su naturaleza agresiva, en algunas ocasiones HPV 18 se asocia con un fenotipo



diferente, característico de las infecciones con tipos de HPV de bajo riesgo (McLachlin et al; 1994).

Hecht et al., (1995) reportaron un subtipo de HPV18 encontrado en más del 40% de las muestras con LIE (lesión intraepitelial cervical), pero no entre los casos de cáncer por lo que las consideró como muestras con una oncogenicidad disminuida. Posteriormente Lizano et al., en 1997 reportaron variantes de HPV18 encontradas en la población mexicana donde se presentó una aparente asociación entre un aislado de HPV18 (variante Africana-Af), y el carcinoma de células escamosas, en contraste con la clona de referencia (Variante Asiático amerindia-As-Ai) asociada con otros tipos histológicos como adenocarcinoma, carcinoma adenoescamoso y de células pequeñas (considerado el más agresivo). Esta asociación sugiere que el aislado de la variante Africana puede presentar un comportamiento menos agresivo, puesto que los carcinomas escamosos tienen un mejor pronóstico que los otros grupos de tumores estudiados.

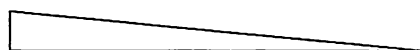
Con el propósito de evaluar si existen diferencias funcionales entre las variantes de HPV18 encontradas en la población mexicana (Asiático-Amerindia, Europea y Africana), en un trabajo previo en nuestro grupo, se clonaron y secuenciaron los genes E6, E7, E2 y LCR de los diferentes aislados. Las secuencias mostraron cambios importantes que pudieran representar regiones críticas en las funciones de los genes E6, E2 y LCR. En la var 2 de E6 se encontraron 10 cambios a nivel de nucleótidos con respecto a la clona de referencia a diferencia de la var 1 donde sólo 3 cambios estuvieron presentes, mismos que estuvieron incluidos en la variante 2. De los diez cambios presentes, dos afectaron la secuencia de aminoácidos de la variante 2. El primer cambio se

presentó en el nucleótido 342, una citosina por una timina, provocando que el aminoácido 80, aminoácido cargado positivamente (Histidina-H), en la variante 2 sea un aminoácido aromático sin carga (Tirosina-Y). El segundo cambio ocurrido en el nucleótido 491, una citosina por una adenina, que repercute en el cambio del aminoácido 129, un aminoácido polar sin carga (Asparagina-N) por uno cargado positivamente (Lisina-K) (Tabla 3). El gen E7 mostró menos cambios, reafirmando que es un gen más conservado. A su vez, la secuencia del gen E2 de la variante 2 mostró que esta variante es similar a la reportada por Hecht y col (1995), en cuyo trabajo propone que se trata de una variante con un menor riesgo oncogénico.

Tabla 3. Cambios observados tanto a nivel de nucleótidos como a nivel de proteínas entre los aislados de HPV18 encontrados en la población mexicana.							
Posición	E6As-Ai	E6E	E6Af	Posición	E6As-Ai	E6E	E6Af
251	T	--	C	49	Fenilalanina-F	--	*
266	G	--	A	54	Valina-V	--	*
287	C	G	G	61	Prolina-P	*	*
317	T	--	C	71	Fenilalanina-F	--	*
<b>342</b>	<b>C</b>	--	<b>T</b>	<b>80</b>	<b>Histidina-H</b>	--	<b>Tirosina-Y</b>
374	G	--	A	90	Leucina-L	--	*
485	T	C	C	127	Fenilalanina-F	*	*
<b>491</b>	<b>C</b>	--	<b>A</b>	<b>129</b>	<b>Asparagina-N</b>	--	<b>Lisina-K</b>
548	A	--	G	148	Glutamato-E	--	*
549	C	A	A	149	Arginina-R	*	*



Grado de Oncogenicidad



Grado de Oncogenicidad

Por otra parte, se analizó la distribución de los distintos aislados de HPV18 en lesiones positivas a este tipo viral y que conforman la historia natural del cáncer de cérvix, es decir, epitelio normal de cérvix, lesiones de bajo y alto grado y cáncer invasor. Se observó que la variante 2 predomina en lesiones de bajo y alto grado, donde no se encontró ninguna variante 1; mientras que la variante 1 predomina en cáncer invasor, en donde var-2 es poco frecuente. Esto refuerza la hipótesis de que las lesiones positivas a la variante 2 pudieran presentar un mejor pronóstico que las que contienen a var-1 o la clona de referencia (Lizano et al., aceptado para publicación). Asimismo, se analizó la expresión de los genes E6 transfectados en la línea celular MCF7 (provenientes de cáncer de mama) y el patrón de transcripción observado fue diferente en las distintas clonas celulares. Las células con el gen E6 Asiático-Amerindio y Europeo presentaron al transcrito E6 completo y el producto de procesamiento E6\*I en una proporción semejante. Mientras que en aquellas células con el aislado Africano de E6, se transcribe principalmente E6\*I y una cantidad muy inferior del transcrito E6 completo (**Figura 11**). Además, el análisis preliminar de los patrones de transcripción de tumores positivos a HPV18, mostró un enriquecimiento preferencial de E6\*I en los tumores que contenían la variante 2.

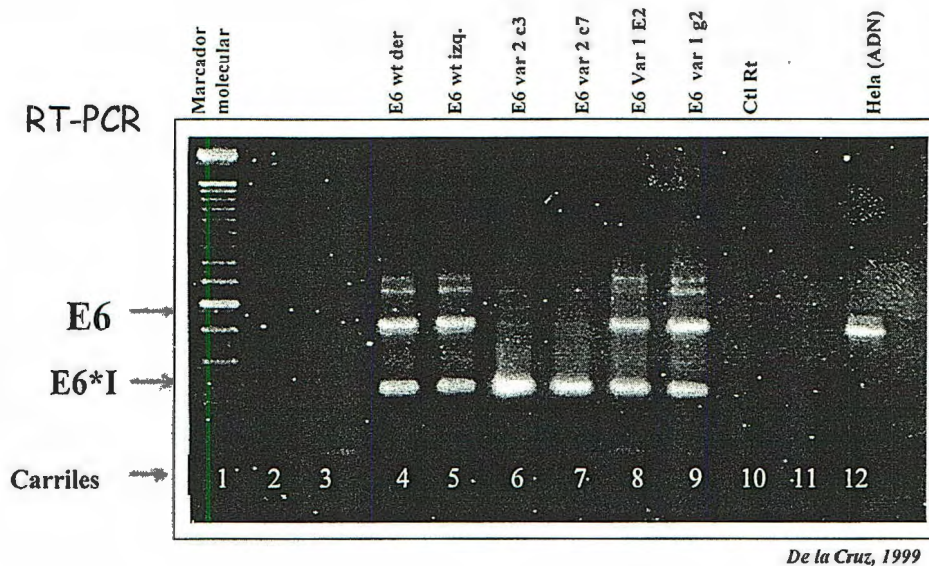


Figura 11. Niveles de expresión del gen E6 de variantes de HPV18 en células MCF-7 transfectadas. (E6wtder, E6wtizq son clonas transfectadas con el gen E6 de referencia; E6var2c3 y E6var2c7, son dos clonas celulares transfectadas con E6 variante 2 y E6var1E2 y E6var1g2 son 2 clonas celulares transfectadas con E6 variante 1). Las células transfectadas con el gen E6 de referencia presentan mayores niveles del transcrito E6 al igual que E6 variante 1 y las células transfectadas con E6 variante 2 que presentan mayores niveles del transcrito E6\*. En los carriles 10 y 12 se muestran los controles del ensayo.

Tomando en cuenta que la proteína E6 es muy importante en el control del ciclo celular y que su expresión es diferencial en los aislados de HPV18, en este trabajo se pretende determinar de qué manera dicha expresión diferencial de E6 de los distintos aislados de HPV, afecta algunas proteínas que regulan el ciclo celular, y de que manera esto afecta el proceso de proliferación celular.

**HIPÓTESIS:**

Los cambios en las proteínas E6 de las variantes de HPV18 tienen un efecto diferencial en la degradación de algunas proteínas blanco lo que repercute en la proliferación celular.

**OBJETIVO GENERAL:**

Determinar si las proteínas E6, de variantes de HPV18 (E, Af y As-Ai), actúan de manera diferencial en la degradación de proteínas blanco en las líneas celulares MCF7 y C33A así como determinar de que manera se afecta el proceso proliferativo.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- En células C33A (con p53 mutado) y MCF7 (p53 wt), determinar el efecto de las proteínas E6s variantes de HPV18 encontradas en la población mexicana, sobre la degradación de la proteína celular p53.
- 2.- Determinar el efecto de las variantes de la proteína E6 sobre los niveles de la proteína Bax en las células C33A y MCF7, como un efecto de E6 sobre p53.
- 3.- Determinar si las variantes de E6 de HPV18 afectan diferencialmente la proliferación celular, de manera dependiente o independiente de la proteína p53.
- 4.- Determinar de que manera afectan las variantes de E6 de HPV18 los niveles de la proteína hDLG en células C33A y en MCF-7.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Cultivo celular.**

Las líneas celulares MCF-7 y C33A (cáncer de mama y de cérvix, respectivamente) silvestres y transfectadas con los genes E6 de HPV18 de aislados encontrados en la población mexicana (E, Af y As-Ai), se cultivaron en medio de cultivo DMEM (GIBCO, BRL, Gaithersburg, MD, USA), suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF, GIBCO, BRL, Gaithersburg, MD, USA), se mantuvieron en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> y a una temperatura de 37°C. La línea celular MCF-7 contiene al gen p53 en su estado normal, mientras que la línea celular C33A, contiene una forma mutada de p53.

### **Ensayos de PCR**

El DNA de las líneas celulares transfectadas fue aislado por el método de fenol-cloroformo (Maniatis et al., 1989). Posteriormente, se procedió a la amplificación del gen E6 mediante la técnica de PCR, para lo cual se utilizó un par de oligonucleótidos específicos para E6. Los productos de E6 obtenidos por PCR fueron purificados y sometidos a secuenciación automática (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer).

Los oligonucleótidos empleados fueron:

E65' HPV18 BamHI

5'- GGG GGA TCC ATG GCG CGC TTT GAA GAT CCA ACA-3'

E63' HPV18 HindIII

5'-GGG AAG CTT TTA TAC TTG TGT TTC TCT GCG TCG-3'

La mezcla de reacción para PCR se realizó adicionando 10  $\mu$ l de DNA, 2  $\mu$ l de buffer 10X, 2  $\mu$ l de dNTPs (2 $\mu$ M), 1.6 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (2mM), 0.2  $\mu$ l de los primers (50pM), 0.13  $\mu$ l de la enzima Taq polimerasa y 3.87 $\mu$ l de Agua, llevando a cabo la desnaturalización a 94°C por 10 min 1 ciclo; la alineación y la amplificación a 94°C por 1 min, 59°C un minuto y 72 °C por 7 min por 38 ciclos, y finalmente a 72°C por 7 min para el consumo final de los reactivos de la reacción. Los productos de PCR así obtenidos se purificaron mediante High Pure PCR Product Purification Kit (Roche).

### **Ensayos de RT-PCR**

Se corroboró la expresión de E6 en las clonas celulares mediante ensayos de RT-PCR, para lo cual se extrajo el RNA mediante el método de Trizol (Invitrogene). La monocapa celular se lavó 3 veces con PBS en frío. Posteriormente, se adicionó trizol y las células se cosecharon por raspado, con ayuda de un gendarme. Después de obtener las células se realizó la extracción de RNA según el protocolo descrito (Invitrogene). A partir del RNA obtenido se sintetizó su cadena complementaria (cDNA) utilizando una transcriptasa reversa (Super Script II RT) y finalmente se amplificó la doble cadena por PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para E6 (Super Script First-Strand).

### **Obtención de proteínas celulares**

Las células se dejaron crecer hasta llegar a un 90 ó 95% de confluencia, luego fueron lavadas 3 veces con PBS y posteriormente se cosecharon por tripsinización. Las células que se levantaron fueron centrifugadas durante 10

minutos a 2000 rpm. El pellet celular obtenido se resuspendió en 300-500  $\mu$ l de la solución de lisis RIPA (Tris-HCl pH=7.4, 50 mM; NaCl 150 mM; NP-40 1%; Desoxicolato de sodio 0.5 %; SDS 0.1%) adicionando 10 % de inhibidores de proteasas (AEBSF; Inhibidores de serín proteasas, Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A, E-64, Bestatin). Las células se rompieron por homogeneización con una aguja calibre 27G. El homogenado celular se centrifugó durante 10 minutos a 12, 000 rpm a 4° C. el sobrenadante se recuperó y se cuantificó la concentración de proteínas por medio de la reacción del ácido bicinconílico/ sulfato de cobre (SIGMA).

#### **Cuantificación de proteína (Acido Bicinconílico)**

La cuantificación de proteína fue determinada por el método de Ácido Bicinconílico, que se basa en la reducción del Óxido cúprico por las proteínas presentes en las muestras. Se montó la curva de albúmina (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 y 15.0,  $\mu$ g de proteína) (SIGMA, ST Louis, MD, USA).

Se emplearon 2  $\mu$ l de cada muestra adicionando 13  $\mu$ l de RIPA y 300  $\mu$ l de solución de ácido bicinconílico y sulfato de cobre (100:2). Las muestras se incubaron por 5 min a 90 °C, para acelerar la reacción, y se dejaron atemperar para posteriormente determinar su densidad óptica (DO) a 570 nm.

#### **Separación de proteínas y ensayo de Western Blot**

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS a una concentración de 10 al 18%, dependiendo de la proteína de interés. Para realizar esto, las proteínas fueron desnaturalizadas por calor (ebullición) durante 10



minutos, adicionando buffer de carga (Buffer 2X-2 mL: Tris 2M pH=6.8, Glicerol 400  $\mu$ L, SDS 25%, Azul de Bromofenol 0.1% 40  $\mu$ L, agua 915  $\mu$ L y  $\beta$ -mercapto 200 $\mu$ L). Una vez separadas las proteínas, se transfirieron a una membrana de nylon-nitrocelulosa (Hybond-C Amersham, LIFE Science, Chalfont, Buckinghamshire, England) en una cámara de transferencia húmeda utilizando buffer de transferencia (Tris base 25 mM 3.79 g y Glicina 192 mM 18 g, Aforar a 1L y adicionar 250 mL de metanol) a 250 mA por 60 min. Después de la transferencia la membrana se bloqueó con solución al 10 % de Leche descremada en TBS ( Tris 0.2 M, pH=5 y NaCl 0.5 M) por 2 h a temperatura ambiente, para evitar que el anticuerpo primario se una inespecíficamente a toda la membrana. Se emplearon anticuerpos mono- y policlonales para identificar a las proteínas de interés. La membrana con el anticuerpo primario se incubó toda la noche y posteriormente se lavó con una solución TBS-Tween 20. Una vez lavada la membrana se incubó con el anticuerpo secundario durante 2 horas y finalmente se lavó con la solución TBS-Tween 20 por 1.30 h. Los niveles de las proteínas p53, Bax y hDIG, se determinaron con los anticuerpos respectivos. Los anticuerpos se diluyeron 1:1500 en solución de bloqueo, tanto los anticuerpos primarios como el secundario, con excepción del anticuerpo primario para hDIG, que se utilizó a una dilución 1:500. Finalmente, los Western Blots se revelaron por medio de la reacción de peroxidasa, (ECL <sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents- Amersham Biosciences) y se expusieron en Hyperfilm (Amersham Biosciences).

### **Proliferación celular por el método de viabilidad cristal violeta**

Se realizaron curvas de viabilidad empleando distintas cantidades de células MCF-7 y C33A en placas de 96 pozos para determinar su índice replicativo. Estos ensayos se realizaron por 24, 48 y 72 h, cambiándoles el medio de cultivo cada 24 hrs. En base a estas curvas de referencia se realizaron los ensayos de proliferación en las células transfectadas con las variantes de E6 o transfectadas con el vector pCDNA.

En cada uno de los distintos tiempos estandarizados, la monocapa celular se lavó con PBS. Posteriormente, las células se fijaron con 50  $\mu$ l de una solución de glutaraldehído al 1.1 % de medio de cultivo y 2.5% de suero de ternera, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después fueron lavadas con PBS y se tiñeron con 100  $\mu$ l del colorante cristal violeta al 0.1% en PBS por 15 min en agitación. Pasado el tiempo de incubación se retiró el colorante y la monocapa de células se lavó varias veces con agua corriente, posteriormente el colorante fue eluido adicionando 100  $\mu$ l de una solución de ácido acético al 10% por 5 min en agitación y finalmente se determinó la DO a 570 nm en un Lector de Elisa (Labsystems Multiskan MS).

Los resultados obtenidos en este ensayo fueron examinados mediante el análisis estadístico Anova.

### **Proliferación celular por el método Citometría de flujo**

Estos ensayos se llevaron a cabo sembrando 400 000 células por pozo en cajas de 6 pozos para cada línea celular a analizar y sus respectivos controles (células sin transfectar o células transfectadas con el vector pCDNA). Previo al

experimento las células fueron sincronizadas por privación de suero por 24 h. Las células se crecieron por 24, 48, y 72 h cambiando diariamente el medio de cultivo. Una vez cumplido el tiempo de incubación las células fueron cosechadas con tripsina al 1% y colocadas en tubos respectivamente etiquetados. Las células cosechadas fueron tratadas con yoduro de propidio. Posteriormente el DNA marcado se analizó utilizando el citofluorómetro modelo FACS calibur (Beckton Dickinson, San José , CA). Los valores fueron analizados por medio del programa Cell Quest. Y el resultado fue mostrado como el porcentaje de células en fase "S". Los resultados obtenidos en este ensayo fueron analizados mediante el análisis estadístico t student.

## RESULTADOS

Dado que nuestro interés radica en la caracterización del papel de las variantes de E6 en el proceso de proliferación celular, de manera dependiente o independiente de p53, este trabajo fue llevado a cabo en dos líneas celulares, ambas negativas a secuencias de HPV. La línea celular MCF-7 que contiene al gen p53 en su estado normal, mientras que la línea celular C33A que contiene una forma inactiva de este por estar mutada en el dominio de unión al DNA (Aminoácido 273) (J.F. Charlot, et al., 2004),.

Las dos líneas celulares que se utilizaron se encontraban transfectadas con el gen *E6* de las variantes de HPV18 (Af y E), la clona AsAi y el vector pcDNA sólo. La presencia de dichos genes en las células fue constatada a nivel molecular mediante la amplificación, por PCR, de E6 y posterior secuenciación. Los niveles de expresión del gen *E6* de las variantes empleadas se corroboraron por ensayos de RT-PCR. En estos ensayos se confirmó la expresión diferencial de los transcritos de las variantes de *E6* de HPV18. Las células con el gen *E6* de referencia y las que tienen *E6* E presentan una proporción equivalente del gen *E6* completo como del producto de procesamiento *E6*\*I. Por su parte, en las células con *E6* Af aun cuando el transcrito de *E6* completo está presente, resulta una minoría en contraste con *E6*\*I, que ocupa la mayor proporción. Estos resultados concuerdan con lo previamente reportado por De la Cruz et al. (2005).

## 1.- Las variantes de E6 degradan diferencialmente a la proteína p53 en las células MCF-7.

E6 es la oncoproteína viral a la cual se le han atribuido propiedades transformantes ya que se ha visto que puede immortalizar queratinocitos humanos e interactuar con una serie de proteínas que tienen que ver con procesos importantes como proliferación y apoptosis celular.

p53 controla la proliferación celular e induce apoptosis. La apoptosis es crucial para la destrucción de tumores. La actividad inhibitoria de crecimiento previene la proliferación de las células con DNA dañado o con un potencial de transformación neoplásico. P53, que contribuye en procesos celulares como diferenciación, reparación del DNA y angiogénesis, resulta vital para la supresión de tumores (Unger T. 1999). P53 sirve como un obstructor principal para tumorigénesis. Debido a todas estas características, p53 tiene un papel fundamental en el control del ciclo celular, su eliminación por el HPV, permite el desarrollo de tumor.

Como se observa en la **Figura 12**, las células MCF-7 transfectadas con los genes E6 As-Ai y E. (con mayores niveles del transcrito E6 completo que los que presenta la clona con E6 Af), presentan menores niveles de la proteína p53, con respecto a las células transfectadas con E6 Af. Dado que los niveles de actina son los mismos para todas las proteínas analizadas en este ensayo, consideramos que estos resultados se deben a que las clonas con E6 AsAi y E presentan mayor degradación de p53 que las que tienen E6 Af.

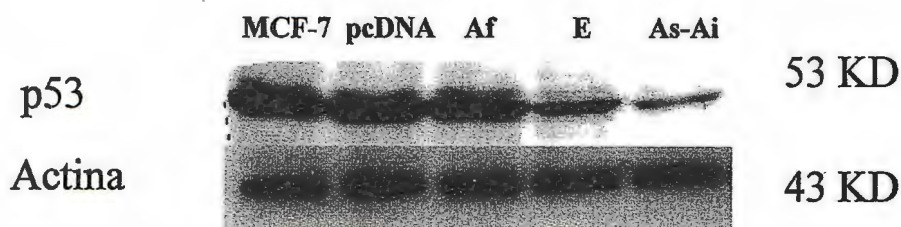


Figura 12. Expresión diferencial de la proteína p53 en las células MCF-7 y MCF-7 transfectadas con las variantes de E6. Se analizó la expresión de la proteína p53 en las células MCF-7, carril 1; MCF-7 pcDNA, carril 2 y MCF-7 transfectadas con las variantes de E6 (E6-Af, carril 3; E6-E, carril 4 y E6-AsAi carril 5).

## 2.- Las variantes de E6 de HPV18 afectan diferencialmente los niveles de la proteína Bax en las células MCF-7.

La proteína Bax tiene un papel muy importante en apoptosis celular ya que participa junto con otras proteínas a nivel mitocondrial en la liberación de citocromo C. Dado que Bax es una proteína blanco de activación transcripcional de p53 nos interesó determinar como afectan la disminución diferencial de los niveles de p53 por las distintas variantes de E6, los niveles de Bax.

En los ensayos de Western Blot con anticuerpos dirigidos contra Bax, se encontró que las células transfectadas con E6 As-Ai y E, presentaron menores niveles de la proteína Bax, que las células transfectadas con E6 Af. Estos niveles de Bax en As-Ai y E, concuerdan con los bajos niveles de p53 observados para las mismas clonas celulares. Mientras que las células transfectadas con E6 Af presentaron niveles semejantes de Bax, que las células sin transfectar o transfectadas con el

vector vacío, lo que a su vez concuerda con los altos niveles de p53 en estas clonas celulares (Figura 13).

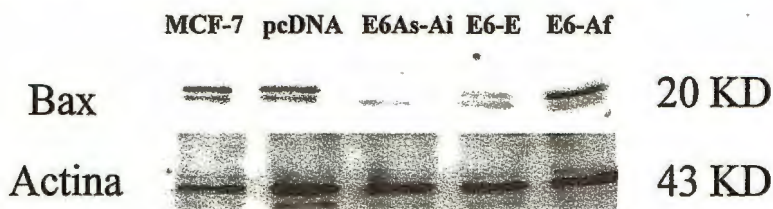


Figura 13. Niveles de la proteína Bax observados en las células MCF-7 y MCF-7 transfectadas con las variantes de E6. Se muestran los niveles de la proteína Bax obtenidos por Western Blot de las células MCF-7, carril 1; MCF-7 transfectadas con el vector vacío, carril 2 y MCF-7 transfectadas con E6 As-Ai, E6E y E6 Af carriles 3, 4 y 5 respectivamente.

### 3.- Determinación del número de células para llevar a cabo los ensayos de proliferación celular en células C33A y MCF-7.

Se sabe que E6, por su capacidad de degradar a p53 entre otros blancos, tiene un papel crucial tanto en apoptosis como en el ciclo celular, promoviendo una proliferación descontrolada. Nuestro interés entonces fue analizar la consecuencia de los cambios en E6, en el proceso proliferativo.

Para cada una de las líneas celulares utilizadas en este estudio, nosotros determinamos su índice de proliferación. Se ha determinado que las líneas celulares tienen índices proliferativos propios, de ahí que se llevaran a cabo curvas para obtener el número adecuado de células para los ensayos de proliferación celular durante 24, 48 y 72 h.

Para la estandarización de las células C33 se sembraron 6.25, 12.5, 25, 50 y 100, x 10<sup>3</sup> células por pozo. En base a la obtención de una curva de

proliferación adecuada para su lectura hasta 72 h, para esta línea celular se seleccionaron las cantidades de  $6.25$  y  $12.5 \times 10^3$  células por pozo en cajas de 96 pozos. Para la línea MCF-7 se ensayaron las cantidades de  $12.5$ ,  $25$ ,  $50$  y  $100 \times 10^3$  cel/pozo y se seleccionaron las concentraciones de  $25$  y  $50 \times 10^3$  cel/pozo. Definimos como la cantidad celular óptima aquella en la que las células no llegan a su fase de meseta a las 72 hrs. Las cantidades óptimas para los diferentes días de crecimiento, para C33A y MCF-7 fueron:  $12.5 \times 10^3$  y  $25 \times 10^3$  cel/pozo, respectivamente (Figura 14 y 15).

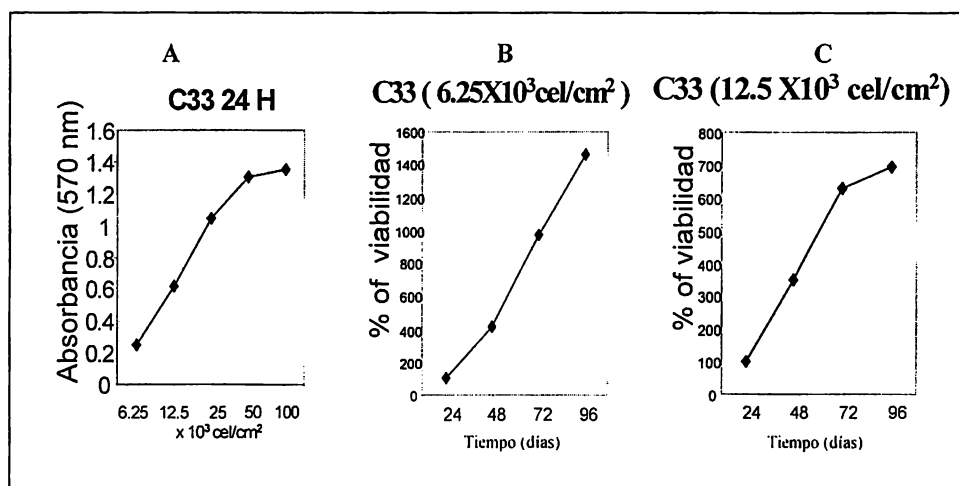


Figura 14. Curvas para obtener el número de células para los ensayos de proliferación en las células C33A. A) Se cultivaron diferentes cantidades de células durante 24 horas. B y C) Las cantidades celulares seleccionadas por encontrarse en la etapa de crecimiento exponencial se analizaron en su comportamiento proliferativo por 24, 48, 72 y 96 horas.



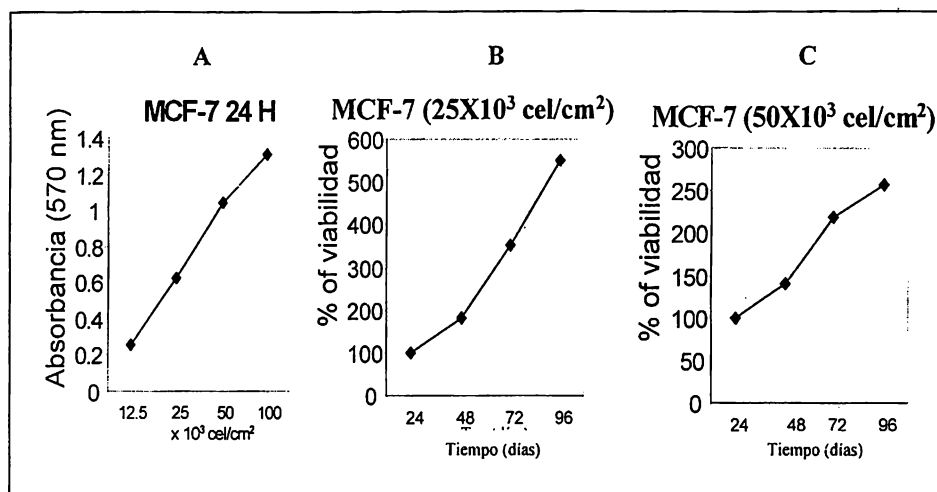


Figura 15. Curvas para obtener el número de células para ensayos de proliferación en las células MCF-7. A) Se cultivaron diferentes cantidades de células durante 24 horas. B y C) Las cantidades celulares seleccionadas por encontrarse en la etapa de crecimiento exponencial se analizaron en su comportamiento proliferativo por 24, 48, 72 y 96 horas.

#### 4.- Proliferación celular diferencial inducida por variantes de E6.

Con la finalidad de observar el efecto de los cambios en la secuencia de E6 de las diferentes variantes en el proceso de proliferación, se realizaron ensayos de proliferación de las células MCF-7 transfectadas con las variantes de E6 por 24, 48 y 72 h. Para este fin se utilizó la técnica de citometría de flujo la cual permite apreciar el número de células que se encuentran en fase S lo que necesariamente corresponde al número de células que están proliferando o en mitosis.

El resultado de proliferación por este método confirmó que las células transfectadas con la variante africana de E6, presentan una menor cantidad de células en fase S en relación con las células transfectadas con las otras variantes

(Figura 16, var2), lo que refleja una proliferación celular disminuida. Por otra parte, se apreció una mayor cantidad de células en fase S de las variantes Asiático-Amerindia y Europea, siendo la As-Ai, la que presentó una proliferación celular significativamente mayor que la Af (t student,  $p < .05$ ) (Figura 16, wt y var1).

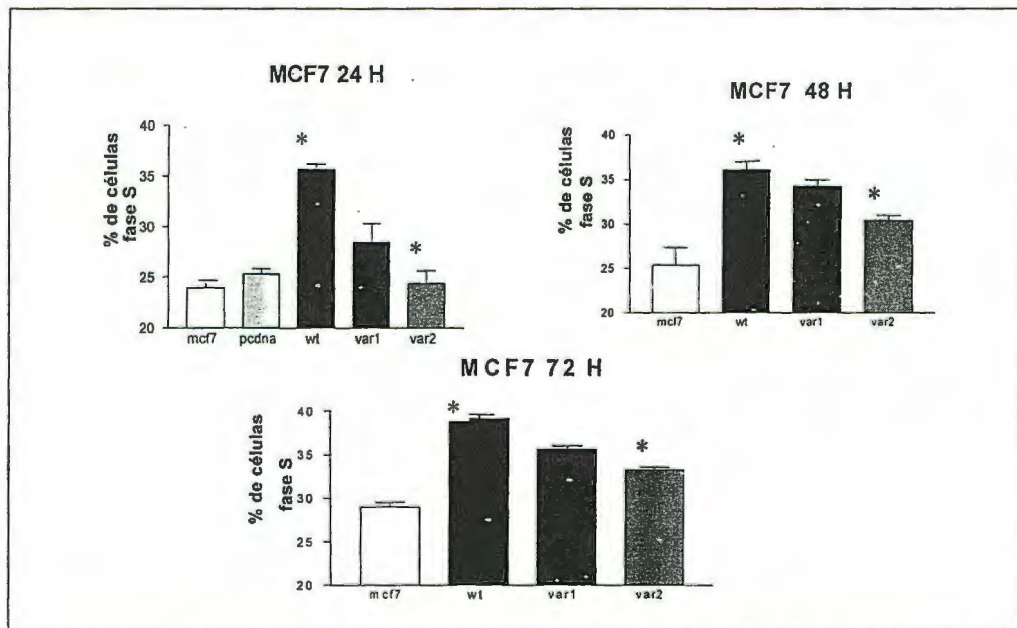


Figura16. Ensayos de proliferación celular mediante citometría de flujo por 24, 48 y 72 h, de las células MCF-7 y MCF-7 transfectadas con las variantes de E6. Los ensayos por citometría de flujo se realizaron por 24, 48 y 72 h. La proliferación celular se determinó por el número de células encontradas en fase S. Se muestran las células MCF-7 sin transfectar y transfectadas con el vector pcDNA y células MCF-7 transfectadas con E6 As-Ai (wt), E6E (var1) y E6Af (var2) \* t student,  $P < 0.05$ .

##### 5.- Las variantes de E6 de HPV18 no degradan a la proteína supresora de tumores p53, en las células C33A.

P53 tiene diversos dominios funcionales. Dentro de ellos, el codón 273 está involucrado en la unión y activación de la transcripción de genes que participan en la reparación de DNA dañado, inducción de apoptosis y control de ciclo celular.

Así también, este codón está involucrado en la unión con E6, resultando p53 un blanco importante de degradación de E6. En las células C33A, p53 se encuentra mutado en este codón 273, de esta manera, en esta línea celular E6 no lleva a cabo la degradación de la proteína p53.

Para ver de que manera las variaciones de E6 afectan la degradación de p53 en células donde esta proteína no es funcional, se llevó a cabo el análisis de los niveles de la proteína p53 por ensayos de Western Blot. Con esto demostramos que E6 no es capaz de degradar a esta proteína. En la figura 16 se observa que independientemente de las variantes de E6, no se observaron cambios a nivel de la proteína p53. Los niveles fueron incluso los mismos tanto en las células sin transfectar como en las células transfectadas con el vector vacío (**Figura 17**). Esto confirma que ni siquiera E6 de referencia es capaz de degradar a p53 en las células C33.

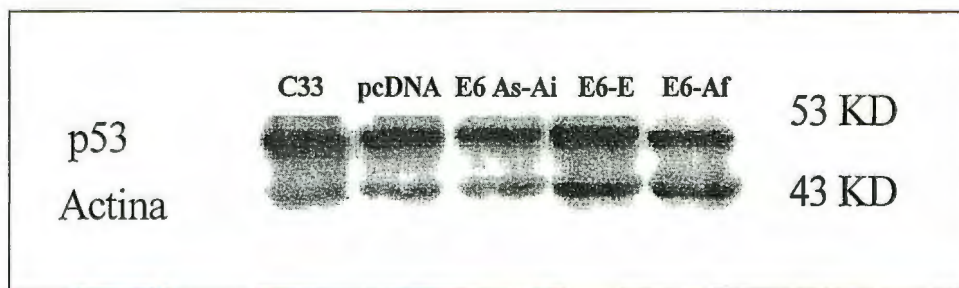


Figura 17. Niveles de la proteína p53 en las células C33A y C33A transfectadas con las variantes de E6. Mediante Western Blot se determinaron los niveles de la proteína p53 en las células C33A. En el primer carril se muestra p53 de las células C33A, en el segundo p53 de C33A transfectadas con el vector vacío y en los carriles 3, 4 y 5 se observan los niveles de p53 de las células C33A transfectadas con las variantes de E6, E6-As-Ai, E y Af, respectivamente.

## 6.- Células transfectadas con las variantes de E6 de HPV18 no presentan diferencias en los niveles de la proteína Bax en células C33A.

Las células C33A tienen una mutación en su proteína p53 que la incapacita para activar transcripcionalmente proteínas blanco como son p21 y Bax entre otras. Ensayos de Western Blot fueron llevados a cabo para determinar el efecto de las variantes de E6 de HPV18 en cuanto a los niveles de la proteína Bax. En los ensayos realizados, no se observaron diferencias en los niveles de la proteína en esta línea celular. Se observó que tanto las células transfectadas con E6 de la variante Asiático-Amerindia y Europea, como las células transfectadas con la variante Africana, presentaron los mismos niveles de la proteína Bax (Figura 18).

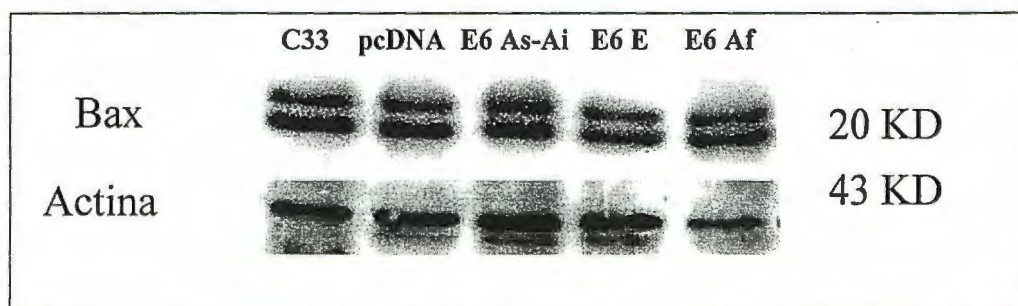


Figura 18. Niveles de la proteína Bax en las células C33A. Mediante Western Blot se determinaron los niveles de la proteína Bax en las células C33A. En el primer carril se muestra el Western Blot de la proteína Bax de las células C33A; en el carril 2, Bax de las células C33A transfectadas con el vector vacío, mientras que en los carriles 3, 4 y 5 se muestran los niveles de Bax de las células C33A transfectadas con E6-As-Ai, E y Af, respectivamente.

## 7.- En la línea celular C33A E6 de HPV18 promueve la proliferación celular de manera independiente de p53.

Dado que p53 es un punto importante en el control de ciclo celular y con la finalidad de ver si estas variantes de E6 de HPV18 presentan una proliferación

diferencial independientemente de la funcionalidad de p53, se realizaron ensayos de proliferación en la línea celular C33A.

Con el fin de determinar la reproducibilidad de los datos, en esta línea celular comparamos los resultados obtenidos con la técnica de tinción por cristal violeta y citometría de flujo. En la primera técnica la cantidad de colorante detectada por el lector de elisa a 570 nm, será proporcional al número de células presentes. A su vez, se probaron dos clonas de cada una de las líneas celulares transfectadas, con la finalidad de determinar si el efecto de E6 sobre la proliferación se ve afectado por diferencias en el sitio de integración al genoma celular, durante el proceso de transfección.

Mediante esta técnica se pudo apreciar que a las 24 y 48 horas de crecimiento, las células transfectadas con la variante Asiático-amerindia y con la Europea presentaron una proliferación celular mayor (Figura 19 , WtC2, WtC3 y V1 y V1R3, respectivamente), que las células transfectadas con la variante Africana (Figura 18, V2C4 y V2D2), siendo las células transfectadas con E6-As-Ai las que presentaron el mayor índice de proliferación. Con estos resultados se podría concluir que E6 As-Ai y E6-E, inducen una proliferación celular mayor que E6-Af, independientemente de la condición de p53 (**Figura 19**). Los resultados fueron similares para las distintas clonas analizadas (Anova  $P < 0.05$ ). Sin embargo como este método no permite distinguir con exactitud cuando las células tienen un incremento en su proliferación o una disminución en el índice de muerte o viseversa, se realizó el ensayo de proliferación celular por Citometría de Flujo.

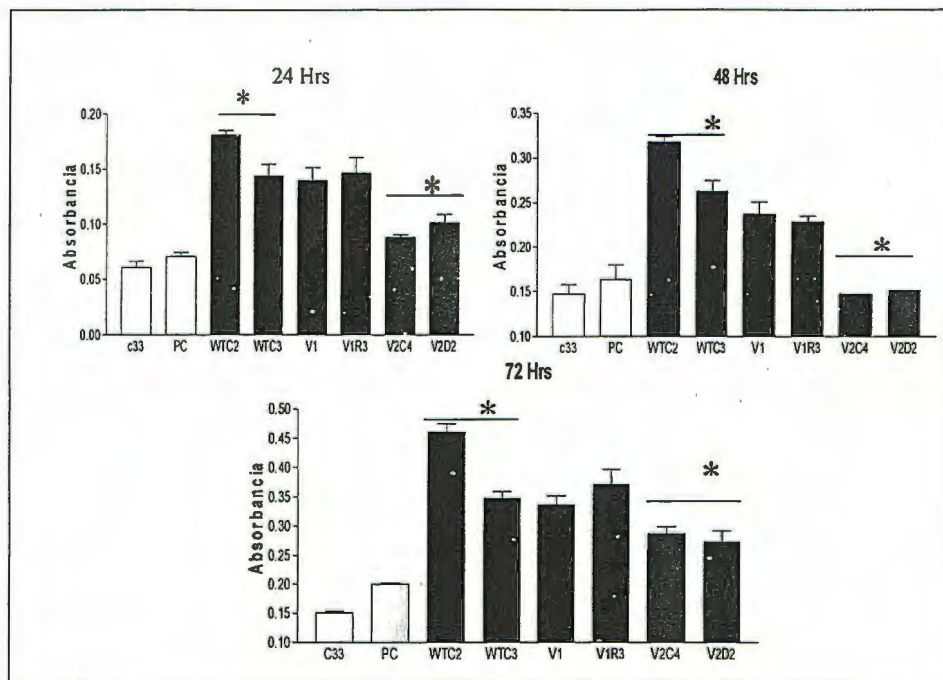


Figura 19. Proliferación celular por cristal violeta por 24, 48 y 72 h de las células C33A y C33A transfectadas con las variantes de E6. Los ensayos de proliferación celular por cristal violeta, se realizaron por 24, 48 y 72 h. La proliferación celular se determinó a 570 nm mediante el porcentaje de densidad óptica emitida por la concentración de colorante absorbido dependiendo del número de células presentes. Las barras blancas muestran las células C33A sin transfectar, las barras grises representan las células transfectadas con el vector vacío, mientras que las restantes representan las células C33A transfectadas con E6 As-Ai (WTC2, WTC3), E6E (V1 y V1R3) y E6Af (V2C4 y V2D2). (\*Anova  $P < 0.05$ ).

Por su parte, en la citometría de flujo, que permite apreciar la proliferación celular mediante el conteo de células que se encuentran en fase S en 10,000 eventos se observó que las células transfectadas con E6-As-Ai y E, presentan mayor número de células en fase S (Figura 20, Wt y Var1), lo que está directamente relacionado con una mayor proliferación celular con respecto a las células transfectadas con E6-Af, cuyo número de células en fase S fue menor (Figura 20, V2). Por lo tanto, se pudo constatar que la proliferación celular

promovida por E6-As-Ai y E es independiente de p53 (Figura 20). Los datos obtenidos fueron comparables por las dos técnicas.

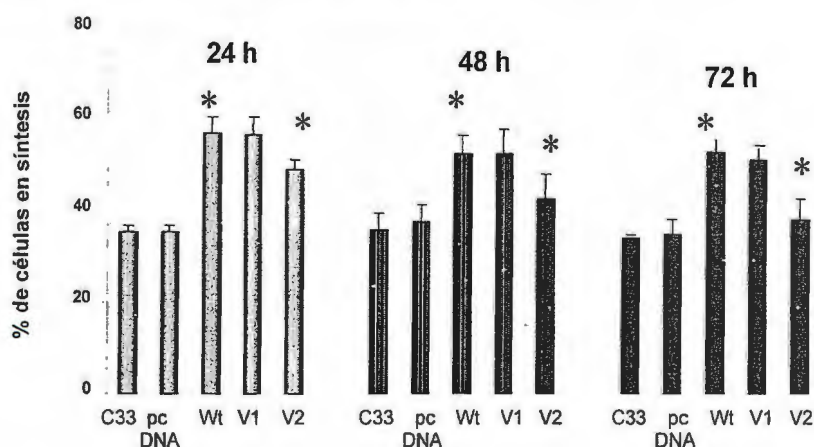


Figura 20. Ensayos de proliferación celular mediante citometría de flujo por 24, 48 y 72 h de las células C33A y C33A transfectedas con las variantes de E6. Los ensayos por citometría de flujo se realizaron por 24, 48 y 72 h. La proliferación celular se determinó por el número de células encontradas en fase S, las primeras dos barras para cada ensayo representan a las células C33A y C33A transfectedas con el vector vacío, mientras que las barras restantes para cada tiempo, representan a las células C33A transfectedas con E6 As-Ai, E y Af, respectivamente (\*t student  $P < 0.05$ ).

## 8.- E6 degrada diferencialmente a la proteína hDIG tanto en células C33 como en Células MCF-7.

Existen varios mecanismos por los cuales E6 pudiera estar promoviendo la proliferación celular independiente de p53, uno de ellos podría ser a través de la vía de hDIG, la cual regula la actividad de la proteína supresora de tumores PTEN que forma parte de la vía de proliferación celular de PKB (Protein kinasa B) actuando como un supresor de la misma vía. Así que con la finalidad de determinar si hDIG pudiera tener algún papel en el aumento de proliferación celular inducido por E6-As-Ai y E, se realizó el ensayo de Western Blot de hDig. Se encontró que tanto en las células MCF-7 y C33A como en las células MCF-7 y C33A, transfectedas con el vector vacío, los niveles de hDig no varían, mientras

que en ambas líneas celulares transfectadas con E6-As-Ai y E, los niveles de hDLg, se encontraron claramente disminuidos. Las células transfectadas con E6-Af, presentaron un comportamiento intermedio; es decir, si bien los niveles de la proteína hDLG se encuentran disminuidos, son más elevados de lo que presentan las células con E6-AsAi o E6-E (Figura 21 y 22).

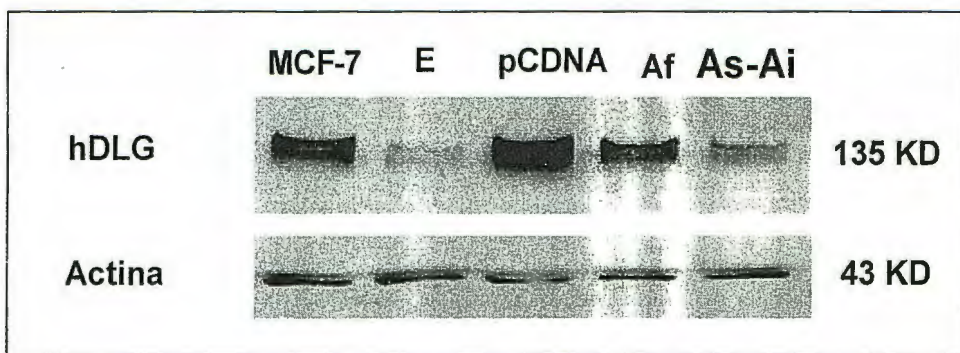


Figura 21. Niveles de expresión de hDLG en las células MCF-7. Ensayos de Western Blot muestran que los niveles de expresión de la proteína hDLG en las células MCF-7 y MCF-7 transfectadas con el vector vacío, carriles 1 y 3 respectivamente, presentan niveles parecidos de proteína, mientras que los niveles de hDLG de las células transfectadas con E6 E, y As-Ai, carriles 2 y 5, fueron menores que los controles, y las células MCF-7 transfectadas con E6 Af, carril 4, presentaron un estado intermedio.

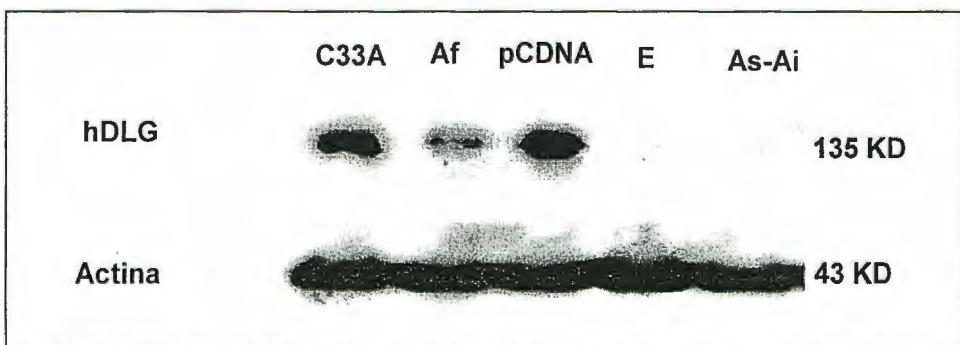


Figura 22. Niveles de expresión de hDLG en las células C33A. Ensayos de Western Blot muestran que los niveles de expresión de la proteína hDLG en las células C33A y C33A transfectadas con el vector vacío, carriles 1 y 3 respectivamente, presentan niveles parecidos de proteína, mientras que los niveles de hDLG de las células transfectadas con E6 E, y As-Ai, carriles 4 y 5, fueron menores que los controles, y las células C33A transfectadas con E6 Af, carril 2, presentaron un estado intermedio.



## DISCUSIÓN

Durante el proceso de una célula normal a una transformada por VPH, el genoma celular sufre varios cambios, en gran parte por la interacción de algunas proteínas virales con proteínas celulares. En un proceso evolutivo, las partículas virales han desarrollado proteínas cuya función es actuar sobre blancos celulares importantes, con la finalidad de garantizar la sobre vivencia y proliferación virales. En particular, muchos blancos celulares se han identificado para la oncoproteína E6 de los HPVs de alto riesgo como HPV16 y HPV18. Entre los blancos celulares se encuentra la proteína supresora de tumores p53, cuyo papel en la prevención del cáncer es claramente importante. P53 participa en la eliminación por apoptosis del exceso de células, o de células infectadas o dañadas. A su vez, p53 es vital para la regulación apropiada de la proliferación celular en organismos multicelulares (Huang y Strasser, 2000). Esta proteína tiene un papel muy importante como regulador de puntos de control del ciclo celular como el paso de G1 a S y menos claro el punto de control de G2-M. Reportes desde 1991 por Huijbregtse et al., y más adelante por Scheffner, en 1993, entre otros, han demostrado el papel de la oncoproteína E6 para inhibir la función de p53. La proteína E6-AP, que es una ubiquitín ligasa, es necesaria para que E6 pueda llevar a cabo la degradación de p53.

Se sabe que no todas las infecciones del cérvix con HPVs de alto riesgo van a promover el desarrollo de cáncer: Se ha propuesto que en este proceso se encuentran involucradas las diferencias intratipo de los HPVs de alto riesgo y que estas diferencias genómicas pueden dar por resultado variaciones funcionales de los genes virales involucrados en el proceso de transformación. Dadas ciertas

asociaciones previamente encontradas, de algunas variantes de HPV18 y los tipos histológicos de cáncer de cérvix, se ha propuesto que estas variantes pudieran tener diferente comportamiento biológico, que repercutiera en su oncogenicidad.

Por consiguiente, el interés de este trabajo se centró en caracterizar aspectos funcionales del oncogen E6 de las variantes de HPV18 encontradas en la población mexicana (Lizano et al., 1997). Quisimos determinar si los cambios nucleotídicos de los genes E6 variantes trascienden en el efecto de E6 sobre la degradación de algunas de sus proteínas celulares blanco y su repercusión en el proceso de proliferación celular.

De este modo, se procedió a caracterizar el efecto de las variantes de E6 sobre la degradación de la proteína p53 por medio del análisis Western Blot. En este análisis, se encontró una menor cantidad de la proteína p53 en las células transfectadas con la variante As-Ai de E6, en comparación con una mayor cantidad de la proteína p53 encontrada en las células transfectadas con las variantes Af. Las células con la variante E mostraron menores niveles de p53 que las de Af, sin ser tan bajos como las células con E6AsAi. Estos resultados se correlacionan con los niveles de los transcritos de las proteínas E6 observados en la figura 11, donde se aprecia que las células transfectadas con el gen de la variante As-Ai de E6 presenta mayor cantidad del transcrito E6 completo, a diferencia de E6 Af, en que predomina el producto de procesamiento E6\*I . Esto podría significar, que por la diferencia en cantidades del transcrito E6 completo en las células con E6 Af, se tendría menos E6 funcional con capacidad de promover la degradación de p53. Por otra parte, reportes de David Pim et al., desde 1997, han demostrado que la proteína E6\*I tiene un papel importante en evitar la degradación de la proteína p53 por E6 dado que pierde el dominio de unión a p53,

mas no el de unión a E6, evitando por competencia que E6 se pueda unir a p53 y por lo tanto degradarla.

Aunque por análisis de Western Blot, nosotros no pudimos constatar la presencia del fragmento protéico E6\*1, consideramos que las células con la variante E6 Af podrían tener mayor cantidad de esta proteína, lo que ayudaría a evitar la degradación de p53 dada por E6. Esto, aunado a los bajos niveles de la proteína E6 completa posiblemente presentes en estas células, ayudaría a mantener los niveles normales de p53 funcional (**Figura 12**).

Posteriormente, se buscó analizar de que manera podría repercutir la disminución de la proteína p53 en su capacidad de llevar a cabo la activación transcripcional de ciertos genes importantes en la regulación celular, como es el caso del gen que codifica para la proteína proapoptótica Bax. Nuestro interés se enfocó entonces en tratar de entender las posibles repercusiones de los efectos diferenciales de las variantes de E6, no solo en el proceso de proliferación celular sino también en otros procesos que también están directamente relacionados con la oncogenicidad viral y que pueden repercutir indirectamente en el proceso de proliferación celular, como lo es la apoptosis celular. En este análisis se encontró que al variar los niveles de la proteína p53, la proteína E6 también está variando los niveles de la proteína proapoptótica Bax. Encontramos que las células transfectadas con la variante As-Ai, con menor cantidad de proteína p53, también presentan menor cantidad de la proteína Bax. En el caso de la variante Af los altos niveles de p53 correlacionaron con altos niveles de la proteína Bax (**Figura 13**). De este modo, es posible que las diferencias entre variantes de E6, además de repercutir en la proliferación celular, también sean trascendentes en procesos de apoptosis celular y esto afectar la proliferación celular de una manera indirecta.

Una vez determinada la participación de la proteína E6 sobre p53 y Bax, se realizaron los ensayos respectivos para ver si estas variantes de E6 afectan diferencialmente los niveles de proliferación celular de células transfectadas. En estos ensayos se observó que las células MCF-7 con las diferentes proteínas E6 variantes presentan una proliferación diferencial (**Figura 16**) y que esta inducción en la proliferación celular se correlaciona con los niveles de los transcritos de E6 (**Figura 11**) y los niveles de p53 y Bax. Es decir, las células MCF-7 con E6 AsAi y E presentan mayores índices de proliferación que las que contienen a E6 Af ( $p < 0.05$ ) (**Figura 16**).

Desde 1994 Dulic y col., reportaron que células transformadas que expresan E6 de HPV16 o HPV18 pierden actividad del punto de chequeo G1 en estados tempranos presumiblemente por la degradación de la proteína supresora de tumores p53 y por lo tanto también son resistentes al arresto del crecimiento y a la apoptosis inducida por p53 por daño al DNA (Kessis et al., 1993; Foster et al., 1994; Pan y Griep 1995; Thomas et al., 1996) Incluso White et al., en 1994 y Kaufmann en 1997, reportan una inestabilidad cromosomal incrementada en células que expresan E6 que probablemente sea por una atenuación observada de la función del punto de chequeo G2. La proliferación incrementada de las células con las variante E6 As-Ai y E en relación a E6 Af podría explicarse en parte por la presencia de menor cantidad de proteína E6 en las células con la variante E6 Af. Por otro lado, aunque los cambios de nucleótidos contenidos en E6 Af favorecen el procesamiento hacia E6\*I (**Tabla 3**), existe una pequeña proporción del transcrito E6 completo en estas células (**Figura 11**). Suponemos con esto, que la proteína E6 completa resultante estaría en pequeñas cantidades, pero a su vez, no se puede descartar la posibilidad de que los dos cambios en

aminoácidos de este producto también puedan repercutir en una función alterada de la proteína E6 Af. Todo esto se traduce en la posibilidad de que exista menos E6 funcional en las células con E6 Af, que aquellas con E6 AsAi y E.

Por otro lado, la presencia de un exceso de E6\*1 en E6Af, también podría repercutir en la función del E6 existente. En 1997, David Pim et al., demostraron que una función de E6\*1, producto del procesamiento de E6, es precisamente evitar la degradación de p53 por E6 ya que esta proteína E6\*1 pierde la capacidad de unirse a p53 pero presenta mayor afinidad por E6, de este modo evita que E6 se una a p53 y la degrade. La variante Africana además de tener menor cantidad de E6 completo tiene mayor cantidad de transcrito E6\*1, lo cual seguramente coopera para que esta variante presente menores niveles de degradación de p53 y mayor cantidad de la proteína proapoptótica Bax. Esto finalmente repercutiría en la proliferación celular diferencial observada entre las variantes.

Con estos resultados podríamos pensar que las proteínas E6s variantes están llevando a cabo una inducción de proliferación celular de una manera dependiente de p53. Sin embargo, resulta importante considerar que los reportes de Shiru Song desde 1999 indican que la hiperproliferación desencadenada por E6 pudiera ser independiente de la proteína p53. En sus estudios mostraron que la epidermis de ratones K14E6/p53-, que son nulos a p53 y se encuentran transformados con E6, es más espesa o densa que la de los ratones no transformados, indicativo de que en esa epidermis se presentó hiperproliferación celular independiente a p53. Además, estas células nucleadas fueron capaces de sintetizar DNA lo que no se observó en los ratones p53 nulos que no tienen E6. Recientemente en 2004, Ilaria Malanchi reporta que E6 puede llevar a cabo la inducción de la proliferación celular independientemente de p53, activando la

fosforilación de Rb, probablemente por medio del incremento de los niveles de complejos de cinasas dependientes de ciclina responsables de la fosforilación de pRb.

Dado estos antecedentes nos interesó determinar si las variantes de E6 podrían presentar diferencias funcionales de forma independiente de p53. Para este análisis se utilizaron células C33 ya que tienen una mutación en la secuencia de la proteína p53 que le impide activar la transcripción de ciertos genes. Dado que esta mutación, está ubicada en el sitio de unión a E6, en estas células las proteínas E6 no se pueden unir a p53 para promover su degradación. Consecuentemente, los niveles de p53 se mantienen similares en las distintas células transfectadas **(Figura 17)**.

Observamos que células c33 transfectadas con las variantes de E6, además de no mostrar cambios en los niveles de la proteína p53, tampoco mostraron cambios en los de la proteína Bax **(Figura 18)**. Sin embargo, las diferencias en los niveles de proliferación celular que se observan son muy claras. Al igual que en las células MCF-7, las células C33 transfectadas con el gen E6 As-Ai, presentaron los mayores índices proliferativos en relación con C33 E y Af, siendo la variante Af la que presentó los menores índices proliferativos **(Figura 19 y 20)**. Además, el observar una reproducibilidad de los datos con las diferentes clonas para cada variante de E6 para esta línea celular, nos permitió descartar que el sitio de integración tuviera que ver con las diferencias proliferativas presentadas por las variantes de E6 **(Figura 19)**.

Por consiguiente, buscamos rutas de proliferación celular donde se reporta la intervención E6 de manera independiente a p53, entre las que se encuentran las vías de hDLG y la de cMyc. hDLG está involucrada en la vía de señalización

inducida por la proteína supresora de tumores hDLG homologa de la proteína supresora de tumor Dlg de *Drosophila* la que fue de nuestro interés. La proteína hDLG resulta ser blanco de degradación de E6 además de estar implicada en proliferación celular independiente de p53 ya que su papel clave es el de estabilizar a la proteína PTEN en la membrana celular. La proteína PTEN estabilizada es una proteína tirosina fosfatasa que desfosforila en la posición 3 al inositol, bloqueando así la actividad de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI-3K).(Gottschalk, 2001). La enzima PI3K al ser inhibida, detiene la señalización de la vía de PKB/Akt, (Proteína cinasa B), encargada del control de procesos biológicos como la proliferación, la motilidad celular y la apoptosis (Leslie et al., 2001, Yamada et al., 200, Lawlor et al., 2000). Se propone que la degradación de hDLG por E6, repercute en el bloqueo de la inhibición de la vía de PKB/Akt, lo que se refleja en una proliferación celular activa.

Con este antecedente se hizo un análisis para determinar el efecto de E6 sobre hDLG en las dos líneas celulares estudiadas, MCF-7 y C33A. Encontramos que tanto en las células MCF-7 como en las células C33, E6 tiene la capacidad de degradar a hDLG de una manera diferencial y proporcionalmente a los niveles de la proteína E6 presente (**Figura 21 y 22**). En base a este resultado creemos que la vía de señalización en la que hDLG tiene un papel importante, pudiera estar implicada en el efecto de proliferación promovido por E6 independiente de p53.

En base a los resultados encontrados en este trabajo pensamos que además de que las variantes de E6 promueven la proliferación celular diferencial en las líneas celulares C33A y MCF-7, E6 pudiera al mismo tiempo estar afectando el proceso de apoptosis celular de una forma diferencial en las mismas células.

Con estos resultados podemos concluir que la variante As-Ai de E6, favorece la proliferación celular en las células MCF-7 y C33A. A pesar de que las células C33A tienen a p53 no funcional E6 As-Ai y E inducen hiperproliferación celular por lo que se puede deducir que tal proliferación es independiente de p53 y dado que en ambas células se presentaron cambios a nivel de la proteína hDLG independientemente de las condiciones de las células, podemos pensar que muy probablemente la vía de señalización de hDLG tiene un papel muy importante en la proliferación celular inducida por estas variantes de E6.

En este momento, en nuestro laboratorio se está analizando la participación de E6 en la vía de señalización por hDLG en la ruta de proliferación celular en las células MCF-7 y C33A así como la participación de la vía de cMyc en el proceso proliferativo.

El hecho de que se hayan encontrado diferencias en los niveles de proteínas involucradas con apoptosis celular podría implicar que E6 afecta el proceso apoptótico, (Li TT. et al., 2005). Para definir el papel exacto de las variantes de E6 en el proceso de apoptosis celular, se pretende realizar un trabajo que incluya el análisis de otras proteínas involucradas en el proceso de apoptosis celular tanto de la vía intrínseca como de la extrínseca, además de examinar los niveles de apoptosis desencadenados por cada una de las variantes de E6 en ambas líneas celulares así como cambios que se pudieran presentar a nivel mitocondrial.

Hemos demostrado que las diferencias genómicas entre variantes de E6 pudieran participar en diferencias en el comportamiento biológico de variantes de HPV18. Estudios como el presente se verían robustecidos con el análisis de otros



genes importantes de HPV involucrados en el proceso de transformación, como son E7, E2, E1, así como la actividad transcripcional de la región LCR.

Estudios enfocados a la caracterización funcional de las distintas proteínas de variantes de HPV18, aportarán información valiosa que ayudará a entender las asociaciones de tipos y variantes virales con lesiones de diversos niveles de malignidad con el fin de delimitar variantes de HPV de alto riesgo oncogénico.

## CONCLUSIONES

\* E6 de la variante As-Ai de HPV 18 provoca una evidente disminución de los niveles de la proteína p53 en relación con la variante E y más notoriamente que la variante Af lo cual tiene una repercusión en el proceso proliferativo y muy probablemente en el proceso apoptótico.

\* La disminución de los niveles de p53 para la variante As-Ai, repercutieron en una disminución de los niveles de la proteína Bax para la misma variante con respecto a la variante Af, lo que significa que los bajos niveles de p53 en este caso repercuten en sus blancos y que en esta variante también pudiera estar afectado el proceso apoptótico.

\* Los cambios presentes en la secuencia de nucleótidos de la variante As-Ai de E6 provocaron que una mayor cantidad de E6 completa con respecto a E6 E y Af, promoviera una proliferación celular mayor que las células transfectadas con E6 var E. Y más notoriamente que E6 Af cuyos niveles de E6 completo son menores.

\* La proliferación celular inducida por E6 As-Ai se mostró independiente de p53, y la participación de otras vías como la de hDLG probablemente tiene un papel muy importante en el proceso proliferativo inducido por E6.

**REFREFERENCIAS**

Arends MJ, Donaldson YK, Duvall E, Wyllie AH, Bird CC. Human papillomavirus type 18 associates with more advanced cervical neoplasia than human papillomavirus type 16. *Hum Pathol.* Apr;24(4):432-7, 1993.

Alonso P, Lazcano E, Hernández M. Cáncer cérvico-uterino; diagnóstico, prevención y control. Ed. Panamericana, Cap 1 y 7. Julio 2000.

Barbosa MS, Schlegel R. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. *Oncogene.* Dec;4(12):1529-32, 1989.

Bekkers RL, Massuger LF, Bulten J, Melchers WJ., Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. *Rev Med Virol.* Mar-Apr;14(2):95-105. 2004

Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. 1: *J Infect Dis.* Nov;170(5):1077-85, 1994.

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst.* Jun 7;87(11):796-802. 1995

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. 1: *J Natl Cancer Inst.* Jun 7;87(11):796-802, 1995.

Chen JJ, Reid CE, Band V, Androphy EJ. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science.* Jul 28;269(5223):529-31, 1995.

Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P. Hybrid Capture II-based human papillomavirus detection, a sensitive test to detect in routine high-grade cervical lesions: a preliminary study on 1518 women. *Br J Cancer.* Jul;80(9):1306-11, 1999.

Crusius K, Auvinen E, Alonso A. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene.* Sep 18;15(12):1437-44. 1997.

Czegledy J, Evander M, Hernadi Z, Gergely L, Wadell G. Human papillomavirus type 18 E6\* mRNA in primary tumors and pelvic lymph nodes of Hungarian patients with squamous cervical cancer. *Int J Cancer*. Jan 15;56(2):182-6, 1994.

Charlot JF, Pretet JL, Haughey C, Mouglin C. Mitochondrial translocation of p53 and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) dissipation are early events in staurosporine-induced apoptosis of wild type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis*. May;9(3):333-43. 2004

Dalal S, Gao Q, Androphy EJ, Band V. Mutational analysis of human papillomavirus type 16 E6 demonstrates that p53 degradation is necessary for immortalization of mammary epithelial cells. *J Virol*. Feb;70(2):683-8, 1996.

De la Cruz-Hernandez E, Garcia-Carranca A, Mohar-Betancourt A, Duenas-Gonzalez, A, Contreras-Paredes A, Perez-Cardenas E, Herrera-Goepfert R, Lizano-Soberon M. Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *J Gen Virol*. Sep;86(Pt 9):2459-68, 2005.

Diane M. Da silva, Gretchen L, Eiben, Steven C, Faust, Mark T. Wakabayashi, Michael P. Rudolf, Markwin P. Velders, W. Martin Kast. Cervical cancer vaccines: Emerging concepts and developments. *J. of Cellular of physiology* 186:169-182, 2001.

Demers GW, Foster SA, Halbert CL, Galloway DA. Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 10;91(10):4382-6, 1994.

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. Feb 17;243(4893):934-7, 1989.

Ellis JR, Keating PJ, Baird J, Hounsell EF, Renouf DV, Rowe M, Hopkins D, The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nat Med*. May; 1(5):464-70. 1995

Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonninyom S, Gonzalez S, Crum CP, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 29;97(18):10002-7, 2000.

Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem*. Jun 14;277(24):21730-9. Epub 2002 Apr 4. 2002

Francis JM, Heyworth CM, Spooncer E, Pierce A, Dexter TM, Whetton AD. Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis independently of p53 and

selectively reduces expression of Bcl-2 in multipotent hematopoietic cells. *J Biol Chem.* Dec 15;275(50):39137-45, 2000.

Gardiol D, Kuhne C, Glaunsinger B, Lee SS, Javier R, Banks L. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene.* Sep 30;18(40):5487-96, 1999.

Gross-Mesilaty S, Reinstein E, Bercovich B, Tobias KE, Schwartz AL, Kahana C, Ciechanover A. Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 7;95(14):8058-63, 1998.

Grossman SR, Laimins LA. E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene.* Sep;4(9):1089-93, 1989.

Hanahan D, Weinberg RA., The hallmarks of cancer. *Cell.* Jan 7;100(1):57-70. 2000

Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science.* Dec 16;266(5192):1821-8, 1994.

Hecht JL, Kadish AS, Jiang G, Burk RD. Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int J Cancer.* Jan 27;60(3):369-76, 1995.

Hsin Pai LI1, Yu Wei LEU2, Yu Sun CHANG1, Epigenetic changes in virus-associated human cancers, *Cell Research*, 15(4):262-271, Apr 2005

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* Dec;10(13):4129-35, 1991.

Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell.* Dec 8;103(6):839-42. 2000

Hwang ES, Nottoli T, Dimaio D. The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology.* Aug 1;211(1):227-33, 1995.

Iftner T, Elbel M, Schopp B, Hiller T, Loizou JI, Caldecott KW, Stubenrauch F. Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *EMBO J.* Sep 2;21(17):4741-8, 2002.

Kanda T, Watanabe S, Zanma S, Sato H, Furuno A, Yoshiike K. Human papillomavirus type 16 E6 proteins with glycine substitution for cysteine in the metal-binding motif. *Virology.* Dec;185(2):536-43, 1991.

Kaufmann WK, Schwartz JL, Hurt JC, Byrd LL, Galloway DA, Levedakou E, Paules RS. Inactivation of G2 checkpoint function and chromosomal destabilization are linked in human fibroblasts expressing human papillomavirus type 16 E6. *Cell Growth Differ.* Oct;8(10):1105-14. 1997

Kessis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM, Lorincz AT, Hedrick L, Cho KR. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 1;90(9):3988-92. 1993

Lawlor MA, Rotwein P. Insulin-like growth factor-mediated muscle cell survival: central roles for Akt and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Mol Cell Biol.* Dec;20(23):8983-95. 2000

Lechner MS, Laimins LA. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol.* Jul;68(7):4262-73. 1994

Li TT, Zhao LN, Liu ZG, Han Y, Fan DM. Regulation of apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene. *World J Gastroenterol.* Feb 21;11(7):931-7, 2005.

Lizano M, Berumen J, Guido MC, Casas L, Garcia-Carranca A. Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* Aug 20;89(16):1227-31, 1997.

Lizano M, De la Cruz-Hdez E, Carrillo-García A, Ponce de Leon S, Dueñas A, Hernández DM, García-Carrancá A, Mohar A. Distribution of HPV-16 and -18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions and cervical cancer in a Mexican population. *Gynecol Oncol.* Aceptado a publicación mayo 2005.

Leslie NR, Bennett D, Gray A, Pass I, Hoang-Xuan K, Downes CP. Targeting mutants of PTEN reveal distinct subsets of tumour suppressor functions. *Biochem J.* 2001 Jul 15;357(Pt 2):427-35.

Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol.* Mar;79(3):328-37, 1992.

Malanchi I, Accardi R, Diehl F, Smet A, Androphy E, Hoheisel J, Tommasino M. Human papillomavirus type 16 E6 promotes retinoblastoma protein phosphorylation and cell cycle progression. *J Virol.* Dec;78(24):13769-78. 2004

Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene.* Nov 26;20(54):7874-87, 2001.

McLachlin CM, Tate JE, Zitz JC, Sheets EE, Crum CP. Human papillomavirus type 18 and intraepithelial lesions of the cervix. *Am J Pathol.* Jan;144(1):141-7, 1994.

Milde-Langosch K, Schreiber C, Becker G, Loning T, Stegner HE. Human papillomavirus detection in cervical adenocarcinoma by polymerase chain

reaction. *Hum Pathol.* Jun;24(6):590-4, 1993.

Mohar A, Frias-Mendivil M. Epidemiology of cervical cancer. *Cancer Invest.* 2000;18(6):584-90.

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* Feb 6;348(6):518-27, 2003.

Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Pfister H, Tay SK, ter Meulen J, Villa LL, et al. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol.* Nov;67(11):6424-31, 1993.

Pan H, Griep AE. Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes Dev.* Sep 1;9(17):2157-69. 1995

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer.* Mar 15;80(6):827-41, 1999.

Paulovich AG, Toczyski DP, Hartwell LH. When checkpoints fail. *Cell.* Feb 7;88(3):315-21, 1997.

Pim D, Massimi P, Banks L. Alternatively spliced HPV-18 E6\* protein inhibits E6-mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. *Oncogene.* Jul 17;15(3):257-64, 1997.

Pim D, Banks L. HPV-18 E6<sup>l</sup> protein modulates the E6-directed degradation of p53 by binding to full-length HPV-18 E6. *Oncogene.* Dec 9;18(52):7403-8, 1999.

Rapp L, Chen JJ. The papillomavirus E6 proteins. *Biochim Biophys Acta.* Aug 19;1378(1):F1-19, 1998.

Reznikoff CA, Belair C, Savelieva E, Zhai Y, Pfeifer K, Yeager T, Thompson KJ, DeVries S, Bindley C, Newton MA, et al. Long-term genome stability and minimal genotypic and phenotypic alterations in HPV16 E7-, but not E6-, immortalized human uroepithelial cells. *Genes Dev.* Sep 15;8(18):2227-40, 1994.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* Nov 5;75(3):495-505, 1993.

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.* Jun 16;85(12):958-64. 1993

Seedorf K, Krammer G, Durst M, Suhai S, Rowekamp WG. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*. Aug;145(1):181-5, 1985.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. Jun 15;13(12):1501-12, 1999.

Slebos RJ, Lee MH, Plunkett BS, Kessis TD, Williams BO, Jacks T, Hedrick L, Kastan MB, Cho KR. p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 7;91(12):5320-4, 1994.

Smotkin D, Prokoph H, Wettstein FO. Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J Virol*. Mar;63(3):1441-7, 1989.

Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Anderson JM, Cantley LC. Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275:73-77. 1997

Song S, Pitot HC, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol*. Jul;73(7):5887-93. 1999

Stewart ZA, Westfall MD, Pietenpol JA. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*. Mar;24(3):139-45, 2003.

Stoppler MC, Ching K, Stoppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol*. Oct;70(10):6987-93. 1996

Thomas M, Matlashewski G, Pim D, Banks L. Induction of apoptosis by p53 is independent of its oligomeric state and can be abolished by HPV-18 E6 through ubiquitin mediated degradation. *Oncogene*. Jul 18;13(2):265-73. 1996

Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*. Dec 13;18(53):7690-700, 1999.

Tong X, Howley PM. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 29;94(9):4412-7, 1997.

Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8211-6. Jun 23, Epub 2003



Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Pathol. Sep*;189(1):12-9, 1999.

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science. Apr 6*;248(4951):76-9,1990.

White AE, Livanos EM, Tlsty TD. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev. Mar 15*;8(6):666-77, 1994.

Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, Holmes KK, Kiviat NB. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst. Jun 4*;89(11):796-802, 1997.

Xiong Y, Kuppuswamy D, Li Y, Livanos EM, Hixon M, White A, Beach D, Tlsty TD. Alteration of cell cycle kinase complexes in human papillomavirus E6- and E7-expressing fibroblasts precedes neoplastic transformation. *J Virol. Feb*;70(2):999-1008, 1996.

Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res. Feb 15*;58(4):829-33, 1998.

zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta. Oct 9*;1288(2):F55-78. 1996