

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**REGULACION DEL PROMOTOR DEL GEN DE IL-10 POR
PAPILOMAVIRUS HUMANO EN CELULAS EPITELIALES
TRANSFORMADAS DERIVADAS DE CERVIX**

PRESENTA

BIOL. VICTOR HUGO BERMUDEZ MORALES

**COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., MEXICO
JUNIO DEL 2000**

TM

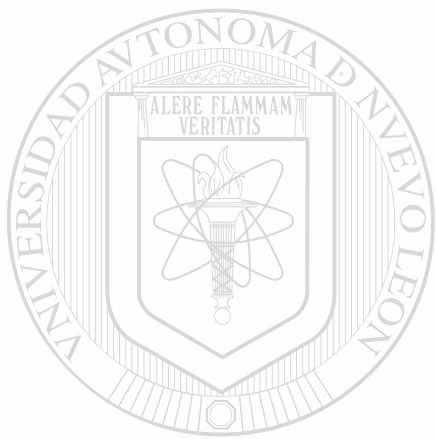
RC280

.U8

B47

2000

c.1



UANL

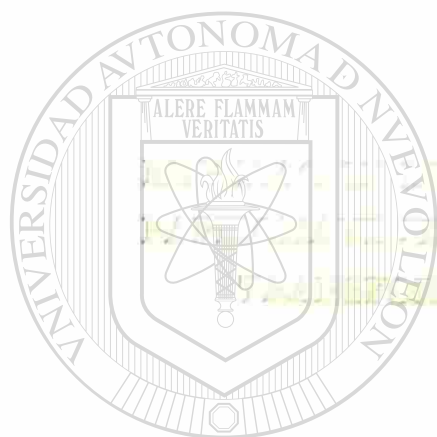
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



UANL

PRESENTA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

BIOL. VICTOR HUGO BERMUDEZ MORALES

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

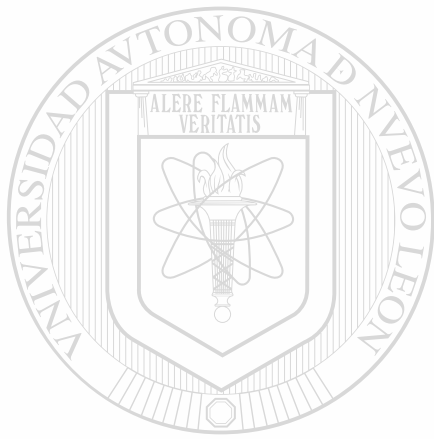
COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGÍA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., MEXICO

JUNIO DEL 2000



TM
RC280
.U8
B47
2000



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**REGULACION DEL PROMOTOR DEL GEN DE IL-10 POR PAPILOMAVIRUS
HUMANO EN CELULAS EPITELIALES TRANSFORMADAS
DERIVADAS DE CERVIX**

PRESENTA

BIOL. VICTOR HUGO BERMUDEZ MORALES

DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

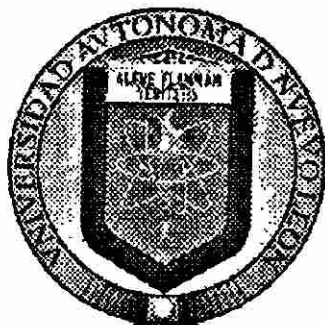
**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN INMUNOBIOLOGIA**

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L. MEXICO

JUNIO DEL 2000

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**REGULACION DEL PROMOTOR DEL GEN DE IL-10 POR
PAPILOMAVIRUS HUMANO EN CELULAS EPITELIALES
TRANSFORMADAS DERIVADAS DE CERVIX**

COMISION DE TESIS

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Presidente

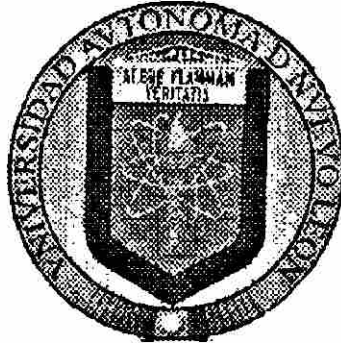
Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Dr. Reyes S. Taméz Guerra
Vocal

Dr. Vicente Madrid Marina
Vocal

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**REGULACION DEL PROMOTOR DEL GEN DE IL-10 POR
PAPILOMAVIRUS HUMANO EN CELULAS EPITELIALES
TRANSFORMADAS DERIVADAS DE CERVIX**

DIRECCION DE TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DIRECTOR INTERNO

DR. JUAN MANUEL ALCOGER GONZALEZ

DIRECTOR EXTERNO

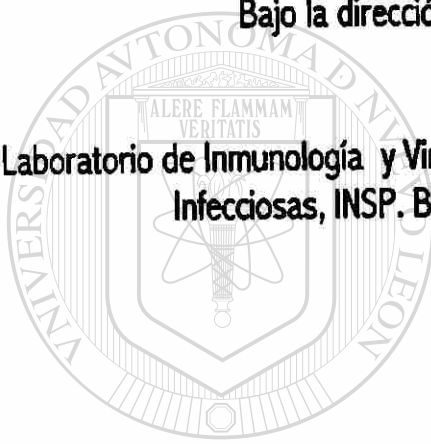
DR. VICENTE MADRID MARINA

AREA DE TRABAJO

El presente trabajo se desarrolló en:

**Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencia biológicas de la UANL
Bajo la dirección del Dr. Juan Manuel Alcocer González**

**Laboratorio de Inmunología y Virología del Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades
Infecciosas, INSP. Bajo la dirección del Dr. Vicente Madrid Marina**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



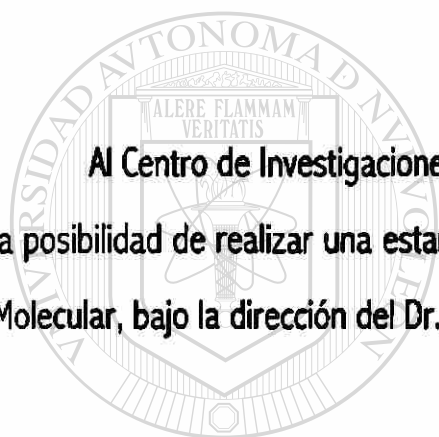
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CREDITOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca de maestría, cubriendo los gastos de inscripción, materias, seguro y manutención, que me permitió lograr la obtención de este grado.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por haberme aceptado en su programa de postgrado en la Facultad de Ciencias Biológicas.

Al Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas del INSP, por brindarme la posibilidad de realizar una estancia de trabajo en el laboratorio de Inmunología y Virología Molecular, bajo la dirección del Dr. Vicente Madrid Marina.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

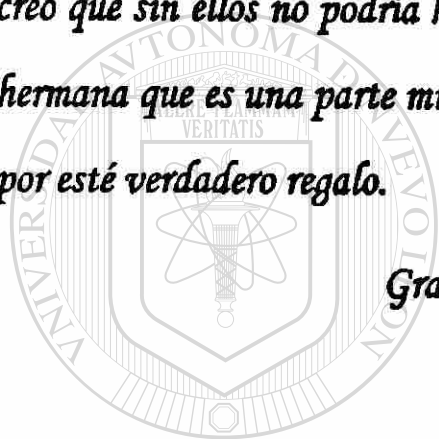


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado en primer lugar a Dios por permitirme alcanzar una meta más en mi vida profesional. También a mi familia que aunque no estoy con ellos, recibo todo su cariño y apoyo para seguir adelante, creo que sin ellos no podría haber realizado este pequeño sueño. Así como a mi hermana que es una parte muy importante de la familia que tengo, gracias dios por esté verdadero regalo.

Gracias, Señor.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar les doy gracias a mis padres: Jose Miguel Bermúdez Ceja e Irma Morales Calixto, por apoyarme en todo momento en mi vida personal y profesional, creo que la mejor herencia que me han dado es mi preparación profesional, la libertad y el apoyo incondicional para realizar mis sueños.

A mis hermanos por su apoyo que aunque soy la oveja que esta fuera de casa, ellos están para apoyarme y guiarme con su ejemplo. Gracias a todos.

Agradezco al Dr. Juan Manuel Alcocer y por invitarme a realizar los estudios de postgrado en la Universidad Autónoma de Nuevo León, y por permitirme formar parte de su grupo de investigación y sobre todo por aguantarme.

Agradezco a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y al Dr. Reyes Taméz, por abrirme las puertas de su laboratorio y por apoyarme en la realización del trabajo experimental.

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Vicente Madrid Marina por ser una de las personas más generosas que he conocido. Gracias por escucharme, por que cuento con un gran amigo que no importando el lugar donde me encuentre siento su apoyo incondicional y sobre todo por creer en mi.

Agradezco a la familia Madrid por haberme abierto las puertas de su hogar para conmigo. Creo que soy muy afortunado en conocer gente como ustedes.

Agradezco al QBP. Angel Rubalcaba por que cuando yo llegue a Monterrey tu fuiste la persona que me enseñó y ayudo en el trabajo experimental.

Con afecto agradezco al Dr. Oskar Peralta y al Q. Hubaldo por su valiosa ayuda en la realización de los análisis de EMSA del trabajo experimental.

Doy las gracias a la M en C. Juany Reyna por ser una de las personas del laboratorio que fueron claves durante la maestría y sobre todo por ser mi amiga.

Gracias al Dr. Pablo Zapata y al QBP. Herminio Fuentes por su valiosa ayuda durante mi estancia en el laboratorio, ya que en el instante que necesite algo estuvieron para apoyarme.

Agradezco a la Dra. Diana Resendez por su apoyo y guiarme en los problemillas que surgen durante el trabajo experimental.

Agradezco a la Dra. Lilita Guzmán Rojas por su apoyo y por su gran virtud de generosidad: Te quiero mucho Lili.

Agradezco a mi cuate el Biol. Luis G. Bermúdez por su ayuda durante todo el postgrado, gracias Luisin.

Gracias a todos los que forman parte del laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, por que de alguna u otra forma me apoyaron, nunca tuve una negativa para conmigo.

Gracias al Dr. Martín Canizal del departamento de bioquímica de la Facultad de Medicina, por su valiosa ayuda para la realización de este trabajo experimental.

Gracias a todos mis amigos y compañeros del laboratorio: QBP. Itza Luna, QBP, Nelly González, QBP. Angel Rubalcaba, QBP. Sigifredo Lazcano, al Med. Daniel Molina, QBP. Martha Garza, QBP. Janete Burget, M en C. Juany Reyna, Nayma Cortes, Biol. Luis Bermúdez. M en C. Julian. M en C. Moisés Franco, QBP. Laura Hernández, QBP. Linda Velma, M en C. Ester Treviño, M en C. Irma Martínez, M en C. Eugenio Roman, M en C. Leonardo Cartillo, M en C. Jose Luis Mendez, Dra. Lidia Rivera, QBP. Herminio Fuentes, Sabino Sandoval, Martha Fraustro, Miriam Cedillo, Dr. Pablo Zapata, DR. Roberto Montes de Oca. A las secretarias: Ileana Cavazos, Beatriz Reyna. A don Cato Reta, Quijano, Berta Morales y Perita Velmares.

Gracias a mis amigos y compañeros del laboratorio del Dr. Madrid: Dr. Orkar Peralta, M en C. Carmen Barbosa, Biol.. Margarita Bahena, Biol. Cinthya Díaz, Q. Hubaldo. A todas las Chapanecas: Daisy, Flor, Alma y[®] Arseni.

Especialmente a todos mis compañeros de la maestría: Natalia Cerutti, Guadalupe Rojas, Ivon Lechuga, Enriqueta Martínez, Beatriz Gómez, Miriam Elias, Rubi Salazar, Porfiria, Miriam Rutiago, Genoveva Alvarez y Sigifredo Lazcano.

INDICE GENERAL

PORTADA	I
COMISION DE TESIS	II
DIRECCION TESIS	III
AREA DE TRABAJO	IV
CREDITOS	V
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTOS	VII
INDICE GENERAL	IX
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	XII
ABREVIATURAS	XIV
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	
I. ASPECTO GENERALES DEL CANCER CERVICAL	
1.1 ASOCIACION DEL HPV CON CANCER CERVICAL	4
1.2 INFECCION DEL HPV EN CELULAS EPITELIALES	5
1.3 PROCESO DE TRANSFORMACION POR HPV	7
II. ORGANIZACION Y REGULACION GENETICA DE LOS PAPILOMAVIRUS	
2.1 BIOLOGIA MOLECULAR DE PAPILOMAVIRUS	8
2.2 PROTEINAS DE TRANSCRIPCION TEMPRANA (E1, E2 ,E4, E5, E6 y E7)	10
2.3 PROTEINAS DE LA CAPSIDE VIRAL (L1 y L2)	18
2.4 REGION LARGA DE CONTROL (LCR)	19
2.5 ELEMENTOS DE TRANSCRIPCION BASAL	22
2.6 TRANSCRIPCION TEJIDO ESPECIFICA	23
III. ESTRUCTURA DEL GEN Y PROTEINA DE E2	
3.1 FUNCIONES BIOLOGICAS DE E2	24
3.2 PRODUCTOS DEL GEN	25
3.3 ESTRUCTURA DE LA PROTEINA	26
3.4 FOSFORILACION	27
3.5 LOCALIZACION	27
3.6 SITIOS DE UNION A DNA	28
3.7 DIMERIZACION	29
	IX

3.8 TRANSACTIVACION	30
3.9 REPRESION TRANSCRIPCIONAL	30
3.10 INTERACCION CON PROTEINAS CELULARES	31
3.11. REPLICACION	31
IV. RESPUESTA INMUNE A LA INFECCION POR PAPILOMAVIRUS	
4.1 RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL	33
4.2 CITOCINAS Y CANCER	37
V. INTERLEUCINA IL-10	
5.1 ESTRUCTURA DEL GEN HUMANO Y DE RATON	39
5.2 REGION REGULADORA DE IL-10	41
5.3 ESTRUCTURA DE LA PROTEINA IL-10	43
5.4 HOMOLOGIA CON EL VIRUS DE EPSTEIN BARR	45
5.5 CELULAS QUE EXPRESAN IL-10	45
5.6 ACTIVIDADES BIOLOGICAS DE IL-10	46
5.7 CITOCINAS EN CANCER CERVICAL	48
IMPORTANCIA	49
ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACION	49
HIPOTESIS	50
OBJETIVO GENERAL	50
OBJETIVOS ESPECIFICOS	50
REACTIVOS Y EQUIPO	51
<hr/>	
METODOS	
1. DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS	54
2. AMPLIFICACION DE LA REGION REGULADORA DEL GEN DE IL-10	54 [®]
3. CLONACION EN EL VECTOR pGEM-T	54
4. SUB-CLONACION EN EL VECTOR pGL-2 BASIC	55
5. ANALISIS DE DELECCIONES DE LA REGION REGULADORA DEL GEN DE IL-10	55
6. CULTIVO DE LINEAS CELULARES	56
7. TRANSFECCION EN CELULAS C33-A	56
8. CUANTIFICACION DE LUMINISCENCIA	56
9. INDUCCION Y PURIFICACION DE LA PROTEINA GST-E2 DE HPV-31	57
10. WESTERN BLOTT	57
11. PREPARACION DE EXTRACTOS NUCLEARES	58
12. SINTESIS Y MARCAJE DE OLIGONUCLEOTIDOS	58
13. ELECTROFORESIS DE MOVILIDAD RETARDADA (EMSA)	58
RESULTADOS	60
FUGURAS	67
DISCUSION	85
CONCLUSIONES	92

PERSPECTIVAS

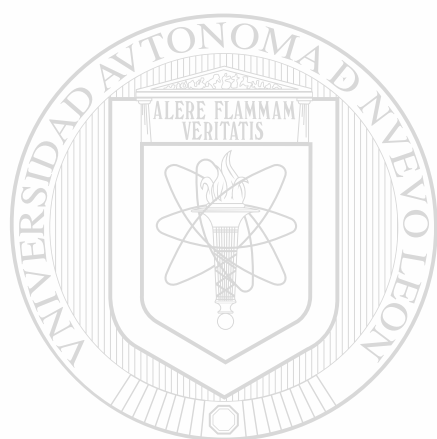
93

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

94

APENDICE

121



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE FIGURAS

1. Representación de la infección de HPV.	6
2. Representación esquemática de la organización genómica de HPV 16 y proteínas virales.	9
3. Proteína E6 de HPV 16.	15
4. Diagrama del LCR de HPV 16.	20
5. Estructura de las tres proteínas de E2 de BPV1.	26
6. Modelo de la estructura del dímero de E2 de HPV 31 y su unión a DNA.	27
7. Degradación, transporte y presentación de los antígenos de HPV al MHC clase I.	34
8. Degradación, transporte y presentación de los antígenos de HPV al MHC clase II.	35
9. Respuesta inmune antitumoral.	38
10. Localización cromosomal del gen de IL-10.	40
11. Estructura esquemática de la proteína hIL-10.	43
12. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de IL-10 humano, murino, ratón y porcino.	45
13. Secuencia de la región reguladora del gen de hIL-10.	67
14. Amplificación de la región reguladora del gen de hIL-10.	68
15. Patrón de restricción de la región reguladora del gen de hIL-10.	69
16. Secuencia de las primeras 530 pb de la región 5' distal de la región reguladora del gen de hIL-10.	70
17. Elementos de regulación transcripcional presentes en la región reguladora del gen de hIL-10.	71
18. Clonación de la región reguladora del gen de hIL-10 en el vector pGEM-T.	72
19. Clonación de la región reguladora del gen de hIL-10 en el vector pGL-2 vector.	73
20. Análisis de deleciones de la región reguladora del gen de hIL-10 en el vector pGL-2 vector.	74
21. A). Análisis de funcionalidad: Transfección en células C33-A.	75
22. B). Análisis de funcionalidad: Transfección en células C33-A.	76
23. Caracterización de la construcción pGEX-31E2.	77
24. Inducción y determinación de la proteína quimérica GST-31E2 de HPV 31.	78
25. Purificación de la proteína quimérica GST-E2 de HPV 31.	79
26. Ensayo de EMSA utilizando las sondas E2HPV, E2TGF- β y E2IL-10 con extractos nucleares de células HeLa.	80

27. Competencia heteróloga con la sonda E2HPV utilizando un gradiente de poli dI-dC y extractos nucleares de la línea celular HeLa.	81
28. Ensayo de EMSA utilizando las sondas E216 y E2IL-10 con extractos nucleares de la línea celular HeLa.	82
29. Ensayo de EMSA utilizando las sondas E2HPV, E216 y E2IL-10 con extractos nucleares de las líneas celulares HeLa y C33-A.	83
30. Ensayo de EMSA utilizando la sonda E2IL-10 con la proteína quimérica GST-E2 de HPV.	84
31. Niveles de expresión de IL-10, E2, E6 y E7 durante la evolución del cáncer de cervix.	89
32. Vías por las cuales se puede inducir la expresión de la hIL-10 en cáncer cervical.	91

INDICE DE TABLAS

1. Proteínas que interaccionan con E6 de HPV.	16
2. Secuencias putativas de sitios de unión de factores de transcripción en el LCR de HPVs.	22
3. Número de células positivas por los marcadores de superficie CD4+ y CD8+.	36
4. Secuencias de control de la transcripción del gen de hIL-10.	42
5. Secuencias de control de la transcripción del gen de mL-10.	42
6. Secuencias de oligonucleótidos.	59
7. Actividad de E2, E5, E6 y E7 de HPV en la regulación de promotores putativos.	90

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ABREVIATURAS

Ad	Adenovirus
APC	Célula presentadora de antígeno
B-1	Linfocito B (Ly-1)
B7	Molécula coestimuladora B7
BCRF-1	Gen BCRF1 del virus de Epstein Barr
bIL-10	Interleucina 10 bovina
BPV	Virus de papiloma bovino
BR2	Segunda señal del dominio de transactivación
CaCu	Cáncer cervico uterino
CD	Antígeno de Diferenciación Celular
cDNA	Cadena complementaria del DNA
CMV	Citomegalovirus
Con A	Concanavalina A
CRE	Elementos de respuesta a AMPc
CRPV	Papilomavirus específico de conejo
CSIF	Factor inhibidor de la síntesis de citocinas
CTL	Linfocito T citotóxico
DMEM	Medio modificado Eagle's Dulbecco's
DNA	Ácido deoxiribunucleico
E2 16	Elemento de respuesta a la proteína E2 en el LCR de HPV16
E2HPV	Secuencia consenso para E2 de papilomavirus genitales
E2IL-10	Elemento de respuesta a la proteína E2 en la región reguladora de la IL-10.
EBV	Virus de Epstein Barr
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGF-R	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMSA	Electroforesis de movilidad retardada
EV-HPV	Virus de papiloma humano asociado a epidermoplastias verruciformes
G-CSF	Factor estimulante de granulocitos
GRE	Elementos de respuesta a glucocorticoides
GST	Glutación-S-Transferasa
hIL-10	Interleucina 10 humana
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HLIS	Lesión intraepitelial escamosa de alto grado

HPV	Virus de papiloma humano
ICAM	Moléculas de adhesión celular
IL	Interleucina
LCR	Región larga de control
LIS	Lesión intraepitelial escamosa
LLIS	Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado
LPS	Lipopolisacaridos
LTR	Región terminal repetida
MAP-Cinasas	Proteínas cinasas activadas en mitosis
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
mIL-10	Interleucina 10 murina
MMLV	Virus de leucemia murina
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NK	Células asesinas naturales
NLS	Secuencias de localización nuclear
ORF	Marco de lectura abierta
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPA	Proteína de replicación celular RPA
RE	Reticulo endoplásmico
rIL-10	Interleucina 10 de rata
RNA	Acido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
SV40	Virus de simio 40
TAP	Proteínas transportadoras asociadas a la presentación del antígeno
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TcR	Receptor de células T
TFIIB	Factor de transcripción TFIIB
TFIID	Factor de transcripción TFIID
TGF- β	Factor de crecimiento transformate β
TIIF	Factor de transcripción TIIF
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
UV	Luz ultravioleta

RESUMEN

El virus del papiloma humano (HPV) es el principal agente asociado al cáncer cervical (CaCu), el cual está presente en aproximadamente el 90% de los tumores de la región cervical. Se ha determinado que durante su desarrollo se producen alteraciones en las células epiteliales transformadas por HPV y en la respuesta inmune local montada por el organismo, por tal motivo y ante la magnitud del cáncer de cérvix, varios estudios están enfocados al entendimiento de la respuesta inmune local del organismo contra las células tumorales y los mecanismos de evasión tumoral, con el fin de establecer estrategias para el tratamiento del CaCu. Recientemente hemos encontrado que en estadios avanzados del CaCu, se producen de manera local ciertas citocinas Th2 y proinflamatorias (IL-4, IL-10 y TGF- β) favoreciendo un estado de inmunosupresión local. Particularmente se ha determinado que la interleucina 10 es producida en las células epiteliales coilocíticas y su expresión es directamente proporcional al desarrollo del cáncer cervical inducida por papilomavirus. Estos resultados indican que existe una relación directa entre la presencia del HPV y la expresión de IL-10 en las células epiteliales del cérvix, por lo que se propone que algunas proteínas virales (E2, E6 y E7) pueden ser las responsables de regular la expresión de esta citocina. Así debido a la asociación entre la expresión de la IL-10 y la presencia del virus de papiloma humano en cáncer cervical, y a la presencia de un elemento de respuesta a la proteína E2 de papilomavirus en la región reguladora del gen de la IL-10, es probable que el virus sea capaz de regular la expresión de IL-10, por lo tanto el objetivo fue demostrar el papel del virus del papiloma humano en regular la expresión de la interleucina 10. Para lo cual se amplificó por PCR la región reguladora del gen de hIL-10, la cual se confirmó por un análisis de restricción y por medio de secuenciación, el fragmento amplificado fue donado en el vector pGL-2, creando la construcción pGL-2/IL-10A. Adicionalmente se realizaron dos deleciones de tal región, la construcción pGL-2/IL-10B contiene toda la región amplificada sin el elemento de respuesta a la proteína E2 y la construcción pGL-2/IL-10C solo contiene los elementos de transcripción basal; estas construcciones fueron utilizadas para transfectar la línea celular C33-A y cotransfectar con el plásmido pCMV16E2, el cual expresa la proteína E2 de HPV 16. Se encontró una mayor expresión del gen de luciferasa en la construcción con la región reguladora completa en presencia de la proteína E2 de HPV 16, sin embargo, en las construcciones con las deleciones se registra una disminución de la expresión del gen reportero en presencia de la proteína E2. La proteína E2 de HPV 31 fue purificada por medio de un sistema GST, esta se utilizó para realizar ensayos de electroforesis de movilidad retardada (EMSA), junto con oligonucleótidos específicos para: a) La proteína E2 presente en el LCR del genoma del HPV 16, b) La secuencia consenso de E2 para papilomavirus genitales y c) El elemento de respuesta a E2 presente en la región reguladora del gen de la hIL-10, y además usando extractos nucleares de las líneas celulares HeLa y C33-A. Los análisis de EMSA demuestran la formación de un complejo en todos los oligos con ambos extractos nucleares, aunque C33-A sea negativa a HPV, lo que sugiere a una nueva proteína nuclear que reconoce el elemento de respuesta a la proteína E2 y a se detecta en extractos nucleares de células C33-A negativas a papilomavirus. Al utilizar la proteína E2 purificada el complejo detectado es más pesado, lo que indica por una parte que la proteína detectada anteriormente no es E2 y por otro lado que la proteína purificada es capaz de reconocer el elemento de respuesta a E2 presente en la región reguladora del gen de hIL-10. Con estos resultados se puede concluir que la proteína E2 de papilomavirus no solo es capaz de reconocer el elemento de respuesta a E2 de HPV presente en la región reguladora del gen de hIL-10, si no que también es capaz de transactivar al gen reportero, con lo que se demuestra que el virus del papiloma humano es el responsable de la inducción de la expresión de la interleucina 10 en cáncer cervical. Este mecanismo puede representar una alternativa de evasión de la respuesta inmune inducida por HPV para favorecer el proceso de carcinogénesis cervical.

INTRODUCCION

Los papilomavirus humano (HPV) son un grupo de virus pequeños de DNA de doble cadena, los cuales se ha demostrado que están asociados con la inducción de cáncer (Walboomers et al., 1999). Alrededor de 95 genotipos de papilomavirus han sido secuenciados y caracterizados (Chan et al., 1995), de los tipos descritos sólo algunos inducen lesiones proliferativas de epitelios o fibroepitelios de piel y mucosas en humanos y en una gran variedad de animales.

Los papilomavirus humanos infectan epitelios estratificados queratinizados con una alta especificidad y están asociados con la aparición y persistencia de neoplasias benignas y malignas. El 90% de los tumores anogenitales contienen el genoma del HPV, principalmente los tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 y 35; donde los más frecuentes son los tipos 16 y 18, por lo que es considerado al HPV, como un fuerte factor de riesgo en la inducción de lesiones precancerosas y del cáncer cervical (de Villiers, 1989 & Van Ranst et al., 1992).

La infección por papilomavirus humano en células epiteliales escamosas, produce una serie de alteraciones celulares produciendo la transformación e inmortalización de la célula epitelial (Meanwell et al., 1987; Nasseri et al., 1991; Schiffman, 1992 & Chan et al., 1995). Así durante el desarrollo de la enfermedad se producen varios desordenes genéticos, en oncogenes (c-myc, ras) y antioncogenes (p53 y Rb), que favorecen la malignidad.

Otro factor que está involucrado en la evolución del cáncer y que es de mucha importancia, es la expresión diferencial de las proteínas virales de HPV dependiente del programa de diferenciación de los keratinocitos (Cum et al., 1991 & Morris, 1994), de esta manera se plantea que la expresión de las proteínas virales, puede estar favorecidas por factores celulares y por sus propios mecanismos de regulación de la replicación y transcripción viral. Esto es apoyado por la existencia de secuencias en la región larga de control (LCR) de HPV, que pueden ser reconocidas por factores celulares y pueden actuar como activadores de la replicación viral, tales como: AP-1 (Chan et al., 1990), cEBP (Bauknecht et al., 1996), el receptor para glucocorticoides (Gloss et al., 1987), el receptor para progesterona (Chan et al., 1989), NF1 (Chong et al., 1990), NF-IL6 (Kyo et al., 1993), Oct-1 (O'Connor & Bernard, 1995), PEF-1 (Cuthill et al., 1993), TEF-1 (Ishiji et al., 1992), TEF-2 (Chong et al., 1991), Sp1 (Gloss & Bernard, 1990) y YY1 (Dong et al., 1994 & May et al., 1994). Así la presencia de cada proteína en determinado espacio/tiempo en la célula epitelial, tendrá un efecto biológico distinto en cada estadio de la diferenciación celular.

Adicionalmente, se ha determinado que varias proteínas vírales aparte de actuar sobre su propio genoma, tienen la capacidad de interactuar con proteínas y secuencias celulares favoreciendo el proceso carcinogénico. Tal es el caso de la expresión constitutiva de las oncoproteínas E6 y E7 en estadios avanzados del CaCU, las cuales interactúan con las proteínas celulares supresoras de tumor p53 Y Rb, controlando el ciclo celular (Scheffner et al.,

1994; Foster et al., 1994; Chen et al., 1995; Patric et al., 1994 & Wu et al., 1993). Además estas oncoproteínas, recientemente se han caracterizado que pueden reconocer varias secuencias de genes celulares, por lo que se consideran como proteínas maestras en el proceso carcinogénico y como blanco para terapias contra cáncer. Tal vez la proteína de papilomavirus mejor caracterizada es la proteína E2, dada su importancia como regulador y transactivador de los genes vírales, reconociendo la secuencia consenso ACCN₆GGT en el genoma viral (Kube et al., 1995), además de su capacidad como activador facilitado por el extremo amino terminal y de esta manera puede interactuar físicamente con factores celulares (p.e. Sp1) (Li et al., 1991). Sin embargo, dependiendo de su inmunogenicidad tumoral y de la respuesta inmunológica efectiva que puedan generar estas proteínas, el sistema inmune establece una inmunovigilancia permanente controlando la progresión de la carcinogénesis, pero debido a la esporádica expresión de las proteínas virales, a la baja secreción y a su capacidad para interactuar con proteínas celulares, se generan varias vías de evasión a la respuesta inmune antitumoral, inhabilitando a esta última para eliminar a la célula transformada y de esta manera puede seguir proliferando hasta producir un carcinoma cervical invasor. Por tal motivo, es importante conocer los eventos moleculares, que se llevan a cabo en el micro ambiente tumoral para establecer estrategias para el control de la carcinogénesis.

Recientemente hemos encontrado que en estadios avanzados del CaCU se producen localmente ciertas citocinas Th2 y anti-inflamatorias (IL-4, IL-10 y TGF- β) favoreciendo un estado de inmunosupresión local. Particularmente se ha determinado que la IL-10 está presente en las células epiteliales coilocíticas y su expresión es directamente proporcional al desarrollo del cáncer cervical en presencia de HPV. Estos resultados indican que existe una relación directa entre la presencia de HPV y la expresión de IL-10 en las células epiteliales del cérvix, por lo que se proponen que algunas proteínas virales (principalmente E2) pueden ser las responsables de regular la expresión de dicha citocina. Esto es apoyado por la existencia de un elemento de respuesta a la proteína E2 de papilomavirus presente en la posición 5' distal de la región reguladora del gen la IL-10 (Kube et al., 1995). Dicho mecanismo puede representar una alternativa de evasión de la respuesta inmune inducida por HPV para favorecer el proceso de carcinogénesis cervical. De esta manera se pueden establecer estrategias para modular o bloquear su expresión en diferentes estadios de la malignidad.

ANTECEDENTES

I. ASPECTOS GENERALES DEL CANCER CERVICAL

El cáncer cervical es una de las enfermedades neoplásicas, que es considerada como la segunda causa de muerte relacionadas con cáncer en mujeres en el mundo; a pesar de ser una enfermedad que puede ser diagnosticada en forma temprana, persiste con una elevada incidencia y mortalidad. Actualmente se estima una incidencia de 500 mil nuevos casos anuales (Boyle, 1997), de los cuales el 80% de los casos se presentan en países en desarrollo (Bosch et al., 1997). En México anualmente se registran más de 11 000 nuevos casos, con una tasa de mortalidad del 41%, la cual ha permanecido estable durante los últimos 20 años (Lazcano et al., 1996), por lo que es considerada como un grave problema de salud pública.

1.1). ASOCIACION DEL HPV CON CANCER CERVICAL

El virus de papiloma humano (HPV) fue oficialmente declarado como un agente carcinogénico humano en 1995 por la Organización Mundial de la Salud, después de dos décadas de estudios epidemiológicos en humanos y en modelos experimentales con animales en varios laboratorios del mundo (IARC/WHO, 1995). Se ha determinado que aproximadamente el 93% de los tumores contienen el genoma de HPV (Bosch et al., 1995; Pfister, 1996 & Man, 1998), aunque existen reportes que indican que el 99.7% de los carcinomas invasor son positivos al HPV (Walboomers et al., 1999); sin embargo, estos reportes pueden estar sujetos a variaciones por el tipo de diagnóstico utilizado; por lo tanto para determinar un valor significativo, es necesario utilizar varios métodos de detección de HPV y una muestra representativa. El método más sensible para detectar al HPV es por medio de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que detecta muy bajas copias del genoma del virus. Alternativamente el DNA de HPV puede ser analizado por dot blot, Southern blot o por captura de híbrido, los cuales detectan solo altas copias del virus (Berry & Palefsky, 1998).

Aproximadamente 95 genotipos de papilomavirus han sido identificados, de acuerdo a su homología de sus secuencias nucleotídicas de los genes L1 y E6, los cuales se han dividido en 5 supergrupos, siendo el subgrupo A de los papilomavirus humanos asociados a lesiones genitales el más extenso (Chan et al., 1995). Cerca de 70 tipos diferentes de HPV infectan solo tejidos mucocutáneos, y cada tipo tiene un particular tropismo para un tipo específico de tejido y no menos de 30 tipos han mostrado un alto tropismo por el tracto anogenital (Vernon et al., 1995). Los tipos 6 y 11, se han clasificado como tipos vírales de "bajo riesgo" y están asociados con enfermedades benignas, incluyendo al condiloma acumulado o a las verrugas venéreas comunes. Los tipos de "alto riesgo" están asociados con lesiones intraepiteliales escamosas (LIS) de alto grado y con cáncer cervical. El HPV 16 es el tipo viral más frecuentemente detectado (50%), y junto al HPV 18 (14%) son detectados en el 64% de los casos. Los tipos

31, 33, 35, 45, 51, 52 y 56 son considerados como de "riesgo intermedio", varios de estos genotipos son considerados de baja prevalencia (Bosch et al., 1997; Berry & Palefsky, 1998). Sin embargo, la infección por HPV puede tener variaciones geográficas. Recientemente en un estudio con más de 1000 casos de pacientes con cáncer invasor en 22 países; se encontró una prevalencia del 93% de HPV, detectado por PCR, además de detectar 25 tipos diferentes de HPVs, no encontrándose variaciones significativas en la positividad en todos los países. El HPV 16 fue el tipo más predominante, detectado en el 50% de las muestras; el HPV 18 en el 14%, el HPV 45 en el 8% y el HPV 31 en el 5%. Se encontró una variación geográfica significativa en la prevalencia de algunos tipos virales comunes. El HPV 45 fue más aparente en el oeste de África, el HPV 39 y HPV 59, se encontró en América Central y del sur. En tumores de células escamosas, el HPV 16 fue el tipo predominante (51%), pero el HPV 18 fue predominante en adenocarcinomas (56%) y en tumores adenoescamosos (39%) (Bosch et al., 199).

1.2). INFECCION DEL HPV EN CELULAS EPITELIALES

Por lo general los virus de papiloma tienen tropismo por células epiteliales escamosas (piel y mucosas), produciendo la transformación e inmortalización del tejido (Zur Hausen, 1994). Las células blanco de la infección de HPV son los keratinocitos y el ciclo de vida viral depende del programa de diferenciación de estas células. Varios estudios sugieren que el HPV infecta solamente las células del estrato basal (potencialmente replicativas) del epitelio queratinizado cervical, en donde en primera instancia el virus no se replica, y permanece en un estado de "latencia", y a medida que los keratinocitos se diferencian, el genoma viral se replica, transcribe sus proteínas virales y forma sus viriones (Crum et al., 1991 & Morris, 1994). Así durante la infección viral productiva existe una cascada de expresión de genes de HPV que es seguida del programa de diferenciación del keratinocito; empezando en las células del epitelio suprabasal y culminando con la liberación de viriones de HPV en keratinocitos terminalmente diferenciados (Man S, 1998). Esto sugiere y es apoyado por evidencias hasta hoy conocidas, que factores celulares participan en la regulación del ciclo de vida viral, durante los diferentes estadios de la diferenciación del epitelio y durante el proceso de carcinogénesis (Crum et al., 1991).

Usualmente los cambios morfológicos ocasionados por la infección del HPV en células epiteliales, producen un reemplazo del epitelio escamoso, por una serie de anomalías histopatológicas, conocidas como lesiones intraepiteliales escamosas (LIS) y neoplasias intraepiteliales cervicales (NICs), por las anomalías citológicas de las células epiteliales, proliferación aberrante, alargamiento de núcleos, disminución de la relación núcleo-citoplasma y disposición de la cromatina en los márgenes del núcleo, estas células son conocidas como coilocitos (Crum et al., 1991; Berry & Palefsky, 1998). El sistema Bethesda clasifica a las lesiones cervicales en alto y bajo grado para unificar criterios citológicos (Figura 1), el cual combina el diagnóstico clínico y el histológico (Bethesda System, 1998 & Yones, 1995). Correspondiendo un LIS de bajo grado (LLIS) a un condiloma, displasia media, coilocito y NIC

I; en contraste un LIS de alto grado (HLIS), comprende una displasia moderada y severa, o un NIC II y III, carcinoma in situ, el cual es caracterizado por un aumento de células y núcleos atípicos y una falta de diferenciación en la progresión de los niveles superficiales del epitelio. Cuando las células neoplásicas del epitelio rebasa la membrana basal del epitelio e invaden el tejido subyacente, se le considera como carcinoma invasor. El significado clínica entre LLIS y HLIS es la presencia de carcinoma invasor en HLIS (Berry & Palefsky, 1998).

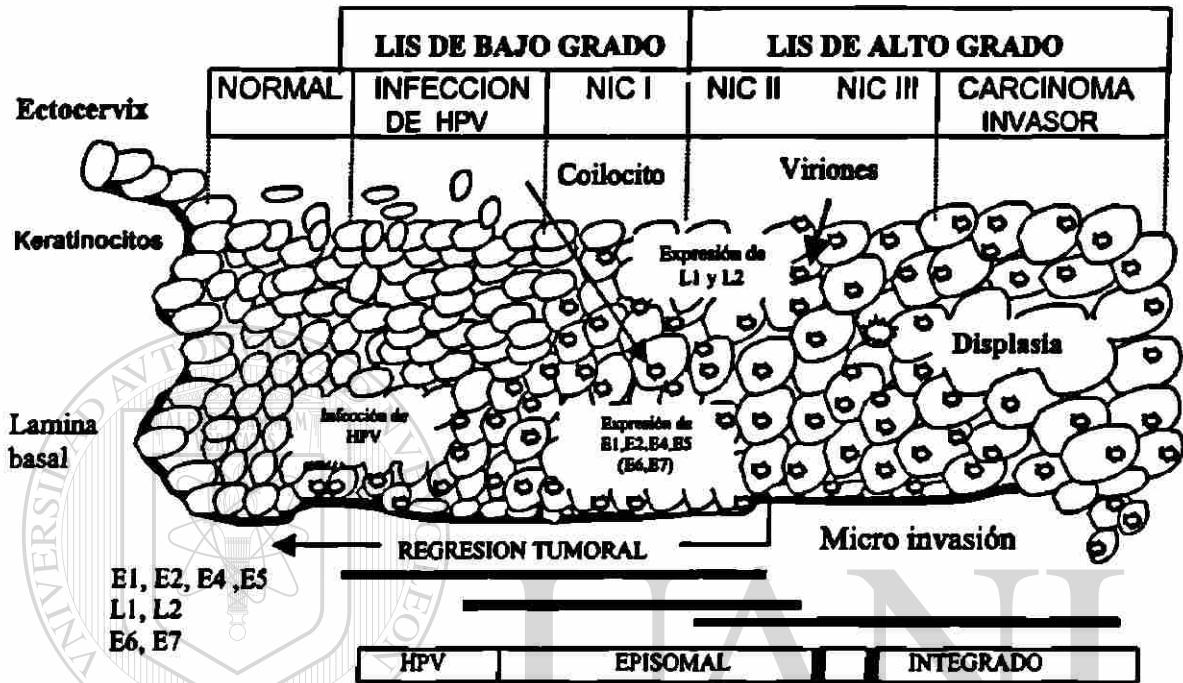


Figura 1: Representación de la infección de HPV

El genoma del HPV generalmente se mantiene en forma extracromosomal como un episoma (elemento genético por sí mismo replicado) en el keratinocito, pero frecuentemente es encontrado integrado dentro del cromosoma humano, en tumores asociados al HPV. Los eventos moleculares y celulares que dirigen a los cambios de inicio y persistencia de la infección en células epiteliales basales a un keratinocito transformado que dirige a la replicación del HPV, hasta ahora son pobremente entendidos. Se ha especulado que durante la transformación no solo la infección de HPV es la más importante, si no que genes celulares o otros co-factores están involucrados en estos cambios de estados de formas virales (Man S, 1998). Además se han encontrado formas virales no infectantes en mujeres si anomalías cervicales, y se calcula que del 10 al 35% de las mujeres sin lesión cervical aparente, contienen el genoma del HPV, donde el virus no produce partículas infecciosas que pudieran destruir o modificar a la célula huésped (Morris et al., 1994; Burk et al., 1986 & Schiffman, 1992).

En términos generales, las formas episomales virales pueden ser detectadas desde una lesión intraepitelial cervical de bajo grado (NIC I) hasta LIS de alto grado (NIC II y NIC III), sin embargo, en los casos de carcinoma

invasor, el virus se integra al genoma cervical (Chan et al., 1994). No obstante, más del 50% de los carcinomas positivos a HPV 16, el virus se encuentra en forma episomal (Mearwell et al., 1987 & Matsukura et al., 1989). Por otra parte, se ha reportado que el 7% y el 36% de los casos de cáncer invasor, el DNA de HPV 16 está integrado y en forma episomal respectivamente (Matsukura et al., 1989 & Fuch et al., 1989), por lo que se especula una posible coexistencia entre ambas formas virales en carcinoma cervical de células escamosas (Kristiansen et al., 1994 & Chen et al., 1994). Adicionalmente, se han reportado dobles y hasta triples infecciones por papilomavirus, por lo que se pueden encontrar formas integrales y episomales de diferentes tipos virales, la pregunta sería si en la misma célula.

1.3). PROCESO DE TRANSFORMACION POR HPV

Gracias a los avances de la biología celular y molecular, se ha podido elucidar algunos de los mecanismos oncogénicos producidos por HPV. Se conoce que el proceso de transformación e inmortalización de la célula epitelial ocurre en estadios avanzados del cáncer cervical, debido a los efectos que lleva la integración del virus al genoma de la célula huésped. No se conoce con exactitud que es lo que pasa en los estadios iniciales del desarrollo del cáncer, en donde el virus se encuentra en forma episomal, y hasta hoy no se ha demostrado que exista un proceso de transformación como tal, únicamente cambios morfológicos de la célula huésped (Escandón et al., 1992). Así el proceso de integración viral, produce una inestabilidad cromosómica y una proliferación celular, integrarse de 1 a 600 copias del genoma viral por célula, que es relacionado con el proceso de transformación celular.

Tres genes de HPV, E5, E6 y E7, son importantes para la transformación celular. Las proteínas E6 y E7 son expresadas en los estadios avanzados de la carcinogénesis. Ambas proteínas de HPV de alto riesgo (HPV 16 y 18) tienen actividades transformantes. La proteína E7 por sí misma o cooperando con el producto del gen de E6 puede inmortalizar keratinocitos primarios, fibroblastos y células epiteliales (Baker et al., 1987; Serdan et al., 1991 & Wazer et al., 1995). La proteína E7 de HPV tiene homología con otras proteínas de virus de DNA tumorales, tales como la proteína E1A de adenovirus y el antígeno T largo de SV40; igualmente que estas oncoproteínas se unen a la proteína Rb supresor de tumores (Decaprio et al., 1988 & Dyson et al., 1989), o a miembros activos de la familia de Rb, e impiden que este represor de tumores se asocie con el cofactor transcripcional celular E2F, el cual es responsable de la activación transcripcional de los promotores de algunos oncogenes celulares (pe. myc y fos) (Alvarez & López, 1995). La proteína E6 se une al gen supresor de tumor p53, bloquea su función y lo marca para su degradación por la vía proteolítica de ubiquitina (Scheffner et al., 1990 & Werness, 1990). Los productos de los genes supresores de tumor son responsables de la regulación normal de la replicación del DNA, reparación y crecimiento celular, el incremento de la expresión de E6 y E7 a sido demostrado que en HLIS produce descontrol de la proliferación celular. De esta manera, la célula es inducida a permanecer en un estado de división celular

constante, con la cual hay posibilidad de que toda la maquinaria de replicación del DNA puede ser utilizada por el virus (Alvarez & López, 1995). Así la función de las oncoproteínas E6 y E7 son importantes en el ciclo de vida viral y parecen estar relacionadas con la abolición de algunos mecanismos de la regulación celular y principalmente con el desarrollo de la transformación celular. Las proteínas E6 y E7 de HPVs de bajo riesgo, son menos eficientes en unirse a Rb y degradando a p53, así las interacciones de E6 y E7 con estos genes supresores de tumor correlaciona con sus efectos oncogénicos.

Otra característica importante de las oncoproteínas de HPV, es su capacidad para modular la transcripción viral y genes celulares; Apéndice I (Morosov et al., 1994). Un blanco de la proteína E7 es el factor transcripcional E2F. La transcripción del factor E2F esta involucrado en la regulación de la expresión de múltiples genes asociados con la proliferación (Nevins, 1992). Una función crucial de Rb es la inhibición de estos genes asociados a la proliferación por la unión a E2F. E7 de HPV 16 se une a Rb, destruye el complejo E2F/Rb, bloqueando la expresión de Rb y activa a E2F. La proteína E6 de HPV 16, ha sido demostrado que estimula la transcripción de una variedad de promotores de genes celulares y vírales (Desaintes et al., 1992 & Morosov et al., 1994). Sin embargo, un elemento responsable para la transactivación mediada por E6 no ha sido identificado (Desaintes et al., 1992). La proteína E5 incrementa la actividad de la protein kinasa activadas por mitógeno y podría además activar la transcripción de E6 y E7. E6 y E7 son necesarios, pero no suficientes para mantener el fenotipo maligno, pero eventos que inducen la producción de p16 inhibidor de protein kinasas dependientes de ciclinas, incrementan la expresión de fos o disminuyen los niveles del inhibidor de fos, (Fra-a), estos eventos podrían predisponer al epitelio cervical a la transformación maligna por HPV; Apéndice I (zur Hausen).

II). ORGANIZACION Y REGULACION GENETICA DE LOS PAPILOMAVIRUS

2.1). BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS PAPILOMAVIRUS

Aunque los papilomavirus despliegan una gran diversidad, su organización genómica es bastante conservada. Todos se componen de una molécula de DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases (pb), compactada con proteínas histonas, formando nucleosomas y encapsulados en viriones icosaédricos con 72 capsómeros hechos de 2 proteínas estructurales y sin poseer envoltura (Chow et al., 1987). El genoma viral esta estructurado en tres regiones: Una región no codificante, de aproximadamente 800 pb, conocida como región larga de control (LCR), la cual contiene varios elementos reguladores de la transcripción viral (Alvarez & López, 1995 & Taja-Chayeb et al., 1996). Dos regiones codificantes, las cuales contienen 7 genes de transcripción temprana (E), que codifica para proteínas involucradas en la replicación (E1), transcripción (E2), en ensamble de viriones (E4), y en la transformación e inmortalización celular (E5, E6 y E7), además de dos genes de

transcripción tardía (L) que codifican para proteínas de la capsida viral (L1 y L2), Figura 2 (Chow et al., 1987 & Cheffner et al., 1994).

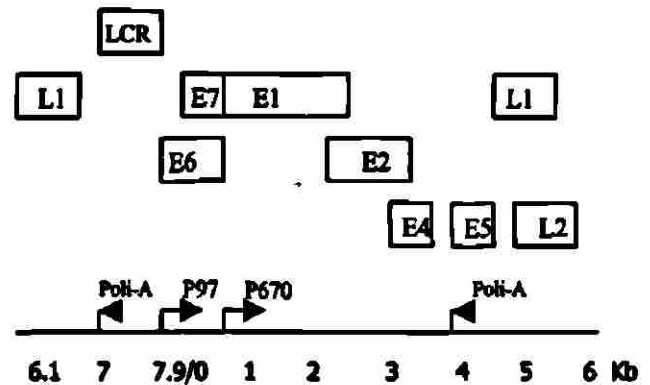
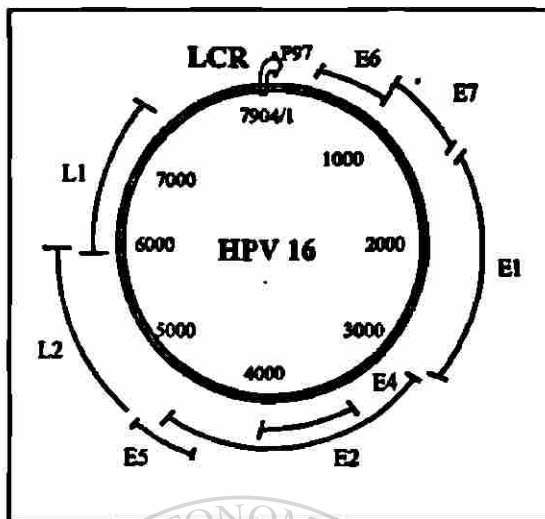


Figura 2: Representación esquemática de la organización genómica de HPV 16 y proteínas virales.

El genoma de los papilomavirus es transcrito como una compleja unidad transcripcional larga, con múltiples promotores, dos sitios de poly A (temprana y tardía) y splicing alternativos, como resultado existen múltiples oportunidades de regulación post-transcripcional de la expresión génica de papilomavirus. En tumores y en líneas celulares que contienen el DNA de HPV 16, el genoma viral está activamente transcrito (Schwarz et al., 1985 & Yee et al., 1985), revelando varios RNAm policistronicos putativos que son generados por splicing alternativos para codificar los productos de genes tempranos y tardíos (Doorbar et al., 1990; Rohlfis et al., 1991; Sherman et al., 1992; Sherman & Alloul, 1992).

El promotor viral p97, localizado río arriba del marco de lectura abierta (ORF) de E6, es el principal promotor temprano de los transcritos que son iniciados (Higgins et al., 1992; Bohm et al., 1993 & Nilson et al., 1996). Los principales RNAm generados por este promotor temprano, contienen los ORFs de los genes involucrados en la transformación E6 y E7, incluyendo la forma larga de E6 y los ORFs de splicing alternativo E6I (226-2109) y E6II (226-526) (Smotkin et al., 1989). Los ORFs de E6 y E7 son procesados a varios ORFs 3' río abajo vía 3 sitios de splicing alternativos en 880-3357, 800-2708 y 880-2581 (Doorbar et al., 1990; Nasser et al., 1991; Rohlfis et al., 1991; Sherman & Alloul, 1992). Adicionalmente especies de RNAm cortos inician en el promotor p97, incluyendo los transcritos E6III y E6 IV, en los cuales en la posición N-terminal de ORF de E6 son juntados a la secuencia fuera del marco con los ORFs de E4 (226-3357) y E1 (226-2708) (Doorbar et al., 1990; Sherman & Alloul, 1992). Sin embargo, poco se conoce de la capacidad traduccional de estos transcritos de HPV.

El HPV 16 expresa una gran variedad de splicing alternativos de RNAm, conteniendo el ORF completo de la proteína reguladora de la transcripción E2 (Sherman & Alloul, 1992), los transcritos de E2 comienzan en el promotor

p97 y contienen múltiples marcos de lectura abierta de E2. El ORF de E2 esta conectado a varios ORFs 5' río arriba vía sitios alternativos en 880-2708, 880-2581 y 226-2708, representados como RNAm y estos tipos de RNAm son más abundantes en las líneas celulares y tumores que contienen el genoma de HPV 16 (Sherman et al., 1992; Sherman & Alloul, 1992).

2.2). PROTEINAS DE TRANSCRIPCIÓN TEMPRANA

Dentro de la región de transcripción temprana, se localizan varios marcos de lectura abierta que codifican para varias proteínas virales, y su expresión esta controlada principalmente por el promotor temprano, localizado en la región larga de control (LCR) (Alvarez et al., 1995), y se ha demostrado que para el caso de los genes de E6 y E7 se localizan dos promotores adicionales dentro de las regiones E6-E7 de HPV 6 y HPV 11. El promotor P1 puede inducir la transcripción de ambos genes (E6 y E7), y el promotor P2, solo dirige la transcripción de E7 (Iftner et al., 1992). Los transcritos derivados del promotor temprano codifican para los productos virales E6, E7, E1, E2, E4 y E5, que son procesados por medio de un proceso de escisión y empalme diferencial para obtener la expresión de las proteínas individuales (Chow., 1987).

PROTEINA VIRAL E1

La proteína E1 de los papilomavirus es la proteína "iniciador" para la replicación del DNA viral y ésta juega un papel crítico en mantener al genoma viral como un episoma durante el ciclo de vida viral. E1 muestra algunas similitudes en secuencia y estructura con los antígenos iniciadores T largo del virus SV40 y del polyomavirus (Cleartant & Seif, 1984), además sus propiedades son consistentes con su papel como una proteína iniciadora de la replicación. En BPV, E1 es una fosfoproteína nuclear con actividades de ATPase y DNA helicasa (Bream., 1993).

Además E1, es requerida por el trans-activador E2 viral en su forma completa hece mas eficiente la iniciación de la replicación del DNA viral *in vivo*. E1 y E2 forman un complejo en solución, el cual se une con alta afinidad y especificidad al origen de replicación, que contiene varios sitios de unión para ambas proteínas. Así, parte de las funciones de E2, es estimular la unión de E1 al origen de replicación. Además E2, suprime no específicamente, la iniciación de la replicación por E1 *in vitro*. En esta vía E2 actúa como un factor específico en promover la replicación dependiente del origen. El complejo de iniciación origen:E1:E2, este puede ser inactivado por la iniciación de la replicación y puede servir como un verificador del complejo de replicación activo. En un proceso de baja actividad, E2 es liberado del complejo y moléculas adicionales de E1 entran y oligomerizan el origen en el DNA. Este complejo activo E1:DNA, en conjunto con la maquinaria de replicación de la célula huésped, produce una fusión en el origen del DNA, seguido por la iniciación de nueva síntesis de hebras de DNA.

Además de los requerimientos para la replicación del DNA viral, E1 está involucrado en la regulación de la transcripción y transformación viral. Presumiblemente, debido a la interacción con E2; E1 modula la capacidad de E2 para activar ciertos promotores vírales. En BPV, E1 regula negativamente la activación del promotor temprano mayor por E2 (Le Moal et al., 1994 & Sandler., 1993) y este mecanismo puede ser el responsable de la supresión de la transformación por E1 (Lambert et al., 1988; Schiller et al., 1989; Vande Pol et al., 1995 & Zemlo et al., 1994). Adicionalmente, E1 ejerce efectos directos sobre el ciclo de vida de la célula huésped (Belyavskiy et al., 1994 & Belyavskiy et al., 1996).

El gen E1 es el gen que está más conservado entre todos los papilomavirus (Clerfant & Seif., 1984; Lusky & Fontane., 1991). Los productos del gen E1 de los diferentes papilomavirus, se predice que tienen similitud en estructura y función. El ORF de E1 de BPV-1 codifica para dos productos génicos expresados en células transformadas con BPV controlados por el promotor temprano mayor, P89. El producto completo del ORF de E1 es una fosfoproteína nuclear de 68 a 72 kDa (Blitz et al., 1991; Santucci et al., 1990 & Sun et al., 1990). Esta proteína es requerida para la replicación del DNA viral. Una proteína más pequeña, determinada como E1-M, es codificada por un transcrito procesado, el cual está fusionado del tercer extremo 5' del ORF de E1 con un procesamiento de 1235Δ3225 a 14 aminoácidos de un exón río arriba. E1-M es una fosfoproteína de 23 kDa (Thorner et al., 1988), ésta fue inicialmente descrita como un regulador negativo de la replicación el cual es requerida para estabilizar la replicación del DNA viral plasmídico (Lusky & Fontane, 1986), sin embargo actualmente se ha determinado que E1-M no es esencial para la replicación plasmídica en células transformadas con BPV-1 (Hubert & Lambert, 1993). Esta proteína posiblemente juega un papel importante en la amplificación del DNA viral durante la fase vegetativa de la infección de BPV 1.

Varios papilomavirus humanos expresan transcritos similares a la proteína E1-M. Uno de estos transcritos es codificado por el HPV 11, una proteína que contiene la cuarta parte amino terminal del ORF de E1 fusionado al dominio de unión a DNA carboxilo terminal de E2 (Chiang et al., 1991). La expresión de este producto génico en ensayos de cultivos de tejidos produce la represión de la transcripción y replicación del DNA de papilomavirus (Chiang et al., 1991). Además se han identificado 5 residuos de la región NH₂-terminal de E1 fusionado con la proteína E4, sin embargo no se conoce su función.

PROTEINA VIRAL E2

El ORF E2 de papilomavirus animal y humano codifica para una proteína de transcripción temprana que es crítica para la replicación del DNA (Chiang et al., 1992; Del Vecchio et al., 1992; Ustav & Stenlund., 1991; Winokur

& McBride, 1992), y para la regulación transcripcional de los genes vírales durante la infección (DiMaio, 1991 & Turek, 1994).

En papilomavirus bovino tipo 1 (BPV-1), el producto completo del gen E2 codifica para una proteína de 48-kDa, la cual es un fuerte transactivador (Giri & Yaniv, 1988; Haugen et al., 1987 & Spalholz et al., 1985), y su transcripción es controlada por el promotor temprano, P89 o P2, localizado inmediatamente río arriba de la región viral E6-E7 (Haugen et al., 1987 & Spalholz et al., 1987), aunque se han identificado otros promotores vírales (Turek, 1994). El transactivador E2 tiene un dominio de transactivación transcripcional N-terminal, y un dominio de dimerización de unión a DNA C-terminal (DBD), conectado por una región de bisagra central (Haugen et al., 1988 & McBride et al., 1989). Le DBD de E2 reconoce el motif ACC(N₆)GGT o GTT (sitio E2); dos sitios E2 o más, funcionan cooperativamente como fuertes potenciadores. La activación de E2 de BPV-1 depende de la cooperación de proteínas celulares, tales como Sp1 (Forsberg & Westin, 1991; Ham et al., 1991 & Li et al., 1991).

En contraste el transactivador E2 de BPV-1, la función del producto completo del gen E2 de HPV 16 o de HPVs genitales. Ambos genes contienen una similitud en los dominios de transactivación y de unión a DNA (Baker, 1987 & Giri & Yaniv, 1988), sin embargo se ha observado que ambas proteínas vírales (de HPV y BPV) tienen distinta actividad. La expresión de vectores que contienen al gen de E2 de HPVs genitales pueden transactivar clonas con genes reporteros que contienen sitios E2, en contraste con una baja expresión de E2 de BPV (Cripe et al., 1987; Hirochika et al., 1988 & Phelps & Howley, 1987)

PROTEINA VIRAL E4

En verrugas inducidas por HPV-1, cerca del 95% de los transcritos vírales inician en el promotor temprano localizado dentro del gen E7, el cual es dependiente del programa de diferenciación celular (Palermo et al., 1990), estos transcritos son originados de un procesamiento único, en el cual se une el extremo 5' de E1 (16 nucleótidos) al ORF de E4. Este RNAm codifica para el producto del gen primario E4E1 (E4), la cual es una proteína citoplásmica muy abundante de 17 kDa (Doorbar et al., 1986 & Breitburd et al., 1987). Un rompimiento en el extremo N-terminal de la proteína, libera varias especies de proteínas pequeñas 16 K (-15 aa), 11 K y 10 K (-59 aa) (Doorbar et al., 1988 & Roberts et al., 1994); además se observan formas diméricas y complejos multimericos de alto orden de la proteína, requiriendo el extremo C-terminal. En verrugas inducidas por HPV 1, la expresión de E4 coincide con el comienzo de la replicación del DNA viral en estado vegetativo, ocurriendo en las células basales de la membrana epitelial (Doorbar et al., 1986; Breitburd et al., 1987 & Doorbar et al., 1996), y en el caso de HPV específicos de mucosas, la replicación ocurre en las capas más superficiales de la membrana basal (Crum et al., 1990; Brown et al., 1991 & Doorbar et al., 1992). Sin embargo, se observan especies de E4 derivadas de la proteína completa

durante la diferenciación (Breitburd et al., 1987 & Doorbar et al., 1988). Además se ha demostrado que la proteína E4 es fosforilada en vivo (Breitburd et al., 1987 & Grand et al., 1989) y puede unirse a Zinc (Roberts et al., 1994).

Una característica importante de ciertas proteínas E4, es su capacidad para agregarse en gránulos de inclusión dentro del citoplasma y el núcleo (Breitburd et al., 1987 & Doorbar et al., 1989). Este tipo de inclusiones son más notorias en lesiones cutáneas y su apariencia depende del tipo de HPV (Croissant et al., 1985; Egawa, 1994 & Egawa et al., 1993). Esta capacidad de inclusión se ha observado en HPV 1, 2 y 4 (Doorbar et al., 1989), sin embargo, no se ha determinado la composición exacta de estas estructuras. Este tipo de estructuras se han reproducido en ensayos de expresión de E4 de HPV 1 *in vitro* en células VX2R (Rogel et al., 1992 & Rogel et al., 1993), además se ha calculado que los niveles de expresión de E4 fluyen del 20 al 30% de proteína celular en verrugas inducidas por HPV 1 (Doorbar et al., 1986 & Breitburd et al., 1987). En tipos de HPV específicos de mucosas (HPV 6 y 16), no se observan las inclusiones, debido a los bajos niveles de E4 (Crum et al., 1990; Brown et al., 1991; Brown et al., 1994; Doorbar et al., 1992; Brown et al., 1988; Brown et al., 1992; Tomita et al., 1991; Pray & Laimins, 1995).

La mayoría de la proteína E4 en tumores inducidos por HPV-1, se presenta como complejos citoplasmáticos solubles, en su mayoría multímeros (Breitburd et al., 1987 & Doorbar et al., 1996). La expresión *in vitro* en líneas celulares epiteliales, la proteína E4 de HPV 1 y HPV 16, se asocia con los filamentos intermedios de queratina y E4 de HPV 16 puede producir el colapso de los mismos (Roberts et al., 1993 & Doorbar et al., 1991); y la secuencia MADXXA N-terminal y el cluster de leucina (LLXLL) son las responsables de la actividad de asociación a las keratinas (Roberts et al., 1994 & Rogel et al., 1992). El proceso de colapso de las keratinas se ha observado ampliamente en epitelios keratinizados infectados por HPV 16 (Sterling et al., 1993); y por otro lado se ha especulado que esta asociación puede requerir proteínas celulares adicionales o moduladoras involucradas en los eventos de modificación pos-traducciona (Roberts et al., 1994; Doorbar et al., 1996; Rogel et al., 1992 & Rogel et al., 1993). La asociación de E4 con keratinas sugiere que el virus incrementa la fragilidad de la célula infectada (Doorbar et al., 1991) y de esta manera se relaciona con eventos tales como el procesamiento del RNA, con las señales de traducción, degradación de proteínas y la diferenciación celular (Doorbar, 1996).

El papel de E4 en el ciclo de vida viral, se ha especulado a causa de dificultades del mimetismo de la proteína en la infección productiva *in vitro*. En verrugas, los niveles de expresión de E4 son relacionados con las proteínas de la capsida viral (Crum et al., 1990; Brown et al., 1994; Doorbar et al., 1989 & Brown et al., 1988) en las capas superiores epiteliales, ya que E4 y L1 son expresadas por un mismo mensajero bicistrónico (Palermo et al., 1990; Nasser et al., 1987; Chow et al., 1987 & Hummel et al., 1992). Alternativamente, E4 puede interferir con la diferenciación normal celular de acuerdo con las necesidades de la síntesis del DNA viral. E4 puede interactuar

con proteínas de "muerte celular" (Rogel et al., 1993) o puede bloquear la traducción de las proteínas del huésped (Doorbar et al., 1996).

PROTEINA VIRAL E5

El ORF de E5 de HPVs que infectan mucosas, es muy similar al de BPV1, ambos están localizados río abajo del ORF de E2, el cual codifica para una proteína altamente hidrofóbica, asociada a la membrana y con funciones transformantes. Sin embargo, la secuencia de ambas proteínas (HPV y BPV 1) son muy diferentes, solo se ha observado una homología en el residuo de prolina que producen el giro de la hélice y en algunos residuos de la región hidrofóbica (Chen & Mounts, 1989). E5 de HPVs al igual que la proteína E5 de BPV forma tres segmentos trans-membranales (Bubb et al., 1988), pudiéndose asociar a varias membranas celulares, tales como: al retículo endoplasmico, al aparato de golgi y se ha visto asociada a la membrana nuclear (Conrad et al., 1994). La región C-terminal de E5 de BPV 1, es la más importante para sus funciones biológicas, pero no lo es para E5 de HPVs. E5 de HPV está pobremente conservada, solo algunos residuos pueden alinearse.

Debido a la falta de conservación entre las proteínas de papilomavirus, se han visto varias funciones muy similares entre ellas, particularmente entre E5a de HPV 16/HPV 11 y E5a de RhPV-1. Todas las proteínas de papilomavirus se asocian a membrana y E5 de HPV 15 y BPV 1 pueden formar homodímeros (Kell et al., 1994). Experimentalmente todas las proteínas son capaces de transformar fibroblastos de roedores (Chen et al., 1990; Chen et al., 1995; Conrad et al., 1994; Leechanachai et al., 1992; Leptak et al., 1991; Ostrow et al., 1993; Pim et al., 1992 & Straight et al., 1993). Además, todas las proteínas E5 de HPV, excepto E5a RhPV-forman un complejo de 16K (Chen et al., 1995; Conrad et al., 1993; Kell et al., 1994 & Valle & Bank, 1995) y pueden unirse a varios receptores de factores de crecimiento (Conrad et al., 1994 & Hwang et al., 1995). E5 de BPV 1 y HPV 16, son capaces de afectar el procesamiento de EGF-R (Straight et al., 1993 & Waters et al., 1992). La E5 de BPV 1 y E5a de RhPV 1 pueden cooperar con *ras* para transformar células epiteliales primarias de roedor y células de riñón de rata (Ostrow et al., 1993).

Se ha demostrado que E5 coopera con E7 de HPV 16 para transformar células primarias de roedores (Bouvard et al., 1994), y coopera con EGF para incrementar los niveles de expresión de c-fos y c-jun en células 3T3 (Leechanachai et al., 1992), y parece correlacionar con la actividad aumentada del enhancer viral (Bouvard et al., 1994); además incrementa la actividad de MAP kinasas, con o sin la estimulación celular por EGF (Gu & Matlashewski, 1995), e interfiere con la comunicación celular vía uniones Gap y correlaciona con la desfosforilación de la conexina 43 (Oelze et al., 1995).

PROTEINA VIRAL E6

La proteína E6 es una proteína nuclear básica y citoplásmica de aproximadamente 18 kDa (Androphy et al., 1987). Contiene cuatro cisteínas alrededor de un átomo de Zn^{+2} formando un dedo de zinc, requeridas para todas las funciones de la proteína (Figura 3). Muchos papilomavirus contienen varios ATGs repetidos (tandem), de los cuales sólo el segundo (forman 151 aa' s) principalmente es el sitio de inicio de la transcripción (Androphy et al., 1987; Barbosa et al., 1988 & Neary & DiMaio, 1989). Una proteína de 158 aminoácidos puede ser generada de HPV 16 *in vitro* y probablemente *in vivo*. E6 es una proteína altamente variable, que contienen pocos motivos conservados o invariantes (Foster et al., 1994).

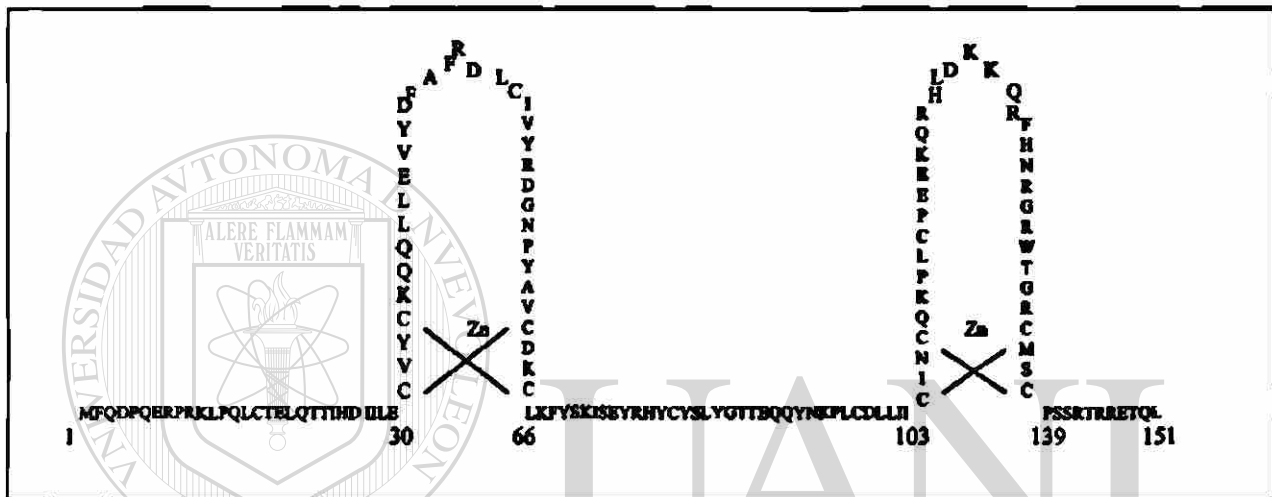


Figura 3: Proteína E6 de HPV 16. Secuencia alineada formando los dedos de Zinc entre los residuos de cisteína.

La transcripción de E6 y E7 es negativamente afectada por la sobreexpresión de E2. Adicionalmente la regulación es seguida por un sitio donador procesado en algunos tipos que producen formas de E6 truncadas, denotadas como E6I, E6II y E6III (Sedman et al., 1991; Schneider et al., 1986; Smotkin et al., 1989; Conelissen et al., 1990; Snijders et al., 1992; Hsu et al., 1993; Shirasawa et al., 1994 & Sherman et al., 1992). El significado de los fragmentos proteínicos generados de esos transcritos producen varios cuestionamientos, así Shirasawa propone que E6I puede servir como transactivador (Shirasawa et al., 1994). Debido a las actividades de unión a DNA de E6 no se han observado en las proteínas truncadas, así otras actividades se han sugerido para tales fragmentos proteínicos, pudiendo servir como un balance a favor del transactivador E7 (Sedman et al., 1991). Otra posibilidad, que no es muy clara, es la participación de los patrones de splicing alternativos en la progresión del tumor; además se han reportado niveles incrementados de RNAm de E6 y E7 en formas virales integrales (Jeon & Lambert, 1995). Alternativamente se plantea un posible fusión proteica entre E6-E7 (Scheffner et al., 1992 & Jareborg et al., 1992).

La proteína E6 es considerada como una proteína multifactorial por varias razones: Primeramente, es transactivador transcripcional o coactivador (Sedman et al., 1991 & Lamberti et al., 1990), debido a que es capaz de transactivar heterológicamente al promotor E2 del adenovirus (Desaintes et al., 1992); el LTR de MMLV y el promotor temprano de CMV, además E6 actúa como un represor transcripcional (Etscheid et al., 1994). Este tipo de actividades, se ha observado en papilomavirus de alto riesgo (16 y 18) y de bajo riesgo (6 y 11), sin la unión o degradación de p53; de la misma manera E6 en estos dos grupos de papilomas interaccionan con las regiones reguladoras río arriba virales (Mallon et al., 1987 & Imai et al., 1989). El papel transactivador transcripcional de E6 puede ser acoplado a su capacidad de transformación e inmortalizaron celular; los papilomavirus de bajo riesgo pueden transactivar pero no tienen la capacidad de transformación (Barbosa et al., 1991).

E6 tienen la capacidad de unirse a proteínas celulares (Tabla I), particularmente a E6AP y E6BP, de esta manera influye en la modulación del proceso celular normal. El complejo E6-E6AP puede unirse *in vitro* a p53 (Huibregtse et al., 1993) o a E6BP (Chen et al., 1995). La desregulación de las funciones supresoras de crecimiento de p53 se han observado en algunos experimentos independientes de la degradación de p53 por E6 (Lechner et al., 1994; Lechner & Laimins, 1994). Sin embargo, los niveles de E6 no siempre correlacionan con la magnitud de sus efectos. Además, se reportado que E6 puede unirse a proteínas células con actividad de quinasa (Keen et al., 1995).

La degradación de p53 por E6 es ampliamente conocido (Scheffner et al., 1990; Hubbert et al., 1992; Band et al., 1993; Foster et al., 1994 & Scheffner et al., 1994), este proceso requiere el complejo temario E6, E6AP (Scheffner et al., 1994). Además se ha demostrado que los HPV de bajo riesgo, tales como HPV 6 y 11, no son capaces de degradar a p53.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla I: PROTEINAS QUE INTERACTUAN CON E6 DE HPV

Proteína	Función	Acción	Interacción con E6
P53	Supresor de tumor	En respuesta a daño de DNA	Degradación de p53, en presencia de E6AP
E6AP	Ligada a ubiquitina	Degradación de proteínas	Degradación de p53
E6BP	Proteína de unión a Ca ²⁺	Diferenciación celular?	Desconocida
Paradaxina	Proteína de adhesión focal	Contacto de célula-célula	Dismrupción de las fibras de actina <i>in vivo</i> y los complejos entre paraxilín y vinculina
hDLG	Supresor de tumor	Contacto célula-célula	Rompe los complejos entre hDLG y APC <i>in vitro</i>

Kubbutat & Vousden, 1988

Los HPVs de alto riesgo son capaces de inducir la immortalización de células en cultivos primarios, y E6 de HPVs de bajo riesgo aumenta la capacidad de E7 en la immortalización celular. Ciertas proteínas de papilomavirus, tales como E6 y E7 de HPV 6, tienen baja actividad de immortalización, pero esta actividad está aumentada en E6 y E7 de HPV 16 (Halbert et al., 1992). Independiente de p53 o E7, E6 puede transformar células NIH 3T3 en cultivo, dependiente del complejo E6BP. Además, algunas proteínas de E6 tienen propiedades oncogénicas sin la interacción con p53 (Chen et al., 1995).

PROTEINA VIRAL E7

La expresión de las proteínas E6 y E7 de papilomavirus de alto riesgo, inducen la transformación e immortalización de una variedad de células de roedor y en keratinocitos primarios humanos (Vousden KH, 1991; Hawley-Nelson et al., 1989 & Münger et al., 1989), y además son requeridas para mantener un fenotipo transformante en líneas celulares de carcinoma cervical (Baker et al., 1987). Las funciones de ambas proteínas parecen intervenir en el control del microambiente celular favoreciendo la replicación del genoma viral, vía activación transcripcional y la inducción de la síntesis del DNA, además de la inhibición de la diferenciación celular y la promoción del crecimiento celular (zur Hausen & de Villiers, 1994).

Particularmente, en estudios *in vitro* se han identificado varias propiedades biológicas de E7 de HPV-16, donde las más relevantes son las funciones de immortalización y transformación, sola o cooperando con *ras* o con E6 de HPV-16, en una gran variedad de células de cultivo y en líneas celulares; además de la unión y la defosforilación de la proteína retinoblastoma (pRb) y a otras "proteínas pocket" incluyendo p107 y p130 (Phelps et al., 1988; Patrick et al., 1994 & Wu et al., 1993). La susceptibilidad a la fosforilación por la caseína quinasa II, la unión a zinc (Dyson et al., 1989; Roth et al., 1992 & Phelps et al., 1988), la inducción a la síntesis del DNA (Rawls et al., 1990 & Watanabe et al., 1992), la transactivación del promotor de E2 de Ad (Phelps et al., 1988 & Phelps et al., 1991) y de otros promotores virales y celulares por una secuencia, incluyendo el elemento de respuesta E2F de pRb (Heck et al., 1992 & Munger et al., 1991), y la formación de otros complejos con proteínas celulares incluyendo el complejo factor transcripcional E2F y la ciclina A (Arroyo et al., 1993; Chellappan et al., 1992 & Pagano et al., 1992), son otras de las funciones biológicas de E7. Además de la supresión de TGF- β inducido por el arresto celular en G1 y la represión del promotor de c-myc (Pietenpol et al., 1990; Munger & Yee, 1991); localización nuclear (Fujikawa et al., 1994); multimerización (Clements et al., 1995; McIntyre et al., 1993 & Zwerschke et al., 1996); el bloqueo de señales de crecimiento celular (Vousden, 1993; Demers et al., 1994; Hickman et al., 1994; Slebos et al., 1994; Hickman et al., 1997; Jones & Munger, 1997; Morozov et al., 1997 & Ruesch & Laimins, 1997); la interacción y la inactivación de las quinasas dependientes de ciclinas (Jones et al., 1997 & Funk et al., 1997); la desestabilización de pRB y inestabilización de p53 y la interacción con otras proteínas celulares, tales como TBP y

TAF-110 (Mazzarelli et al., 1995; Massimi et al., 1996 & Phillips & Vousden, 1997) forman parte de las funciones de E7 detectadas en modelos experimentales. Varias de estas propiedades y de otras proteínas virales, específicamente E1A y el antígeno T largo de SV40 (Mora & Mathews, 1987) tienen secuencias muy similares en ciertas regiones identificadas y concuerdan con sus propiedades biológicas.

2.3). PROTEINAS DE LA CAPSIDE VIRAL (L1 Y L2)

Los viriones de los papilomavirus contienen al menos dos proteínas virales, una proteína mayor (L1) con un peso molecular aproximado de 55 kDa, y una proteína menor (L2) de aproximadamente de 75 kDa. El tamaño de las proteínas L1 y L2 varían entre los papilomavirus, pero ambos constan de 500 aminoácidos de longitud. Los viriones se ha reportado que contienen 10 veces más proteína L1 que L2 (Orth G et al., 199); a pesar de que existe menor cantidad de proteína L2, hay evidencias que sugieren que los anticuerpos reconocen esta proteína como componente estructural de la capsida viral (Hagensee et al., 1993 & Kimbauer et al., 1993).

Debido a la existencia de un codón de iniciación presente en los ORFs que codifica para proteínas de la capsida de algunos genotipos de papilomavirus, predeterminaría una secuencia N-terminal conservada, sin embargo, sólo se presenta una conservación parcial. En la posición C-terminal de la proteína L1 se localizan señales de localización nuclear (Zhou et al., 1993), la cual es muy similar a la presente en la proteína L2. En HPV 16 la proteína L1 es glicosilada en sistemas de expresión; y existen evidencias que la glicosilación está ausente en la proteína L2 (Zhou et al., 1993 & Xi et al., 1993). La glucosilación sirve para el ensamblaje de los viriones. En el sistema de vaccinia, la proteína L1 incorporada dentro de la capsida en HPV 16 no está glicosilada (Zhou et al., 1993), y en sistemas de purificación de viriones la proteína obtenida contiene pocas cantidades de L1 glicosilada (Larsen et al., 1987). Ambas proteínas L1 y L2 en HPV 16 son fosforiladas cuando son expresadas en sistemas de baculovirus (Xi et al., 1993).

En imágenes reconstituidas en tres-dimensiones de micrografías electrónicas de muestras deshidratadas congeladas, se ha podido elucidar la arquitectura básica de las capsidas de los PV (Hagensee et al., 1994). La capsida es un enrejado icosaedro (T=7) compuesto de 72 capsómeros pentaméricos con un diámetro máximo de aproximadamente 60 nm. Los capsómeros se extienden radialmente a 6 nm de una cámara la cual es de aproximadamente 2 nm de extensión. De esta manera el volumen disponible para el DNA es una esfera de aproximadamente 44 nm de diámetro. Así la proteína L2 es un componente menor de la capsida viral, y la mayoría pero no todos los capsómeros contienen 5 moléculas de L1. Los enlaces de disulfuro presentes entre las moléculas de L1 en las capsidas de los papilomavirus son importantes para ensamblar y estabilizar los viriones (Volpers et al., 1994).

Las proteínas de la capsida viral de todos los papilomavirus son importantes por varias razones; Primeramente, el análisis de la secuencia de las proteínas de la capsida son importantes para la identificación de nuevos papilomavirus (Chan et al., 1995). La organización de la capsida de los papilomavirus es interesante, mientras la estructura del capsida de virus de SV40 se determinó cristalográficamente y es muy similar a la de los papilomavirus (Liddinton et al., 1991) y además estas proteínas L1 y L2 pueden ensamblarse en varios sistemas de expresión (Kirnbauer et al., 1993; Zhou et al., 1991 & Sasagawa et al., 1995).

La inmunización de animales con partículas virales o con viriones inactivos de varios papilomavirus animales (CRPV, COPV) han mostrado protección a los animales contra enfermedades asociadas a papilomavirus, de esta manera existe un potencial para vacunas profilácticas con el uso de las capsidas de papilomavirus.

La transcripción de los ORFs de L1 y L2 ocurre cuando los viriones son ensamblados y parece que este evento está regulado por factores transcripcionales celulares que son producidos por las células epiteliales de los estratos más superficiales del epitelio. La presencia de tales factores transcripcionales en las células escamosas más diferenciadas explica el porqué de la producción de viriones y los efectos citopatológicos resultantes por HPV que son más pronunciados en lesiones de bajo grado. Estas lesiones interrumpen la diferenciación de las células escamosas (Park et al., 1995). Aparentemente, las proteínas L1 y L2 no participan en la inducción de lesiones, pero en pacientes con lesiones intraepiteliales de alto grado, hay una alta expresión por lo que se producen anticuerpos contra estas proteínas.

2.4). REGION LARGA DE CONTROL DE LOS HPVs GENITALES

La región larga de control (LCR) de los papilomavirus es un segmento genómico que no presenta ningún marco de lectura abierta, la cual contiene un gran número de elementos de regulación *cis* que controlan la expresión y replicación génica. El tamaño del LCR varía entre los papilomavirus, aproximadamente del 7 al 15% del genoma es ocupado por la LCR y en HPVs genitales representa 850 pb. Esta región está localizada entre el extremo del gen L1 y el comienzo del gen E6, y esta región no presenta una secuencia nucleotídica extensas similares, solo se presentan motifs cortos los cuales están altamente conservados y aparentemente relacionan a los HPVs genitales (Chong et al., 1990). Cuatro secuencias (elementos) son suficientemente reconocidos por los papilomavirus; éstos son: a) Un sitio de poliadenilación por un RNAm maduros, los cuales se localizan en el extremo 5' del LCR. b) Sitios de unión a la proteína E2, los cuales varían en posición y en número de 4 a 10 en los HPVs genitales con respecto a BPV 1. c) Un sitio de unión a la proteína E1 y d) la caja TATA del promotor del gen E6.

El LCR ha sido funcionalmente estudiado en HPV 11, HPV 16 y HPV 18 de los papilomavirus genitales, HPV 8 de los EV-HPVs, BPV 1 de los fibropapilomavirus ungulados y BPV 4 de los papilomavirus ungulados cutáneos y se han determinado la posición de varias secuencias que actúan como secuencias promotoras de los genes virales.

ORGANIZACIÓN: LCR de HPV 16 se ha considerado como modelo para los LCRs de HPV genitales. Cuatro sitios de unión a E2 sirven como reconocimiento y dos sirven para dividir al LCR funcionalmente en dos segmentos, los cuales son llamados: Segmento 5', segmento central y el segmento 3' (Figura 4).

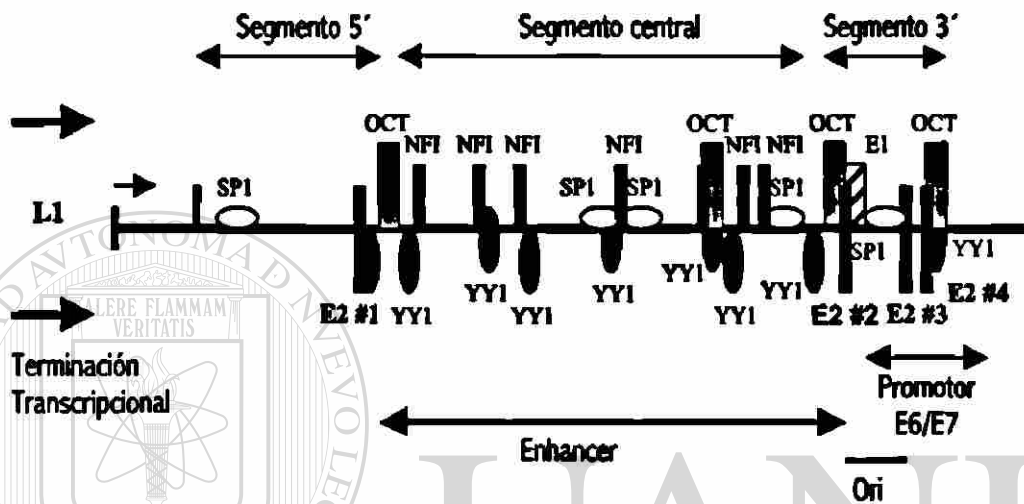


Figura 4: Diagrama del LCR de HPV 16

Segmento 5': Este segmento tiene un tamaño aproximado de 300 pb, localizado entre el codon de terminación de L1 y un sitio de unión a E2. Este segmento contiene sitios de terminación transcripcional y poliadenilación para los transcritos tardíos, además de un elemento de regulación negativa que actúa como estabilizador de los RNAm tardíos (Furth & Baker, 1991 & Kennerdy et al., 1991). En HPV 11 este segmento puede modular la transcripción (Auborn & Steinberg, 1991). En HPV 8 y en BPV 1, un promotor que controla los genes tardíos está localizado en este segmento (Stubenrauch et al., 1994; Baker & Howley, 1987), pero en papilomavirus genitales no han sido determinadas. La función del sitio de unión a E2 en este segmento aún es desconocida, pero se ha reportado que tiene influencia en la transcripción *in vitro* del promotor de E6/E7.

Segmento Central: Este segmento está flanqueado por dos sitios de unión a E2, los cuales están involucrados en la iniciación de la replicación (Chiang et al., 1992; Russel & Botchan, 1995; Sverdrup & Khan, 1995) y además modula la transcripción de los genes E6 y E7 (Romanczuk et al., 1990). Esta región tiene un tamaño aproximado de 400 pb y se ha visto en HPV 11, HPV 16 y HPV 18 que actúa como un enhancer transcripcional epitelio específico, ver figura 4 (Chin et al., 1989; Cid et al., 1993 & Gloss et al., 1987). El tropismo epitelial, ha

desarrollado varios cuestionamientos, y se han identificado varios factores transcripcionales de tipo epitelial que pueden interactuar con esta región (p.e. miembros de la familia de NF1 y factores de la familia Jun) (Apt et al., 1993; Apt et al., 1994 & Thierry, 1992). Además se plantea que cofactores específicos de tejido podrían no unirse directamente al DNA, pero podrían ser requeridos para la activación a través de interacciones proteína-proteína. Sin embargo, no existen evidencias muy fuertes y la especificidad epitelial deben ser demostrada, en combinación con los factores de transcripción.

Adicional a la especificidad tisular, los enhancers están involucrados en modular la expresión génica viral en respuesta a estados de diferenciación y fisiológicos de los keratinocitos en las diferentes capas del epitelio estratificado escamoso. Tales cambios aparecen por la unión diferencial de factores de transcripción a su sitio en el enhancer, y es dependiente del microambiente celular.

Once diferentes factores de transcripción se han identificado *in vitro* que son capaces de unirse a 20 diferentes sitios en el enhancer de HPV 16. Estos son: AP1, cEBP, receptor de glucocorticoides, receptor de progesterona, NF1, NF-IL6, Oct-1, PEF-1, TEF-1, TEF-2 y YY1 (Chan et al., 1989; Chan et al., 1990; Chin et al., 1989; Chong et al., 1990; Cuthill et al., 1993; Garcia-Carrancá et al., 1988; Gloss et al., 1987; Gloss et al., 1989; Ishiji et al., 1992; Kyo et al., 1993; O' Connor et al., 1995 & Sibbet et al., 1990).

Segmento 3': En esta región se localizan un sitio de unión a E2 y la una secuencia del gen E6 que marca el límite de tal región de 140 pb. Este segmento contiene un sitio de unión a E1, conocido como el origen de replicación. El sitio de inicio de la transcripción se localiza 5 pb río arriba del ATG de E6 y esta localizado 90 pb río abajo del sitio de unión a E1. Un segmento de 45 pb dentro de los 90 pb se localiza un sitio de unión para el factor transcripcional SP1 y dos sitios de unión para la proteína E2, además de la caja TATA. Estos cuatro sitios forman un complejo el cual modula la actividad del promotor de E6/E7. La caja TATA es requerida para la unión de TFIID la cual estabiliza el complejo de pre-iniciación, y el factor SP1 media el efecto del enhancer. El sitio E2 se traslapa con la caja TATA y el sitio SP1, de tal manera que la proteína E2 desplaza al TFIID y al factor SP1 (Bouvard et al., 1994; Demmeret et al., 1994; Dostatni et al., 1991 & Tan et al., 1994). Se dice que la unión de SP1 a este sitio activa el promotor de E6/E7, pero no la replicación, debido a que SP1 bloquea la unión de E2 y solo la iniciación de la replicación dependería de E1. En ciertas concentraciones de E2 puede desplazar a SP1, por lo tanto la replicación se activaría y reprimiría parcialmente la transcripción (Demmeret et al., 1994 & Tan et al., 1994). La unión de E2 a sitios proximales del promotor (sitio 4) puede desplazar a TFIID y así reprimiría la serie de eventos que pueden constituir un switch para la iniciación de la replicación o transcripción lo cual dependería de la concentración de E2.

2.5). ELEMENTOS DE TRANSCRIPCIÓN BASAL

En un número pequeño de LCRs de HPVs se han estudiado experimentalmente y se han determinado los sitios de unión de factores transcripcionales putativos y su importancia potencial de su actividad biológica. Debido a que los HPVs tienen un tropismo por las células epiteliales y los enhancer localizados en el LCR tienen especificidad tisular, el microambiente celular, tal como el epitelio columnar o el presente en las diferentes capas del tejido escamoso puede repercutir en modular a diferentes niveles la expresión de genes virales. La existencia de secuencias de reconocimiento de factores de transcripción de origen celular presentes en el LCR, tales como AP-1 (Chan et al., 1989), NF-1/CTF, Oct-1, SP1, TEF-1 (Chong et al., 1991), cEBP, receptores para progesterona y glucocorticoides (GRE) (Chan et al., 1989 & Pater et al., 1988), KRF-1 (Mack & Laimins, 1991), NF-IL6 (Kyo et al., 1993) etc. sugiere un fuerte control transcripcional celular para iniciar la transcripción celular; sin embargo, las proteínas virales E1 y E2, pueden regular de manera específica la replicación y la transcripción viral.

En la tabla 2, se observan las secuencias que son reconocidas por algunos factores de transcripción presentes en 20 LCRs de algunos HPVs, y el número de sitios localizados en el LCR de HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 6 y HPV 11.

TABLA 2: Secuencias putativas de sitios de unión de factores de transcripción presentes en el LCR de HPVs

FACTOR	SECUENCIA	CONSENSO	HPV	16	18	31	6
NFI	TTGGC	TTGGC		7	4	3	5
AP1	TKWNTMA	TGANTCA		4	3	4	3
Oct-1	AANWGYAB	AATTGCAT		4	7	4	5
Tef-1	YRCATDBYDB	TACATACTTC		8	2	5	2
YY1	MCATNKT	ACATTTT		10	7	8	2
E2	ACC (N) ₆ GGT	ACCG(N) ₄ CGGT		4	4	4	4

La transcripción temprana de los HPVs es dependiente de la formación de complejos multiproteicos asociados a la RNA polimerasa II en la caja TATA. En este elemento interactúa la proteína celular TBP, que permite el anclaje de la RNA polimerasa II y la iniciación específica de la transcripción (Sawadogo, 1990). Al ser dependiente de la caja TATA, la transcripción basal de los HPVs se encuentra bajo la regulación del producto del gen supresor de tumor p53. Esta proteína se asocia a la TBP impidiendo su función y por lo tanto tiene un efecto represor (Seto et al., 1992). De hecho, cualquier bloqueo a la formación del complejo multiproteínico en la caja TATA resulta en la represión de la transcripción.

2.6). TRANSCRIPCIÓN TEJIDO ESPECÍFICA

La transcripción de los HPVs se lleva a cabo exclusivamente en células de origen epitelial, debido a la presencia de factores celulares tejido específico.

El factor AP-1 tiene afinidad por la secuencia 5'-TGAG/CTC/AC-3' la cual se presenta más de dos veces en la LCR de los HPVs genitales y cuya integridad resulta de gran importancia para la transcripción temprana de HPVs (Thierry et al., 1992). AP-1 está constituido por los productos de las familias de oncogenes celulares fos y jun (Curran & Franza, 1988 & Angel, et al., 1988), los cuales constituyen homo o heterodímeros funcionales capaces de activar fuertemente la transcripción y confieren una alta y rápida respuesta por la vía del diacilglicerol (DAG) (Angel et al., 1988). Aunque AP-1 se considera como un factor ubicuo y asociado a la transcripción de varios genes celulares, las combinaciones de los diferentes productos de la familia jun (*c-jun*, *JunB* y *JunD*) entre sí y con los de la familia fos (*c-fos*, *fosB*, *fra1* y *fra2*), parecen establecer la transcripción tejido-específica (Offord & Beard, 1990; Mack & Laimins, 1991 & Thierry et al., 1992).

La familia de reguladores transcripcionales NF-1/CTF tienen afinidad por la secuencia 5'-T/CGGA/CN₅-GCCAA-3' o por parte de ella (Jones et al., 1987). El primer tipo de NF-1/CTF se describió como una proteína celular capaz de activar la replicación de haden virus tipo 2 (Tamanoi & Stillman, 1983). Posteriormente, NF-1/CTF fue descrito como un factor que activa la transcripción de diversos genes a través de su interacción con la caja TATA (Jones et al., 1987 & Santoro et al., 1988). NF-1/CTF se constituye por dímeros proteínicos derivados de una familia multigénica cuyos transcritos se someten a procesamiento diferencial (Santoro et al., 1988). Considerado como un activador general de la transcripción, NF-1/CTF se expresa de forma variable en un amplio espectro de líneas celulares pero esta asociado a la transcripción específica de algunos genes (Cereghini et al., 1987). Existen múltiples sitios para NF-1/CTF en el LCR de los HPVs genitales. Se ha demostrado que la interacción de este factor tiene importancia para la expresión dependiente de epitelios (Chong et al., 1990). Sin embargo, los tipos particulares de NF-1/CTF involucrados en esta activación son aún desconocidos.

La estimulación de la transcripción de los papilomavirus genitales por hormonas esteroideas, llevo al descubrimiento de un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) dentro del LCR. El LCR por si solo es capaz de activar la transcripción del promotor temprano de papilomavirus genitales y establece una correlación con la observación clínica de papilomatosis asociada al embarazo (Chong et al., 1991).

La presencia de un sitio de interacción para el factor Oct-1 fue detectada originalmente en el LCR de HPV 18. Oct-1 pertenece a la familia de factores transcripcionales relacionados por la presencia de un dominio común (dominio POU), los cuales regulan la actividad transcripcional durante el desarrollo (Fletcher et al., 1987). La

interacción de Oct-1 entre otros HPVs genitales ha sido observada, aunque la participación de este factor como un represor de la transcripción temprana fue descrita para HPV 18 (Hoppe et al., 1991).

La comparación de secuencias nucleotídicas de los LCRs de los diferentes HPVs genitales demostró la presencia de un secuencia significativamente conservadas (Chong et al., 1990). La secuencia 5'-ACATATT-3' se presenta en forma exacta en los HPV 16 y 18. En esta secuencia interactúan factores transcripcionales conocidos como TEF. Inicialmente descritos como asociados a la transcripción del virus SV40, TEF-1 y TEF-2 son considerados factores transcripcionales epitelio-específicos para HPV 16 (Ishiji et al., 1992).

Como se ha observado, la transcripción epitelio-específico de los HPVs genitales depende de una variedad de factores celulares transcripcionales, mucho de ellos considerados parte de familias multigénicas responsables de la transcripción celular general y tejido-específica. Sin embargo, cada factor por si solo no tiene una actividad significativa sobre el promotor temprano y algunos parecen redundar en sus funciones. Se requieren de la cooperatividad funcional de todos para constituir la actividad potenciadora de la transcripción del segmento central de los HPVs. Esta cooperatividad requiere del contacto físico entre los diferentes factores, así como del establecimiento de interacciones proteína-proteína a través de factores reguladores que no establecen un contacto directo con el DNA, como los supresores de tumor p53 y p105^{RB}.

III. ESTRUCTURA DEL GEN Y PROTEINA E2

3.1). FUNCIONES BIOLÓGICAS DE E2

Las proteínas E2 de papilomavirus regulan la transcripción y replicación viral, además tienen un papel central en el ciclo de vida viral. En BPV 1, el producto completo del gen E2 es un transactivador que activa la transcripción de varios promotores virales por la unión de E2 a sitios localizados dentro de elementos enhancer en el LCR (McBride et al., 1991 & O' Connor et al., 1995). En BPV1 el gen E2 codifica dos proteínas pequeñas que antagonizan la función del transactivador full-length E2. El represor E2 inhibe o bloquea la transcripción por la unión al o a los sitios E2 y forma un heterodímero con el transactivador E2. Las proteínas E2 de los papilomavirus pueden además funcionar como un transactivador transcripcional y las proteínas E2 de papilomavirus humanos oncogénicos son capaces de activar promotores en respuesta a E2 más eficientemente que los tipos virales no oncogénicos (Kovelman et al., 1996); Sin embargo, no todos, algunos estudios con la proteína full-length de tipos virales de mucosa reprimen la actividad del promotor del gen de E6 (Bernard et al., 1989; Bouvard et al., 1995; Dong et al., 1994; Jackson & Campo, 1995; Romanczuk et al., 1990 & Thierry & Howley PM, 1991).

La replicación del DNA viral requiere el transactivador E2 full-length, la proteína viral E1 y el origen de replicación. El origen de replicación contiene un sitio de unión a E1 flanqueado por los sitios de unión a E2, y la

proteína E1 tiene varias actividades asociadas a la replicación, tales como la unión específica al origen, la actividad de helicasa y la formación de un complejo con el transactivador E2. La proteína E2 probablemente juega un papel auxiliar en la replicación, aumentando y regulando la función de la proteína E1.

En plásmidos que contienen un origen de replicación mínima pueden replicarse transitoriamente en células que expresan las proteínas E1 y E2 pero con el tiempo la replicación del DNA disminuye. En tiempos más prolongados, la permanencia estable de los plásmidos requieren de sitios adicionales de unión a E2 y la expresión de las proteínas E1 y E2 (Piirsoo et al., 1996). El transactivador E2 y el genoma viral de BPV-1 están asociados con los cromosomas mitóticos células individuales (Skiadopoulos & McBride, 1996), sugiriendo que la proteína E2 puede jugar un papel en el control de las copias del plásmido y en la segregación del genoma viral. Además la proteína E2 esta involucrada en el empaquetamiento del genoma viral en partículas del virión; y el DNA viral parece ser empaquetado más eficientemente en presencia de la proteína viral E2 en líneas celulares de insecto y de mamíferos. Así la proteína E2 es multifuncional y tiene varias funciones importantes en el ciclo de vida viral.

3.2). PRODUCTOS DEL GEN E2

La proteína E2 mejor caracterizada ha sido la de BPV-1 (Figura 5). Tres proteínas de E2 de BPV 1 se han identificado y mapeado del ORF de E2 (Hubbert et al., 1988 & Lambert et al., 1989). La proteína más larga caracterizada es de 48 kD y es expresada del ORF completo de E2, ésta es una transactivador transcripcional y es requerido para la replicación del DNA viral (Spalholz et al., 1993; Ustav & Stenlund, 1991), ha sido designada como E2-TA. Adicionalmente dos proteínas más pequeñas se han identificado; codificadas por la mitad del extremo 3' del ORF, cuya función es de servir como represor transcripcional (Choe et al., 1989 & Lambert et al., 1987): E2-TR es una proteína de 30 kD expresada a partir del promotor P₃₀₈₀ y es iniciada en un codón de iniciación terminal en el residuo 162; E8/E2 es otra proteína de 28 kD codificada por un mensaje con un procesamiento 1234A3225 que codifica para 11 aminoácidos del ORF de E8 funcionado al aminoácido 205 C-terminal del E2. El cDNA de HPV es capaz de codificar regiones C-terminal de proteínas E2 de HPV (Baker & Calef, 1995; Chiang et al., 1991 & Doorbar et al., 1990). En HPV 16 varios cDNAs del gen E2 presentan varias actividades de transrepresión (Alloul & Sherman, 1999).

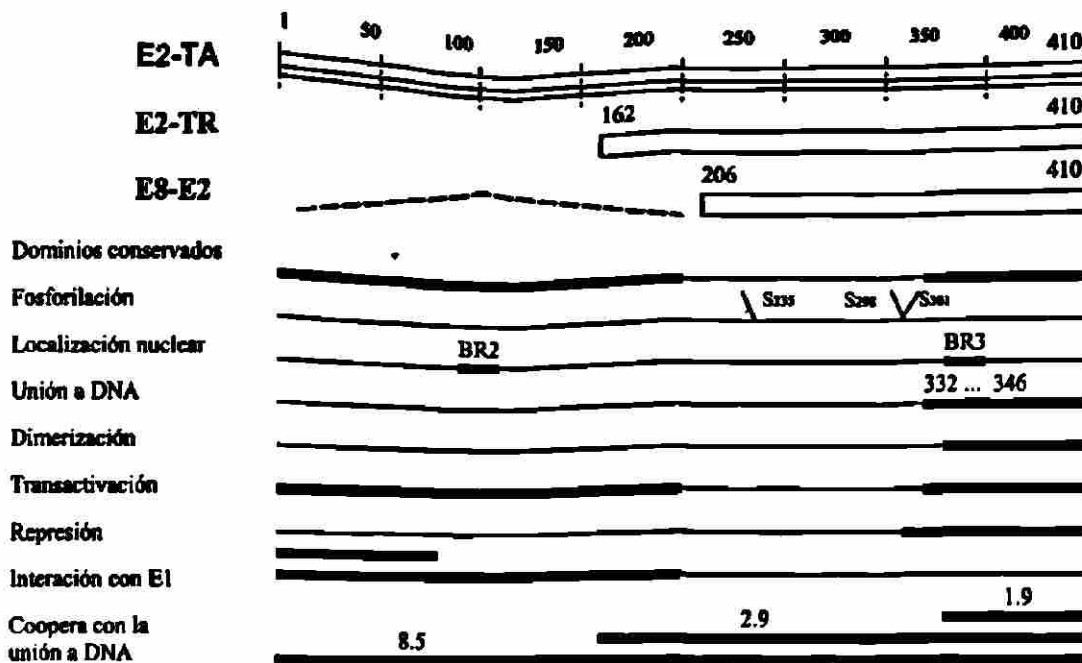


Figura 5: Estructura de las tres proteínas de E2 de BPV1

El análisis de la secuencia aminoacídica de todas las proteínas E2 de papilomavirus muestra que existe dos dominios conservados. Un dominio N-terminal de aproximadamente 200 aminoácidos y un dominio C-terminal de aproximadamente 90 aminoácidos separados por una región no conservada variable que ha sido designada como región de bisagra. Notablemente, la región de bisagra se sobrelapa con el ORF de E4 la cual es divergente entre los papilomavirus. Los dominios conservados son de aproximadamente 35% de similitud entre los papilomavirus (Figura 5).

3.3). ESTRUCTURA DE LA PROTEINA

El polipéptido E2-TA consiste de un dominio de unión a DNA C-terminal ligado al dominio de transactivación N-terminal por una región de bisagra no conservada. La proteína E2 forma dímeros mediante los dominios de unión a DNA (Figura 6). El dominio de transactivación es de aproximadamente 200 aminoácidos diferentes a otros dominios de transactivación, la estructura parece ser muy desconcertante ya que es fácilmente desdoblada por deleciones o por ciertas mutaciones puntuales no conservadas. La secuencia de aminoácidos de todas las proteínas E2 de los papilomavirus es determinada como dos α -hélices en la región N-terminal del dominio de transactivación (Giri & Yaniv, 1988).



Figura 6: Modelo de la estructura del dímero de E2 de HPV 31 y su unión al DNA.

La región de bisagra de las proteínas E2 varían en tamaño y en composición aminoacídica, además se a postulado que esta región forma un enlace entre los dos dominios y en HPV 16 esta proteína no presenta una estructura muy característica (Gauthier et al., 1991), los anticuerpos generadas contra los péptidos de la cubierta de la proteína entera no reconocen la proteína nativa, y solo reconocen los de la región de bisagra.

3.4). FOSFORILACION

Las proteínas E2 de los papilomavirus, BPV 1, CRPV, HPV 11 y HPV 16, se ha observado que son fosforiladas (Barbosa & Wettstein, 1988; Bream et al, 1993; McBride et al., 1989; Meneguzzi et al., 1989 & Sanders et al., 1995), pero los sitios de fosforilación solo han sido identificado en E2 de BPV 1 (Lehman et al., 1997 & McBride et al., 1991), contiene sitios para fosfoserina y fosfotreonina (McBride et al., 1991). Dos sitios mayores de fosforilación en serina se localizan en las posiciones 298 y 301 y un sitio menor en la posición 235 (Lehman et al., 1997 & McBride et al., 1989), mutaciones en la serina 301 por una alanina producen un aumento en el número de copias que el BPV 1 silvestre (McBride & Howley, 1991) y mutaciones en la posición 235 afectan la transformación y la retención de plásmidos (Lehman et al., 1997), sin embargo la posición de fosforilación no esta conservada en las proteínas E2 de papilomavirus.

3.5). LOCALIZACION

Todas las proteínas de E2 de BPV1 se localizan en el núcleo pero un gran porcentaje de la proteína completa E2-TA se asocia con la cromatina insoluble y con componentes de la matriz nuclear (Hubbert et al., 1988), dos señales de localización nuclear probables (NLS) se han identificado en las proteínas E2 de BPV1. Un péptido de

la región C-terminal, que involucra los residuos 339-352, BR3, KCYRFRVKKNHRHR) los cuales están localizados en la hélice de reconocimiento a DNA (dominio de unión a DNA) funcionan como un NLS (Skiadopoulos & McBride, 1996). La delección o mutación en la segunda señal del dominio de transactivación (BR2, residuos 107 al 115, KRCKFKGAR) produce proteínas citoplásmicas aun con el NLS C-terminal intacto. Por lo tanto se ha postulado que el NLS C-terminal puede enmascararse en la proteína E2-TA (Skiadopoulos & McBride, 1996). Un estudio reciente demuestra que mutaciones puntuales en la región BR2 (K111A, K112A) produce una agregación de la proteína y se retiene en el citoplasma (Abroi et al., 1996). La proteína E2-TA, pero no las proteínas represoras, están asociadas con los cromosomas mitóticos en células en división y estas propiedades pueden ser importantes para la segregación del genoma viral.

Altos niveles de expresión de E2 son encontrados primariamente en el estrato espinoso de los tejidos infectados los cuales coinciden con la amplificación del genoma viral (Burnett et al., 1990), indicando que los niveles aumentados de E2 son importantes para la replicación del DNA viral en estado vegetativo.

3.6). SITIO DE UNIÓN A DNA

Los residuos 326 al 410 del dominio C-terminal de E2 se unen específicamente a DNA como un dímero (McBride et al., 1991). Según la cristalografía de rayos X, los 85 aminoácidos C-terminal del dominio de unión a DNA de la proteína E2, forman una estructura β -barril antiparalela cual se une a DNA (Hegde et al., 1992). Un dímero del dominio de unión a DNA forman un β -barril de ocho hebras antiparalelas hecho de cuatro hebras de cada subunidad. Un par de α -hélices simétricamente acomodadas fuera del barril que contiene los residuos que son requeridos para interaccionar específicamente con el DNA. Se han determinado las secuencias de aminoácidos de la hélice de reconocimiento alineada con la región homóloga de otras proteínas E2 de papilomavirus, además, se especifican las mutaciones que han sido generadas en esta región de la proteína E2 y sus efectos sobre la unión a DNA. Así mismo, las secuencias flanqueantes del dominio de unión a DNA (región de bisagra) como contribuyen a la unión y forman partes integrales del dominio de unión a DNA (Pepinsky et al., 1997). La estructura tridimensional del dominio de unión a DNA de HPV 31 en solución, se ha demostrado por medio de resonancia magnética nuclear (Liang et al., 1996), y el plegamiento de la proteína es muy similar a la estructura cristalográfica del dominio de BPV 1, pero la hélice de reconocimiento a DNA parece ser más flexible. El dominio de unión a DNA de la proteína EMBA 1 del virus de Epstein Barr tiene una estructura muy similar al dominio de unión a DNA de E2, pero la secuencia no es similar (Bochkarev et al., 1995).

La hélice de reconocimiento contiene una gran cantidad de residuos de cisteína en la posición 340 siendo sensible a la oxidación (McBride et al., 1992), estos residuos marcan los contactos directos con el DNA de las

proteínas E2, la sustitución de ciertos residuos (glicina, serina, alanina) no afectan la unión al DNA. Sin embargo, estas proteínas no son capaces activar eficientemente la transcripción en células de mamíferos (Grossel et al., 1996 & McBride et al., 1992). Estas cisteínas también son encontradas en las regiones de reconocimiento a DNA de otras proteínas tales como fos, jun y NFκ B.

Las proteínas E2 de papilomavirus se unen a DNA con alta eficiencia, tal unión ha sido calculada en el rango de $4.5 \times 10^{-9}M$ a $2 \times 10^{-11}M$ (Alexander & Phelps, 1996; Li et al., 1989; Monini et al., 1991; Muller et al., 1997; Sanders & Maitland, 1994 & Tan et al., 1994). La secuencia consenso de reconocimiento de E2 es ACCGN₄CGGT (Hawley et al., 1988), pero los nucleótidos internos y la secuencia flanqueante puede influir en la afinidad de la unión a DNA. (Alexander & Phelps, 1996; Li et al., 1989; Sanders & Maitland, 1994 & Thain et al., 1997). Hay 17 sitios de unión a DNA en el genoma de BPV 1 y sus afinidades por las proteínas E2 es del rango de 300 (Li et al., 1989). La unión de la proteína E2 a este sitio consenso induce una orientación significativa al DNA y además E2 puede ser inhibido por la metilación del sitio ACCGN₄CGGT (Thain et al., 1996).

En varios papilomavirus de mucosas, la proteína E2 completa parece reprimir el promotor localizado en dirección 5' del gen de E6. Esto probablemente ocurre cuando la proteína E2 se une a los sitios de unión que se sobrelapan a factores de transcripción celular como SP1 y TFIID. En muchos casos en promotores proximales a sitios de unión a E2 tienen baja afinidad por la proteína E2 que los sitios localizados en dirección 5' arriba del sitio de unión de la transcripción del promotor (Jackson & Campo, 1995 & Sanders & Maitland, 1994). Esto ha sido probado en modelos en los cuales bajos niveles de unión de E2 activan la transcripción en sitios E2 río arriba del promotor, sin embargo niveles altos de la proteína E2 tienen baja afinidad a sitios proximales que son ocupados y dirigen una represión transcripcional.

3.7). DIMERIZACION.

El dominio de unión a DNA de las proteínas E2 forman un dímero estable en ausencia de DNA (Corina et al., 1993 & McBride et al., 1989). Las propiedades de dimerización y de unión a DNA de este dominio no pueden ser separadas por análisis de delección; todas las delecciones que han sido probadas eliminan ambas propiedades del dominio C-terminal. Esta es la causa de por que la dimerización involucra una subunidad extensa que consiste de enlaces de hidrógeno entre las hebras-β, la interacción se da entre la cadena de un lado de una hebra-β de una subunidad y un centro hidrofóbico. Este centro hidrofóbico contienen alta cantidad de residuos de triptófano conservados en la posición 360 la cual ha sido designada como el puente de triptófano (Corina et al., 1993 & Prakash et al., 1992). El anillo indol del W360 de cada subunidad hace contacto con fuerzas de Van der Waals, proteínas E2 mutadas que contienen residuos hidrofóbicos en esta posición son funcionales, pero la sustitución de

W360 por un residuo polar disrumpe la dimerización. Mutaciones en otros residuos no conservados del dominio C-terminal puede eliminar la unión a DNA, al igual que la dimerización por cambios en la estructura de la proteína (Carruth & McBride, 1997). En estudios con el dominio de unión a DNA de E2 de HPV 16, demuestran que tal dominio se pliega como un intermediario monomérico no-nativo (Mok et al., 1996).

3.8). TRANSACTIVACION

Cuando se unen los aminoácidos 194 N-terminal de E2 de BPV 1 son capaces de activar la transcripción de un promotor que responde a E2. La región de bisagra de la proteína E2 puede ser deletada con efectos mínimos sobre la transactivación. Contrario a otros dominios de transactivación, el dominio N-terminal de E2 se le ha observado que tiene una estructura muy peculiar, ya que deleciones en esta región inactiva todas la funciones de E2-TA, presumiblemente por la pérdida de la estructura conformacional de la proteína (McBride et al., 1989).

Recientemente varios grupos han realizado análisis mutacionales sistemáticas de los dominio de transactivación de las proteínas E2 de BPV 1, HPV 16 y HPV 11, y se ha determinado que aún cambiando la estructura de la proteína en muchos casos no hay inhibición de la función transactivadora de E2, por ejemplo la proteína E2 de HPV 11, el cambio de R7K a D9E no afecta la transactivación, pero proteínas con alanina en esta posición reduce significativamente la actividad, actualmente se han realizado varias substituciones y se ha establecido cuales aminoácidos son esenciales para la transactivación.

Como se menciono anteriormente, una secuencia corta linear en el domino N-terminal ha sido importante para la transactivación y mutaciones que cambian la estructura de este dominio pueden reducir la función de transactivación. En estudios con la proteína E2, cambios en secuencias conservadas tales como W33F, E39D y K111R inactivan la función de activación transcripcional, y las mutaciones en P106G y G156A, alteran la estructura de la proteína. Sin embargo, una mutación en la proteína E2 de HPV 16 baja la actividad sugiriendo que tal vez la fenilalanina en la cadena lateral cambia en la mutación de E2 de BPV interfiriendo con la transactivación. Similarmente, la substitución del ácido aspártico o glicina del residuo 39 reduce la actividad de las proteínas E2 de BPV y HPV, y la substitución con alanina en esa posición afecta la actividad.

3.9). REPRESION TRANSCRIPCIONAL

Los represores E2-TR y E8/E2 de BPV contienen un corto dominio de transactivación, la región de bisagra y el dominio C-terminal de dimerización y de unión a DNA. La represión transcripcional de estas proteínas E2 truncadas son un verdadero competidor de unión a los sitios E2 en los elementos enhancer viral y para la formación de heterodímeros entre el transactivador y especies de represores (McBride et al., 1991). Un polipéptido C-terminal

en la posición 121 contiene el dominio de dimerización y de unión a DNA que es suficiente para la represión de la transactivación mediada por E2 (McBride et al., 1991).

Un tipo diferente de represión transcripcional puede ser mediada por la proteína transactivadora completa y está es dependiente sobre los sitios de unión con elementos promotores proximales. En muchos papilomavirus dos sitios de unión a E2 se localizan entre el sitio SP1 y la caja TATA del promotor mayor de E6/E7, a unión de E2 a esos sitios inhiben la unión a factores celulares lo que facilita la represión de la actividad basal del promotor (Bernard et al., 1989; Dong et al., 1994; Romanczuk et al., 1990; Tan et al., 1994 & Thierry & Howley, 1991). Un dominio C-terminal de las proteínas es suficiente para la represión en ensayos temporales (Dong et al., 1994; Thierry & Howley, 1991).

3.10). INTERACCION CON PROTEINAS CELULARES

La proteína E2-TA completa de BPV 1 se ha demostrado que interaccionan con la proteína celular RPA (Li & Botchan, 1993), con una proteína celular AMF-1 (Breiding et al., 1997) y con el factor de transcripción SP1 (Li et al., 1991). 127 aminoácidos C-terminal de E2 o proteínas de fusión conteniendo 160 aminoácidos C-terminal de la proteína E2, son capaces de interaccionar con SP1, implicando al dominio N-terminal para tal interacción (Li et al., 1991).

Las proteínas de E2 de BPV1 interaccionan y cooperan para la unión a DNA, con los factores de transcripción basal, TFIID y TFIIB (Rank & Lambert, 1995 & Steger et al., 1995). El dominio de unión a DNA (residuos 310-410) son suficientes para la interacción de proteína-proteína con tales factores (Rank & Lambert, 1995), sin embargo, la región de bisagra de E2 es requerida por el dominio de unión a DNA (residuos 204-410) para cooperar con la unión al DNA con TFIID o TFIIB (Rank & Lambert, 1995 & Steger et al., 1995).

3.11). REPLICACION

En todos los estudios sobre la replicación de papilomavirus se ha examinado las funciones de E2 sobre la replicación del DNA y el mantenimiento de plásmidos del DNA viral en estado vegetativo. Sin embargo, usando un sistema de cultivo donde el genoma viral esta amplificado en una subpoblación celular, se ha demostrado que a ciertas temperaturas la proteína E2 de BPV1 es deficiente en la transactivación y en el mantenimiento de la replicación de plásmidos y a temperaturas no-permisibles es capaz de amplificar grandes cantidades del genoma viral en células arrestadas en división celular (Alderborn et al., 1992).

Ampliamente se conoce que la proteína E2 es necesaria para la replicación del DNA viral y esta se une cooperativamente al origen de replicación con la proteína E1 (Lusky et al., 1993; Mohr et al., 1990 & Yang et al., 1991), interaccionando con la proteína de replicación celular RPA (Li & Botchan, 1993) e impide la represión de la

replicación. La proteína E2 de HPV se ha visto que juega un papel similar en replicación y en efecto varias combinaciones de proteínas E1 y E2 de BPV y de HPV son capaces de iniciar la replicación de varios orígenes de papilomavirus; lo que significa que las funciones de estas proteínas están muy conservadas. Por otro lado la replicación de BPV requiere la proteína E2, sin embargo, esta proteína no es necesaria para la replicación del DNA *in vitro*, aunque esta puede aumentar la replicación en concentraciones bajas de proteína E1 (Yang et al., 1991). Adicionalmente se ha observado que la proteína E1 de HPV 1 es suficiente para la replicación *in vivo* (Gopalakrishman & Khan, 1995), así E2 parece jugar un papel auxiliar en la replicación, de tal manera E1 es la principal proteína de replicación.

El dominio de transactivación de E2 es absolutamente necesario para la replicación del DNA (Winokur & McBride, 1992). En estudios con BPV1, la proteína E2 deficiente en la replicación puede interactuar con la proteína E1 (W33F,E39, K11R), sin embargo en HPV 16 muchas proteínas son deficientes en la replicación por una sustitución en alanina y no puede interactuar eficientemente con la proteína E1.

La secuencia aminoacídica de la región de bisagra de la proteína E2 es requerida para la replicación; sin embargo, algunas secuencias no específicas son requeridas entre los dos dominios conservados para mantener la replicación. Dos proteínas con deleciones grandes en la región de bisagra (E2 Δ 220 β 309 y E2 Δ 213 β 309) son incapaces de promover la replicación y pueden activar la transcripción mas eficientemente que la proteína silvestre (Winokur & McBride, 1992). Por lo tanto, es posible que los dos dominios están demasiado cercanos estéricamente de las funciones de replicación.

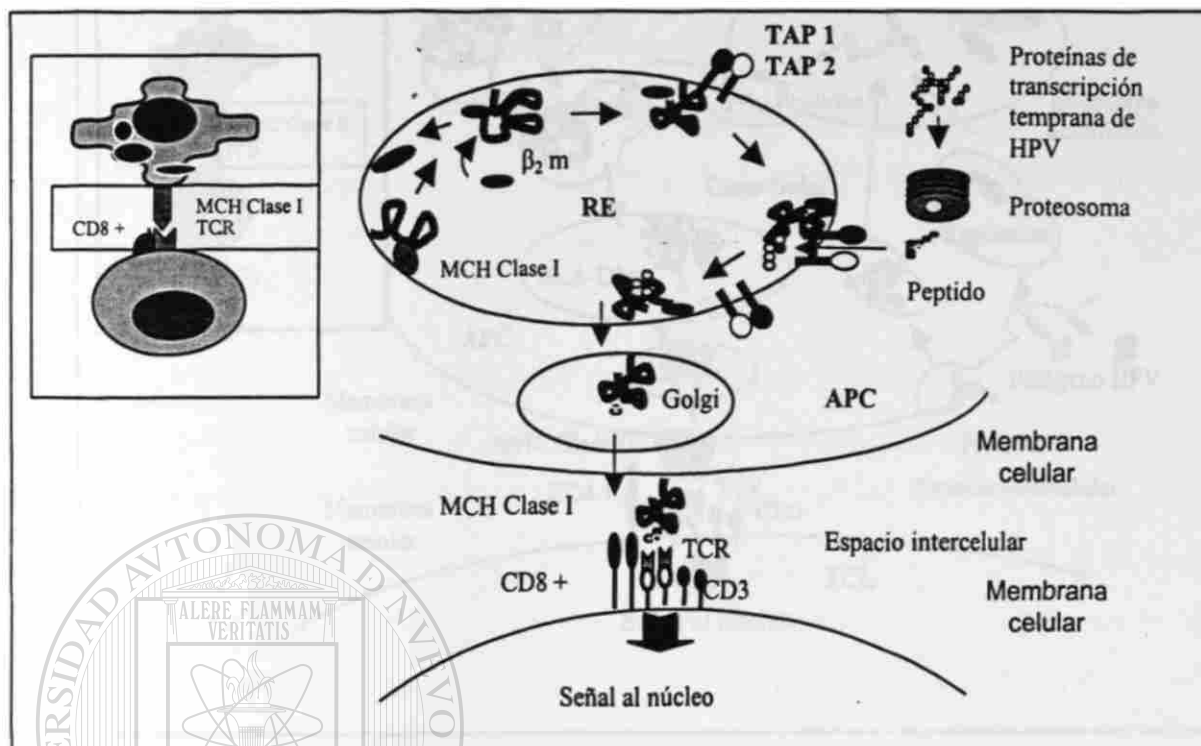
En muchos casos, el dominio de unión a DNA de la proteína E2 es requerido para la replicación del DNA de BPV1 (Winokur & McBride, 1992), además del sitio de unión a E2 es requerido en el origen de replicación. Sin embargo, varias proteínas E2 han sido indentificadas que son deficientes en la unión a DNA y pueden soportar la replicación. En un estudio, dos de diez proteínas E2 con deleciones en el dominio de unión a DNA fueron capaces de soportar la replicación del DNA a bajos niveles (Winokur & McBride, 1992), de la misma manera mutaciones puntuales en el dominio de unión a DNA la proteína E2 fueron capaces de inducir la replicación *in vitro* (Lii et al., 1993). La proteína E2 de BPV 1 con mutaciones en el residuo de cisteina sensible a redox en la posición 340 en el dominio de unión a DNA es capaz de soportar la replicación pero esta es incapaz de activar la transcripción (Grossel et al., 1996). Sin embargo, las propiedades de dimerización y de unión a DNA de la proteína E2 son importantes para las funciones de replicación y para completar el ciclo de vida viral; la posición del sitio de unión a E2 con respecto al sitio de unión a E1 en los orígenes de replicación estan conservados y su ubicación obedece a las funciones de los papilomavirus.

IV. RESPUESTA INMUNE DE LA INFECCION DE PAPILOMAVIRUS

4.1). RESPUESTA INMUNE ANTTUMORAL

El papel de la respuesta inmune en la patogénesis de las neoplasias asociadas con la infección de papilomavirus humano, involucra una respuesta inmune de tipo humoral mediada por linfocitos B para la producción de anticuerpos específicos contra algunos epítopes de las proteínas virales o celulares del proceso de transformación (Galloway & Jenison, 1990 & Gissman et al., 1993). Sin embargo, varias evidencias sugieren que la respuesta inmune mediada por células es la más importante para el control de las infecciones por HPV y de neoplasias asociadas a papilomavirus (Wu T, 1994). Por tal motivo en los últimos años se ha tratado de entender como actúa la respuesta inmune y las alteraciones que puede tener ante el desarrollo de las células transformadas, así como los mecanismos de evasión que utiliza el virus en contra de la respuesta inmune. Dos poblaciones celulares median la respuesta inmune de tipo celular; los linfocitos T CD8+ citotóxicos y los linfocitos T CD4+ cooperadores. La respuesta inmune citotóxica juega un papel crítico en el control de las células infectadas por virus (Figura 7). Los antígenos extraños son reconocidos sobre la superficie de las células infectadas como péptidos cortos de 8-10 aminoácidos asociados al complejo de histocompatibilidad (MHC o HLA) generados de la proteólisis de las proteínas virales en el citoplasma de las células infectadas. Tales péptidos son transportados del citosol al retículo endoplásmico donde se unen a las moléculas de MHC clase I, formando un complejo péptido-antigénico-MHC en la célula infectada, el cual es reconocido por el receptor de células T (TCR) de los linfocito T citotóxico (CTL). Adicionalmente la activación de los CTL requiere reconocer antígenos extraños sobre las células presentadoras de antígeno profesionales (APCs), tales como los macrófagos, linfocitos B activados y células dendríticas. Todas estas células expresan moléculas de MHC clase I y clase II, son capaces de procesar antígenos exógenos y son ricas en moléculas co-estimuladoras B7 importantes para la activación de las células T (Man S, 1988). Los CTL pudieran reconocer péptidos derivados de las proteínas de transcripción temprana dentro del citoplasma de las células infectadas unidos a las moléculas del MHC clase I (Townsend & Bodmer, 1989). En queratinocitos cervicales transformados con HPV la expresión constitutiva de E6 y E7 pudiera derivar péptidos asociados al HLA clase I en la superficie del queratinocito, sin embargo, esto aún no está bien claro, ya que en las células infectadas por HPV no se presenta una expresión continua de las proteínas virales, existe una baja secreción de las mismas y en los queratinocitos se ha demostrado que hay una baja expresión de las moléculas del HLA clase I (Connor & Stern, 1990) lo que impide una buena presentación de las mismas y en consecuencia una mala activación de los linfocitos citotóxicos. Adicionalmente, otra molécula de membrana que es muy importante en la respuesta inmune a HPV, es la molécula de adhesión celular (ICAM)-1, esta molécula promueve la interacción intercelular y junto con otras moléculas de adhesión, controlan la migración de células mononucleares y de

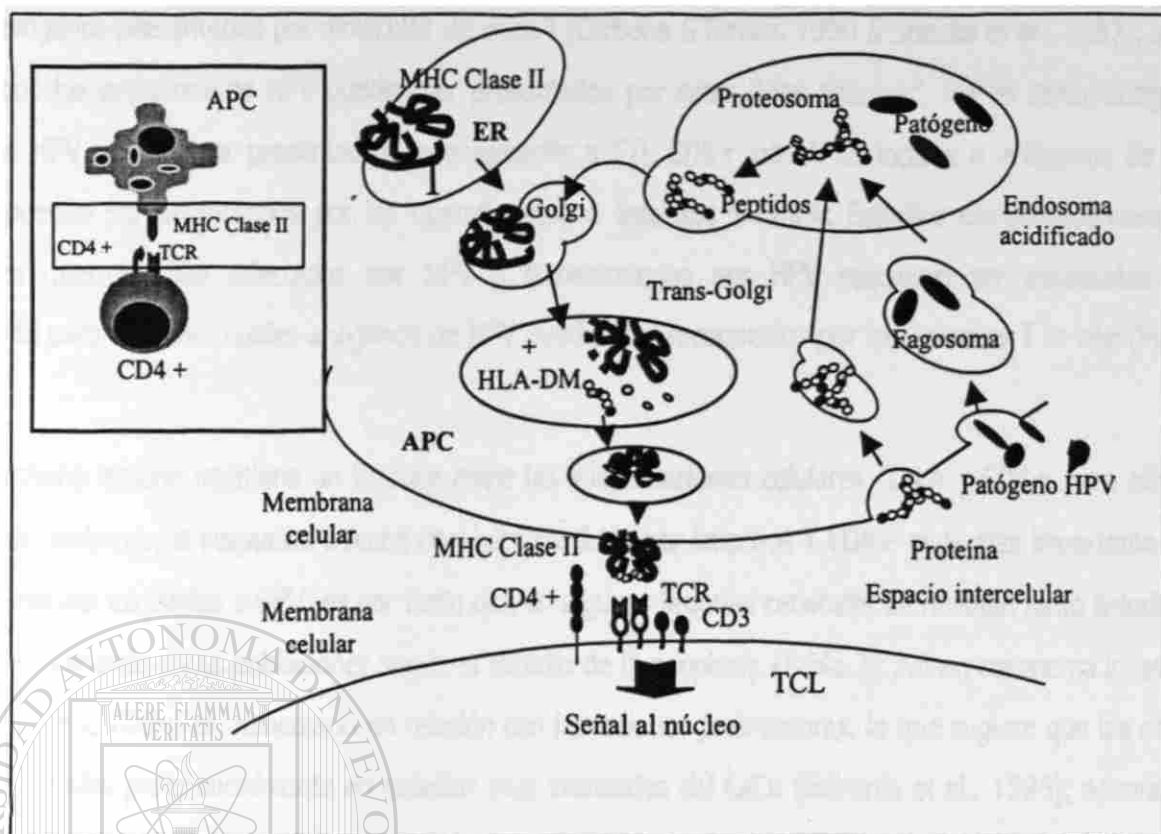
neutrófilos al sitio activo inmune (Springer et al., 1994). Cambios en la expresión de las ICAM se han observado en tejidos cervicales malignos infectados por HPV (Viac et al., 1993 & Coleman et al., 1993).



Man S. 1998

Figura 7: Degradación, transporte y presentación de los antígenos de HPV al MHC clase I

La respuesta de linfocitos T cooperadores, CD4+, tiene un papel inmunológico tanto positivo como negativo. Estos pueden producir citocinas para activar linfocitos B para la producción de anticuerpos y citocinas para activar la respuesta de CTL CD8+, es decir promover una respuesta inmunológica de tipo humoral o celular. En contraste a las células CD8+, los linfocitos CD4+ reconocen antígenos exógenos, los cuales circundan alrededor de la APC por un proceso de endocitosis o fagocitosis (Figura 8). Así los antígenos son encapsulados dentro de vacuolas llamadas endosomas, los cuales degradan las proteínas en fragmentos peptídicos de 11-13 aminoácidos. El bajo pH del endosoma fusiona estas vesículas con otras que contienen las moléculas del MHC clase II, y de esta manera se asocian los péptidos antigénicos con el MHC clase II. A diferencia de las moléculas de MHC clase I, que son expresadas en todas las células nucleadas, las moléculas de clase II, son expresadas estrictamente por las células presentadoras de antígeno profesionales, como los macrófagos, células B activadas y células dendríticas. Todas estas células expresan altos niveles de moléculas MHC clase II, y son capaces de procesar eficientemente antígenos exógenos y moléculas coestimuladoras como B7-1 importantes para la activación de linfocitos T (Man S, 1998).



Man S. 1998

Figura 8: Degradación, transporte y presentación del antígenos de HPV al MHC clase II

Teóricamente la presentación de antígenos de HPV sería directa, sin embargo, debido a que la mayoría de los carcinomas cervicales expresan moléculas de HLA clase II (Glew et al., 1992) y que los genes tempranos de HPV son expresados preferencialmente en el citoplasma y el núcleo, sugiere la posibilidad de que estas proteínas puedan ser degradadas en el citoplasma y presentadas por moléculas de clase I. Otra posibilidad sería, que estas proteínas de HPV pueden ser liberadas dentro del espacio extracelular como resultado de la muerte del queratinocito, (muerte celular o daño al tejido por el proceso de transformación), por lo tanto estos antígenos pueden ser procesados por las células APC y presentados a los linfocitos T CD4+. Esto puede ocurrir en carcinoma cervical y en LIS de alto grado, donde se presentan infiltrados de linfocitos, incluyendo APCs (Tosi et al., 1992; Freguson et al., 1985; Coleman & Stanley, 1994). Sin embargo, en NIC de bajo grado, se caracteriza por una falta de inflamación local y ausencia de muerte celular (Tay et al., 1987), lo que sugiere que la vía del MHC clase II puede ser menos efectiva en la presentación de antígenos de queratinocitos infectados por HPV que en queratinocitos transformados por HPV (Man S, 1998).

El procesamiento del antígeno endógeno ó exógeno por la APC y su presentación por moléculas de clase I o II, no parece ocurrir eficientemente. Los linfocitos CD4+ pueden reconocer antígenos endógenos vía moléculas

clase II (Jaraquemada et al., 1990 & Nuchtern et al., 1990) y recíprocamente, los linfocitos CD8+ pueden reconocer antígenos exógenos presentados por moléculas de clase I (Carbone & Bevan, 1990 & Speidel et al., 1997), así es concebible que los antígenos de HPV pueden ser presentados por estas "vías alternas". Por lo tanto, antígenos exógenos de HPV pueden ser presentados exógenamente a CTL CD8+ por APCs locales o antígenos de HPV endógenos pueden ser presentados por los queratinocitos a linfocitos T CD4+. Estudios del procesamiento de antígenos en queratinocitos infectados por HPV o transformados por HPV requieren ser estudiados más profundamente para entender cuales antígenos de HPV pueden ser reconocidos por los linfocitos T *in vivo* (Man S, 1998).

El sistema inmune mantiene un balance entre las subpoblaciones celulares CD4+ y CD8+ para eliminar infecciones, sin embargo, la respuesta inmune citotóxica mediada por linfocitos T CD8+ es la más importante para controlar neoplasias asociadas a HPV, es por tanto que en algunas lesiones cervicales se reclutan tanto linfocitos T CD4+ y CD8+; variando estas poblaciones según el estadio de la neoplasia (Tabla 3); Así en carcinoma invasor el número de linfocitos CD8+ es aumentado en relación con las lesiones preinvasoras, lo que sugiere que las células CD8+ son reclutadas preferencialmente en estadios muy avanzados del CaCu (Edwards et al., 1995); además, se conoce que muchos de los linfocitos infiltrantes se encuentran en un estado de anergia celular, lo que les impide su función efectora.

TABLA 3 :NUMERO DE CELULAS POSITIVAS PARA LOS MARCADORES DE SUPERFICIE CD4+ Y CD8+

Diagnóstico	Marcador de superficie	
	CD4 +	CD8+
Sin LIS	19.6	11.2
LIS de bajo grado	38.6	30.0
LIS de alto grado	52.4	40.6
Carcinoma invasor	48.1	105.5

Edwards et al., 1995.

Adicionalmente a la inmunidad mediada por linfocitos T, otras células inmunes participan en la respuesta inmune mediada por células, tales como células asesinas naturales (NK) y macrófagos. Las células NK están presentes en la mayoría de las lesiones asociadas a HPV y en NIC, sin embargo, en las células de carcinoma cervical y en células epiteliales cervicales humanas inmortalizadas con HPV son resistentes a las células NK (Evans et al., 1993); Además, en pacientes con lesiones precancerosas y cancerosas inducidas a HPV se ha reportado que decrece la actividad de las células NK y estas son restringidas a la respuesta de citocinas inmunosupresoras (Malejczyk et al., 1993). Los macrófagos son considerados como mediadores celulares importantes de inmunidad

antitumoral. Banks y cols. en 1991, determinaron que en células transfectadas con el oncogen E7 de HPV 16 presentan susceptibilidad citotóxica a macrófagos murinos activados (Bank et al., 1991). Estos estudios *in vitro* establecen una relación entre la expresión de los oncogenes de HPV 16 y la capacidad de macrófagos activados para reconocer selectivamente y destruir las células neoplásicas asociadas a HPV 16.

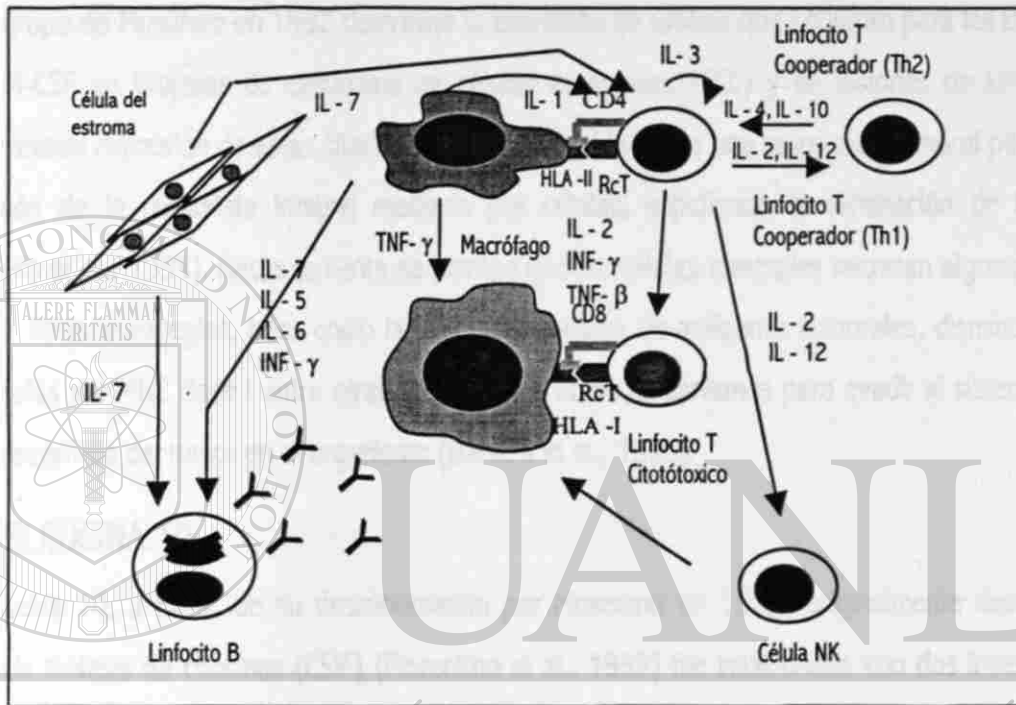
Adicional a la respuesta inmune humoral y celular, la respuesta inmune local del huésped, juega un papel importante en la defensa contra la infección del HPV. Esta respuesta incluye cambios en el número de células profesionales presentadoras de antígeno, cambios en la secreción de citocinas y cambios en la expresión de moléculas del MHC. Las células de Langerhans son células especializadas en tejidos epiteliales, presentan una morfología similar a las dendríticas, y se ha encontrado que en verrugas, en lesiones con condiloma y NIC, estas células de Langerhans están dramáticamente reducidas comparadas con la epidermis normal (Morelli et al., 1993 & Lehtinen et al., 1993).

Las moléculas del MHC son muy importantes en la regulación de la respuesta inmune. En el cervix, las moléculas del MHC clase II son expresadas en el 50% de los NIC de alto grado (Coleman & Stanley, 1994) y en el 87% del cáncer cervical (Glew et al., 1992); además de la expresión del MHC clase I esta fuertemente reducida o ausente en más del 75% de NIC y del carcinoma cervical (Cromme et al., 1993). Interesantemente, decrece la expresión del MHC clase I en la superficie y se ha encontrado relacionado con una bajo transporte de la proteína transportadora de antígeno (TAP-1) (Cromme et al., 1994). Cromme, 1994, reporta una baja expresión de TAP-1 en el 49% de los casos de carcinoma cervical, de los cuales 76% muestra baja expresión de HLA A/B. Los antígenos vírales presentados por las moléculas de HLA, en varios estudios muestran que ciertos antígenos del HLA de clase II influyen en el desarrollo de la malignidad asociado al HPV (Wank & Thomssen, 1991; Helland et al., 1992 & Apple et al., 1994). Wank y Thomssen reportan, una relación en carcinoma de células escamosas con la expresión de moléculas HLA-DQw3 (Wank & Thomssen, 1991).

4.2). CITOCINAS Y CANCER

La inmunidad mediada por células esta regulada por citocinas que son secretadas por los linfocitos T CD4+ cooperadores (Th) y CD8+ citotóxicos. En general los linfocitos Th pueden ser clasificados como linfocitos Th1 y Th2 en base a las diferentes tipos de citocinas que secretan, además de ser antagonistas entre ellas. Los linfocitos Th1 secretan IL-2, IL-12 e INF- γ ; y los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13 (Figura 9) (Mosmann et al., 1989). Los linfocitos Th1 son las células efectoras más importantes en las reacciones inflamatorias e infecciones vírales (HPV) y de bacterias intracelulares, asociada con hipersensibilidad retardada para una baja producción de anticuerpos (Romagnani S, 1992). El fenotipo funcional de la respuesta de linfocitos Th2 se asocia con la persistencia de producción de ciertos tipos de anticuerpos, particularmente inmunoglobulina G e inmunoglobulina E,

además se ha observado en infecciones por helmintos y desordenes genéticos, sin embargo, la protección desarrollada para tales infecciones y para el control de tumores, puede ser alterada por la respuesta de citocinas Th2. La protección mediada por linfocitos para infecciones virales tales como el control de tumores mediada por citocinas Th1, con la producción de las citocinas IL-2 e INF- γ como el principal componente que contribuye al desarrollo de inmunidad mediada por células contra infecciones asociadas a HPV y con neoplasias asociadas a HPV (Wu et al., 1997 & Man S, 1998), sin embargo, esta puede ésta puede ser inhibida por la respuesta de citocinas Th2, IL-4 e IL-10, e inhibe el desarrollo de la respuesta inmune mediada por células.



Barrera et al., 1995

Figura 9: Respuesta inmune antitumoral

Varios reportes indican, en base a las citocinas presentes, se favorece una respuesta Th2 en varias células cancerosas (Frazer & Tindle, 1992). En estadios avanzados de la evolución del CaCU y en otras malignidades, se presenta un estado de inmunosupresión local en respuesata a la producción de citocinas Th2 y en citocinas proinflamatorias. Diferentes tipos de tumores humanos se han usado como modelos para estudiar la respuesta inmune (Broder et al., 1978). Broder y cols, en 1978, determinaron un estado de inmunosupresión en cáncer y en enfermedades neoplásicas ocasionadas por una respuesta supresora. Posteriormente Loeffler en 1992 y Riley en 1990, reportaron factores inmunosupresores producidos por diferentes células tumorales. Tales evidencias indican que ciertas células y factores pueden estar infiltrados en y alrededor del tumor produciendo un estado de inmunosupresión local. Mas tarde se dio a conocer que se trataban de citocinas y células efectoras presentes en el sitio del tumor, de esta manera Rusell, en 1990, introdujo el término de terapia génica utilizando citocinas dirigidas a células tumorales (Rusell J, 1990; Oettgen F, 1991; Fearon et al., 1990 & Russell et al., 1991). Sin embargo, no

fue hasta 1991, que se conoció el papel inmunosupresor local de ciertas citocinas, tal como la IL-4, el factor estimulante de granulocitos (G-CSF), el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la interleucina 10 (Blankenstein et al., 1991).

Aunado a las evidencias conocidas, Balkwill en 1993, sugirió que algunas citocinas pueden estar involucradas en el desarrollo de la malignidad, al observar que TNF- β liberado en el sitio de la infección esta involucrado en la progresión del cáncer de ovario humano (Balkwill et al., 1993; Malik et al., 1990 & O'Leary et al., 1987). A partir de esta idea varios autores han determinado la expresión local de citocinas en cáncer. Particularmente el grupo de Musahiro en 1992 determinó la expresión de RNAs que codifican para las citocinas IL-4, IL-5, IL-10 y GM-CSF en biopsias de carcinoma de células escamosas (SCC) y en lesiones de keratinocitos, demostrando una elevada expresión de estas citocinas en SCC, lo cual favorece una respuesta humoral pero a la vez una inmunosupresión de la respuesta inmune mediada por células, impidiendo la eliminación de las células tumorales (Yamamura et al., 1993). Recientemente se planteo que las células tumorales secretan algunas citocinas además de generar otras estrategias, tales como la falta de expresión de antígenos tumorales, disminución de la expresión de moléculas del MHC clase I entre otras, utilizándolas como mecanismos para evadir al sistema inmune, permitiendo así el desarrollo del tumor en el organismo (Barrera et al., 1995).

V). INTERLEUCINA 10

La interleucina 10, a partir de su descubrimiento por Mosmann en 1989, originalmente descrita como factor inhibidor de la síntesis de citocinas (CSIF) (Fiorentino et al., 1989) fue relacionada con dos investigaciones independientes. Una fué identificada como mediador derivado de células B la cual coestimula la proliferación de timocitos activados y la identificación de IL-10 con la apreciación de diferentes subpoblaciones T cooperadoras (Th1 y Th2) que regulan tanto la producción de anticuerpos como la respuesta inmune mediada por células.

5.1). ESTRUCTURA DEL GEN DE IL-10: HUMANO Y RATON

Ambos genes se encuentran localizados en el brazo largo del cromosoma 1. La secuencia completa del DNA del gen IL-10 murino (mIL-10) es una región de 7.2 kb la cual contiene toda la región codificante y una secuencia 5'-flanquente de 1.5 kb. El gen de IL-10 humano (hIL-10) fue detectado a partir de un fragmento de 0.7 kb de un cDNA de hIL-10 el cual fue hibridado con diferentes fragmentos de restricción de DNA genómico humano, la sonda (BIOS Corp., New Haven, CT) detecta una banda de ~3.5 kb en el DNA digerido con *Hind III* (Kim et al., 1992). El gen de IL-10 murino, contienen 4 intrones y 5 exones que codifican para un cDNA de aproximadamente 5.1 Kb de DNA; sin embargo el gen de hIL-10 es codificado por un sólo exón genómico (Kim et al., 1992).

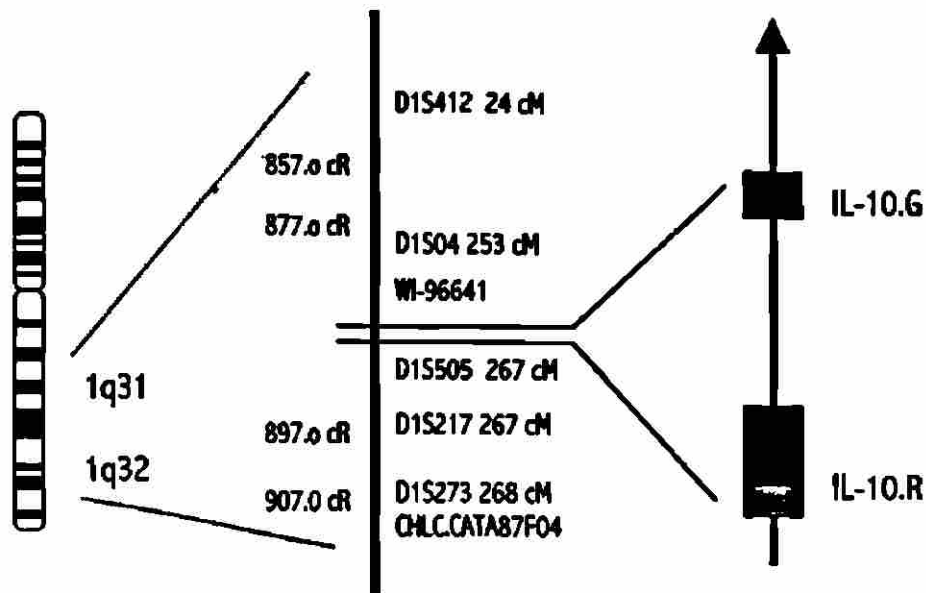


Figura 10: Localización cromosomal del gen de IL-10

Además se ha demostrado que la secuencia del gen de IL-10 está muy conservada entre el humano, ratón, rata y los bovinos (Hash et al., 1994). La secuencia codificante del gen de hIL-10, tiene una homología del 80% con la de ratón y rata; y un 84% de homología con la de bovino (Kim et al., 1992 & Hash et al., 1994). La secuencia de homología entre mL-10 y hIL-10, difieren en las posiciones nucleotídicas 1162 y 1477 por la inserción de elementos repetidos de la familia *Alu* (Hess et al., 1983). De los 5 exones detectados; el exón I contiene la secuencia 5'-no traducida, la secuencia señal de aproximadamente 34 aminoácidos que comprenden el N-terminal de la proteína madura y el exon IV codifica 30 aminoácidos de la región C-terminal de mL-10 y la región 3'-no traducible del RNAm de mL-10 (~ 1.4 kb), al igual que los genes de otras citocinas, la unión de exón-intrón no cambian los codones de los aminoácidos. Una señal adicional de poliadenilación esta presente en la posición 6668-6673, 13 pb en dirección 5' del sitio de poli-adenilación. Los exones restantes contienen el ORF del gen.

La secuencia del mL-10 fue comparada con las secuencias reportadas en el GenBank y se determinó que tiene una homología con la hIL-10 como se mencionó anteriormente, además se encontró una fuerte homología con el ORF del BCRF1 del virus de Epstein Barr (IL-10 viral/ vIL-10), esta homología no solo esta restringida a los exones, lo que sugiere que el ORF viral es producto de un proceso evolutivo donde el gen de IL-10 fue capturado (Baer et al., 1984). Otras similitudes entre las secuencia nucleotídica del exón II y varios genes se ha detectado; el exón II tiene una homología del 60% a una región corta de los genes vírales que codifican para Ag de superficie del virus de hepatitis woodchuck (Galibert et al., 1981).

5.2). LA REGION REGULADORA DEL GEN DE IL-10

La secuencia completa de DNA de la región reguladora del gen de IL-10 fue reportada por Kube, Platzer y cols en 1995 (Kube et al., 1995), correspondiendo aproximadamente 2632 pb. La región 5'-flanqueante del gen de hIL-10 fue comparada con la secuencia reportada en la base de datos EMBO, encontrando 100% de homología con la secuencia de parte del cDNA de hIL-10 reportada por Viera y cols (Viera et al., 1991). Esta región fue comparada con la región 5'-flanqueante de mL-10, donde se encontró un 60% de homología en aproximadamente 800 pb en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción (Kim et al., 1992). No se encontró homología significativa entre la región 5' no codificante de hIL-10 con el ORF de BCRF1 (vIL-10) del genoma del virus del Epstein-Barr (Viera et al., 1991 & Moore et al., 1990).

En este reporte se determinan las secuencias que están involucradas en regular la transcripción del gen hIL-10 en líneas celulares de linfoma de Burkitt's en sistemas de funcionalidad a partir de deleciones de la región reguladora de hIL-10, cuantificando luciferasa y β -galactosidasa. Donde se determinan secuencias de regulación positiva localizadas entre las posiciones -1100/-900 y elementos de regulación negativa los cuales inhibe la actividad de luciferasa y se localizan entre la posición -800/-300 (Kube et al., 1995).

ELEMENTOS REGULADORES DEL GEN DE hIL-10: El examen de la secuencia 5'-flanqueante de hIL-10 con las secuencias motif asociadas a la regulación de la transcripción génica (Locker & Buzard, 1990), muestran que se localiza la caja TATAA en la posición -77 y una caja CAAT en la posición -226 del extremo 5' de la secuencia del cDNA de hIL-10. Elementos adicionales incluye elementos putativos de respuesta a glucocorticoides y para insulina, elementos consenso a metalotioneina y secuencias regulatorias a nitrógeno. Aunque IL-10 es una citocina específica a Th0/Th2 al igual que IL-4, no se encontró una secuencia de 11pb involucradas en la regulación la IL-4 en el promotor de IL-10. Sin embargo esta fue homóloga a la secuencia detectada en la posición 2209 (AAAATT). Un caso sorprendente fue la existencia de un elemento de respuesta para la proteína transactivadora E2 del virus de papiloma localizado en la posición -2237 (ACC₆NGGT), este elemento apoya nuestra hipótesis sobre la regulación de la expresión de la hIL-10 por el virus del papiloma humano en cáncer cervical. En la tabla 4 se presenta un resumen de los elementos de regulación transcripcional presentes en la región reguladora del gen de hIL-10.

ELEMENTOS REGULADORES DEL GEN DE mL-10: Esta región contiene varios elementos de regulación que están presentes en la región 5'- no codificante del gen de hIL-10 (Kim et al., 1992). Se localizan la caja TATAA en la posición -30 del extremo 5' de la secuencia del cDNA de mL-10, se incluye un elemento probable de respuesta a glucocorticoides, un elemento de respuesta a AMPc, sitios de unión para AP-1 y NF κ -B. Al igual que el gen hIL-10,

no se encuentra la secuencia de 11 pb importante para la regulación por IL-4. En la tabla 5 se muestran los elementos de regulación para el gen de mL-10.

TABLA 4. SECUENCIAS DE CONTROL DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE hIL-10

SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO	POSICIÓN	POSIBLE SIGNIFICANCIA
TGAGTCA	78-84	AP1
GCACT	158-162	Consenso a metalotioneína
TGTCCT	249-254	Consenso a metalotioneína
ACNNNNNINGGT	309-320	Transactivador E2 de papilomavirus
GATGGGAAACA	354-364	EBNA2 (LMP2)
AGGAAG	366-371	PEA1
GAGAA	522-526	Caja PU
GTTTGCA	838-844	Secuencia regulada por nitrógeno
GGGGGAAGT	1390-1398	Elemento ETS-similar
GAGGAA	1411-1416	TIF
GTGGAAA	1805-1811	Secuencia central similar a insulina
GAGAA	1821-1825	Caja PU
TAATGAAAT	1829-1837	Elemento de respuesta a Glucocorticoides
CCCGCC	1871-1876	SP1
AAAATGGAA	1906-1915	YY1
CTTGGGAAGCTT	1922-1932	EBNA2 (LMP2)
TGTTCT	2165-2170	Elemento de respuesta a suero
CCAAT	2269-2274	Caja-CCAAT
TATAA	2418-2422	Caja TATA

Kube et al., 1995

TABLA 5. SECUENCIAS DE CONTROL DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE mL-10

SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO	POSICIÓN	POSIBLE SIGNIFICANCIA
TATAA	1531-1535	Caja TATA
AGAACA	1547-1522	Elemento de respuesta a glucocorticoides
	1266-1271	
TGTTCT	1184-1189	
AGGAAG	1507-1512	PEA-3 Proteína de reconocimiento y unión
CCTTT	1499-1503	Inducible por IFN
	1082-1086	
AAAGG	190-194	Inducible por IFN (secuencia inversa)
AAAGGA	1419-1424	Secuencia core enhancer de IFN
AAGGGAA	1414-1420	
CCTGGGA	1220-1226	Comun en genes reactantes en fase aguda
ACGTCA	1208-1213	Elemento de respuesta a AMPc
GGGGTTTCCT	1074-1084	Sitio de reconocimiento a NF-kB
GGGCAGTTTCC	4706-4716	
GGAGAAGTCCC	702-712	Sitio de reconocimiento a NF-Kb (secuencia inversa)
TCCCAG	758-763	Elemento de respuesta a IL-6
CACCC	683-687	Secuencias ricas en GC requeridas para la transcripción eficiente de algunos genes eucariotes
CCAAT	434-438	Sitio de unión para CBP, CTF/NF-1 Y NF-Y
TGAGTCA	274-280	Sitio de unión para AP-1

Kim et al., 1992

5.3). ESTRUCTURA DE LA PROTEINA DE IL-10

El cDNA de mL-10, rIL-10 (rata) y hIL-10, codifican para 178 residuos de aminoácidos, con péptido señal hidrofóbico generado de 160 aminoácidos de la proteína madura. La IL-10 de rata-ratón contiene dos sitios de glucosilación en el extremo amino terminal y cinco residuos de cisteínas. Hay aproximadamente un 73% de homología de la proteína en estas tres especies (Moore et al., 1993). La proteína mL-10 está carboxilada en el extremo amino terminal e hIL-10 parece no estar glucosilada. La IL-10 de ratón y humana, son éebilmente ácidas y se presentan como homodímeros ligados no covalentemente en solución (Moore et al., 1993). La molécula de IL-10 es un homodímero con un peso molecular de 36KDa, compuesto de dos subunidades formando una estructura en forma de V (Figura 11) La mitad de la estructura contiene seis α -hélices, cuatro originadas de una subunidad y dos de otra. La estructura de IL-10 presenta posibles modelos de conversión de dímeros dentro de monómeros y de sitios probables de interacción con varios receptores. Además se ha encontrado una alta topología similar entre la proteína de IL-10 con INF- γ . El receptor de IL-10 ha sido aislado de tejidos humanos y de ratón. Ambos receptores son glicoproteínas transmembranales de aproximadamente 110 kDa, guardando una homología de 60% entre ellas (Zdanov et al., 1993).

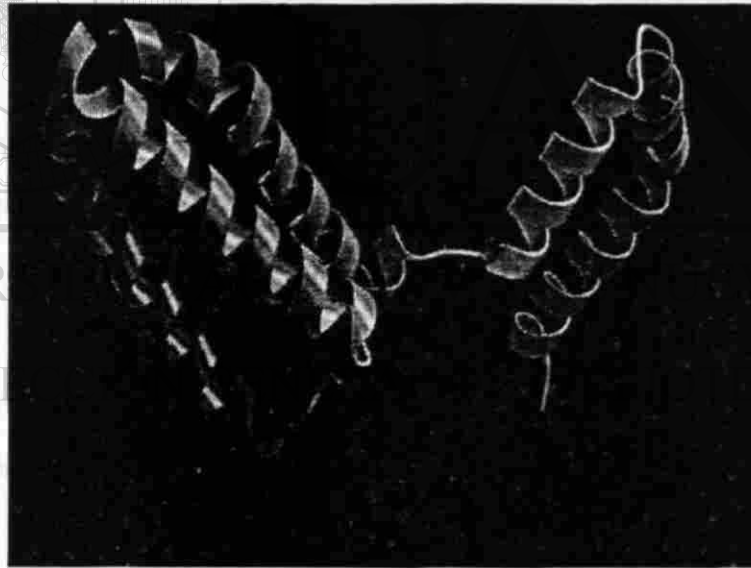


Figura 11: Estructura esquemática de la proteína IL-10.

La interleucina 10 en solución se comporta como un dímero (Morrison, 1994), cada subunidad consiste de 6 hélices, de la A a la F. Las cadenas polipeptídicas de cada subunidad forman la mitad del dímero; las hélices E y F de una subunidad del dominio de 6 hélices y las hélices A'-D' de la otra subunidad forman la simetría del dímero. Adicionalmente, las hélices A, C, D, F' y A', C', D' y F de cada dominio forman un clásico mango izquierdo envolviendo

4 hélices (Morrison et al., 1991), presentes en todas las estructuras cristalográficas de la familia de las citocinas de hélices.

Aproximadamente el 85% de los residuos de la molécula de IL-10 forman parte de la conformación α -hélice. La mayoría de las hélices adoptan conformaciones canónica, algunas 3₁₀-vueltas y tres regiones en forma de rosca, ocasionados por los residuos Ser31-Arg32 (de la curva de la hélice A), Leu73-Glu75 (Pro78 en la mitad de la hélice C), y Ala139-Ser141 (en la curva de la hélice F), los enlaces de hidrógeno son más comunes entre las hélices, donde no participan los oxígenos de los carboxilos en tales enlaces. La estructura de IL-10 es estabilizada por dos puentes disulfuro intramolecularmente, Cys12-Cys108 y Cys62-Cys114. Las uniones disulfuro de las hélices A y C a la hélice D, forman una estructura con una larga depresión en medio, la cual es penetrada por la hélice F' de la segunda subunidad. La superficie de la depresión es altamente hidrofóbica. Los residuos que le dan el carácter hidrofóbico son, Met39, Tyr 59, Leu 61, Pro 78, Pro 85, Ala 89, Leu 103 y Pro113 (Zdanov et al., 1993)

La hIL-10 ha no presenta carbohidratos en la región amino (Vieira et al., 1991), pero esta contiene un sitio potencial de glicosilación en la posición amino (Asn116). Este residuo está localizado en el asa entre las hélices D y E. Este sitio potencial de glicosilación está conservado en rIL-10 (Goodman et al., 1992), mL-10 (Moore et al., 1990) y pIL-10 (porcina) (Blanco et al., 1995). Las mL-10 y rIL-10 contienen un segundo sitio de glicosilación N-similar cerca del amino terminal Asn8 en mL-10 (Moore et al., 1990) y Asn11 en rIL-10 (Goodman et al., 1992), no glicosilado en pIL-10 y en hIL-10. Basados sobre la homología entre las secuencias de hIL-10, rIL-10 y mL-10, este segundo sitio está localizado en el N-terminal de la hélice A, sobre la superficie de la molécula de IL-10.

La secuencia de aminoácidos disponible de IL-10 de otras especies han sido comparadas en la figura 12, donde se observa la secuencia alineada de hIL-10 y las correspondientes citocinas de rata, porcina y murina. La secuencia de IL-10 de estas especies tienen una alta homología (72 al 77%) con la hIL-10, lo que indica que hay una secuencia muy conservada, la cual se mantiene en la secuencia secundaria y terciaria de la proteína. Los genes que codifican la hIL-10 y mL-10 se localizan en el mismo cromosoma (cromosoma 1); hIL-10 es codificado por un solo exón, y el mL-10 es codificado por 5 exones (5.1 kb de DNA genómico). Los exones 1 y 2 corresponden a las hélices A y B, el exón 3 contiene las hélices BC,C, el asa CD y la hélice D. Interesantemente la hélice E y F, las cuales cruzan con a el segundo dominio, son localizados sobre los exones 4 y 5 respectivamente (Zdanov et al., 1995).

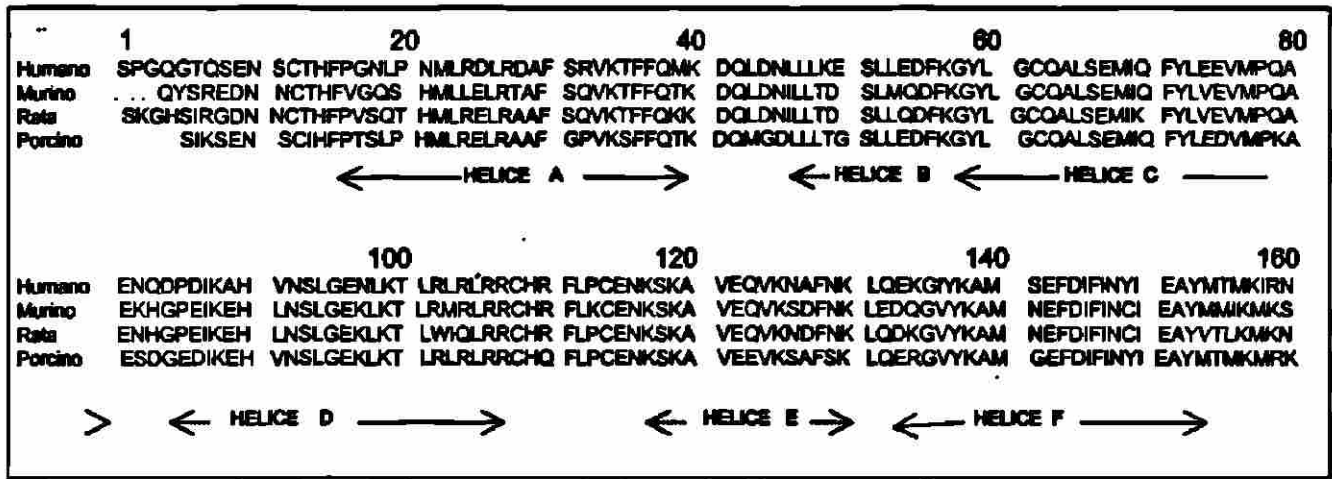


Figura 12: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de IL-10 humano, murino, rata y porcino.

5.4). HOMOLOGIA DE IL-10 CON EL GEN BCRF1 DEL VIRUS DE EPSTEIN BARR

La mL-10 y hIL-10 presentan una alta homología en secuencia de nucleótidos y de aminoácidos con el ORF del gen BCRF1 del virus de Epstein Barr (EBV) (Moore et al., 1990; Vieira et al., 1991 & Baer et al., 1984). La homología es conferida a la secuencia codificante de la proteína madura y no es detectable en la secuencia señal o secuencia 5' y 3'-no traducible. De las tres secuencias, mL-10 y hIL-10 están más relacionadas en cuanto a nivel de secuencia de DNA (81%), mientras que la secuencia de DNA que codifica las proteínas hIL-10 y BCRF1 muestran solo el 71% de homología. Sin embargo, ambas en secuencia de aminoácidos mantienen una relación del 84%. El anticuerpo de rata anti-hIL-10 produce reactividad cruzada con las proteínas hIL-10 y vIL-10, pero no con la mL-10 (MacNeil et al., 1990). A diferencia del gen de hIL-10, el gen de BCRF1 no contiene intrones, lo que sugiere: a). Que los genes mL-10 y hIL-10 provienen de un antecesor común, b). BCRF1 podría representar un antecesor procesado, el cual capturo un gen de citocina celular y c). La proteína BCRF1 es muy parecida a la citocina humana (Vieira et al., 1991 & Moore et al., 1991). BCRF1 es expresada en la fase tardía del ciclo lítico de EBV, pero no en niveles significantes en líneas celulares de infección tardía (Hudson et al., 1985 & Hsu et al., 1990). El ORF de BCRF1 codifica para un polipéptido secretado de aproximadamente 17-KDa, al igual que hIL-10, contiene poca o nula glicosilación. BCRF1 despliega algunas actividades como IL-10 y esta se designa como IL-10 viral (vIL-10). En ensayos para determinar las actividades de BCRF1 esta parece ser de 3 a 10 veces menor que la hIL-10 (Moore et al., 1991).

5.5). CELULAS QUE EXPRESAN IL-10

La IL-10 es producida por una amplia variedad de líneas celulares, mL-10 es expresada por linfocitos T CD4+ Th2 murinos, en bajos niveles clonas de linfocitos CD8+, linfomas de células B, linfocitos T, líneas de células cebadas activadas, macrófagos activados, queratinocitos y células B Ly-1 (B-1) (Fiorentino et al., 1989; Moore et al., 1990; O'Garra et al., 1990; Mc Neil et al., 1990; Fiorentino et al., 1991; O'Garra et al., 1992 & Enk & Katz,

1992). La hIL-10 es expresada por células T CD4+ y clones de linfocitos T, Th0/Th1 y Th2, linfocitos T CD8+ de sangre periférica activados con antígeno específico y policlonal (Yssel et al., 1992), clones de monocitos-macrófagos, queratinocitos, células B activadas, linfomas de células B y líneas de linfoma de Burkitt infectadas con EBV (Viera et al., 1991; de Waal et al., 1991; de Waal-Malefyt et al., 1991; Salgame et al., 1991 & Ralph et al., 1992). De esta manera IL-10 no es una citocina estrictamente específica de linfocitos CD4 Th2.

La IL-10 es producida relativamente por la activación de linfocitos T o monocitos/macrófagos, en comparación con otras citocinas (de Waal et al., 1991; Fiorentino et al., 1991 & Ysel et al., 1992), esta citocina inhibe la activación de linfocitos T y macrófagos. IL-4 inhibe la producción de IL-10 por monocitos humanos activados por LPS (de Waal et al., 1991), e el INF- γ inhibe la producción de IL-10 por macrófagos murinos (Fiorentino et al., 1991) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

5.6). ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LA INTERLEUCINA 10

La IL-10 originalmente fue identificada como un factor inhibidor de la síntesis de citocinas producida por clones de linfocitos Th2 e inhibe la síntesis de citocinas producidas por linfocitos Th1 (Fiorentino et al., 1989 & Fiorentino et al., 1991). Esta citocina se ha demostrado que tiene efectos pleiotrópicos inmunosupresores e inmunoestimuladores sobre una gran variedad de tipos celulares, además de estar involucrada en la regulación de la respuesta inmune.

PROPIEDADES ESTIMULADORAS: La interleucina 10 aumenta la viabilidad de linfocitos B y sobrerregula la expresión de las moléculas del MHC clase II de linfocitos B (Go et al., 1990), y en monocitos inhibe la expresión de estas moléculas. Sin embargo hIL-10 no altera la expresión de HLA clase II sobre linfocitos B humanos (Moore et al., 1993). En términos de efectos sobre la activación de células B, IL-10 aumenta la proliferación y diferenciación de células secretoras de anticuerpos. En linfocitos B activados vía receptor de antígenos (I μ) o vía CD40, IL-10 induce la síntesis de DNA y la proliferación de linfocitos B, e induce su diferenciación para la producción de anticuerpos y la secreción de IgM, IgG y IgA (Rousset et al., 1992 & Defrance et al., 1992). Estos efectos son sinergizados por IL-4, en donde la síntesis de inmunoglobulinas es inducida por IL-10 y es antagonizada por TGF- β .

Adicionalmente IL-10 estimula numerosos tipos celulares. En sistemas *in vitro* aumenta la respuesta proliferativa de timocitos murinos y linfocitos T que han sido activados con IL-2 y IL-4 (Suda et al., 1990 & MacNeil et al., 1990); además funciona como un factor de diferenciación de linfocitos T citotóxicos activados con concanavalina A (Con A). IL-10 estimula células cebadas murinas, sinergizando con IL-3 y IL-4 para inducir proliferación de varias líneas celulares cebadas (Howard & O'Garra, 1992). Por otro lado hay evidencias que indican que IL-10 induce apoptosis en células leucémicas de linfoma crónico de células B (Fluckiger et al., 1994), en

contraste a esto, IL-10 previene la apoptosis de los centros germinales de células B (Leuy & Brovet, 1994), actualmente se conoce que la IL-10 induce la expresión de Bcl-2 en células hematopoyéticas progenitoras CD34+ (Weber-Nordt et al., 1996).

PROPIEDADES INMUNOSUPRESORAS: Estas propiedades de IL-10 se han identificado por su capacidad para inhibir la síntesis de varias citocinas, incluyendo IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , INF- γ y el factor estimulante de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), producidas por macrófagos activados y linfocitos Th1 (Mosmann, 1994). En sistemas *in vitro*, la adición de anticuerpos anti-IL-10 en cultivos de linfocitos T primarios aumentan la emergencia de las células dirigiendo a un fenotipo Th1 (Howard & O'Garra, 1992), estos datos sugieren que la IL-10 puede jugar un papel en disminuir las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardada y otras respuestas Th1 mediada por células, estos efectos se consideran efectos indirectos de la acción de la IL-10. Además IL-10 suprime la capacidad de macrófagos murinos, pero no de células B, para estimular clonas de linfocitos Th1 para la síntesis de citocinas (Fiorentino et al., 1991). De la misma manera, la IL-10 suprime la síntesis de citocinas en clonas Th1 o en células NK activadas por IL-2 o células accesorias antígeno específicas (Moore et al., 1993).

El papel inhibitorio de la síntesis de INF- γ , IL-2 y TNF- β en las subpoblaciones Th1, es antagonizada por IL-4. Los efectos inhibitorios sobre la producción de INF- γ son indirectos y parecen ser el resultado de una supresión de la síntesis de IL-12 por células accesorias. En macrófagos estimulados con LPS de bacterias, IL-10 inhibe la síntesis de IL-1, IL-6 y TNF- α , promoviendo entre otras cosas la degradación de RNAm de citocinas. Esto además dirige la inhibición de la presentación de antígenos. Se ha demostrado que los efectos biológicos de IL-10 son antagonizados por IL-12 (De Ádreua et al., 1993).

En relación a la supresión de la presentación de antígenos por macrófagos/monocitos, se ha demostrado la capacidad de IL-10 como un fuerte desregulador de la expresión constitutiva e inducible de las moléculas del MHC clase II sobre monocitos humanos (HLA-DR/DP y DQ) (de Wall Malefyt et al., 1991) y sobre macrófagos de exudados de peritoneo murino (Howard & O'Garra, 1992). Además la IL-10 produce fuertes cambios en la morfología y adhesión de macrófagos del peritoneo o en monocitos en cultivo y se han observado cambios en la expresión de una gran variedad de moléculas de adhesión (de Waal et al., 1991). La IL-10 inhibe la producción de varios mediadores inflamatorios en monocitos/macrófagos, incluyendo IL-1 α , IL-6, IL-8, el factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y TNF- α (de Waal et al., 1991; Fiorentino et al., 1991 & Bogdan et al., 1991). La acción exógena de IL-10 suprime la síntesis de IL-10 por macrófagos y monocitos (de Waal et al., 1991), sugiriendo una regulación negativa feedback de la

producción IL-10 derivada de monocitos. Además IL-10 suprime la producción del óxido nítrico (Bogdan et al., 1991), metabolitos intracelulares que están involucrados en la eliminación de parásitos intra y extracelulares. IL-10 no suprime completamente la síntesis de proteínas de monocitos y macrófagos, así esta citocina no afecta la expresión constitutiva del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y éste sobregula la expresión del receptor IL-1 (IL-1ra), un importante regulador de reacciones inflamatorias (Howard & O'Garra, 1992).

CITOCINAS EN CANCER CERVICAL

La respuesta inmune de tipo celular contra las infecciones producidas por HPV esta regulada por las subpoblaciones Th1 y Th2 y sobre los productos de los genes de citocinas que son producidos por estos tipos celulares. En varios modelos tumorales se ha determinado que hay una preferencial producción de citocinas proinflamatorias e inmunosupresoras facilitando el crecimiento tumoral. Particularmente en cáncer cervical hay varios estudios donde reportan el patrón de citocinas en cáncer cervical. Clerici y colegas, 1997; determinaron el patrón de citocinas liberadas por células de sangre periféricas PBMC después de la estimulación con antígenos de influenza, APCs alogénicas o mitógenos, en pacientes con infección con HPV extensiva y de tipo localizado. Encontrando niveles bajos de la citocina IL-2 en los pacientes con la enfermedad extensiva comparado con la de tipo localizado, además se encuentran niveles elevados de la citocinas IL-4 y IL-10 en los pacientes con enfermedades extensivas en comparación con los de tipo localizado y los controles. Estos resultados indican que la producción de las citocinas IL-4 e IL-10 están asociadas con la supresión de la inmunidad mediada por células (Wu et al., 1997). Adicionalmente nuestro grupo ha encontrado que hay una preferencial expresión de las citocinas IL-10 y TGF- β en muestras de pacientes en estadios avanzados del CaCU. Particularmente hemos determinado que la expresión de la IL-10 es directamente proporcional al desarrollo del cáncer cervical en presencia de papilomavirus humano (Bermúdez, 1997). Estos resultados indican que existe una relación directa entre la presencia de HPV y la expresión de IL-10 en las células epiteliales del cerviz del tal manera, que sugiere fuertemente que es el HPV el responsable de la inducción de estas citocinas inmunosupresoras, por lo que se proponen que algunas proteínas vírales, principalmente E2, pueden ser las responsables de regular la expresión de dicha citocina. Esto es apoyado por la existencia de un elemento de respuesta a la proteína E2 de papilomavirus presente en la posición 5' distal de la región reguladora del gen de la IL-10 (Kube et al., 1995). Dicho mecanismo puede representar una alternativa de evasión de la respuesta inmune inducida por HPV para favorecer el proceso de carcinogénesis cervical. De esta manera se pueden establecer estrategias para modular o bloquear su expresión en diferentes estadios de la malignidad.

IMPORTANCIA

Ante la problemática actual del cáncer de cérvix, varios estudios están enfocados en relación al entendimiento de la respuesta inmune local del huésped contra las células tumorales y los mecanismos de evasión de la respuesta inmune. La expresión de la IL-10 por las células infectadas con el virus de papiloma humano, favorecen un estado de inmunosupresión en el sitio de la infección, provocado la inactivación de las subpoblaciones celulares involucradas en la respuesta inmune antitumoral. Por tal motivo es de mucha importancia estudiar el posible mecanismo por el cual el virus del papiloma humano esta involucrado en la expresión de esta citocina. El entendimiento de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune inducida por el HPV durante el proceso de carcinogenesis cervical, nos permitirá desarrollar nuevas alternativas para el tratamiento de esta neoplasia.

ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACION

Debido a que el cáncer cervical es una neoplasia que es altamente prevalente en la población femenina y que aproximadamente 12 personas mueren al día a causa de esta neoplasia en México, es necesario realizar investigaciones en torno a los factores que están involucrados en el desarrollo de la malignidad, involucrando al HPV y alteraciones del sistema inmune durante el desarrollo de la malignidad. Este trabajo de investigación es una continuación de los resultados obtenidos del trabajo experimental de licenciatura, en el cual se determino por RT-PCR que la expresión de la interleucina 10 es directamente proporcional al desarrollo del cáncer cervical asociado al virus de papiloma humano (HPV), y donde se plantea que el HPV puede ser el responsable o esta involucrado en la expresión de esta citocina. Además esto es apoyado por la existencia de un elemento potencial de respuesta a la proteína E2 de HPV, localizado en la región 5' distal de la región reguladora del gen de la IL-10. Por lo tanto en el presente trabajo se trato de determinar si el virus de papiloma humano es capaz de regular la expresión de IL-10 por medio de la proteína E2, así se comprobó que esta proteína tiene la capacidad de reconocer a la secuencia de unión a E2 de HPV y que esta es capaz de transactivar al gen de IL-10 humano (hIL-10). Estos resultados nos permitiran diseñar mejores alternativas de inmunoterapia contra cáncer cervical.

HIPOTESIS

Debido a que existe una asociación entre la expresión de IL-10 y la presencia del virus del papiloma humano (HPV) en cáncer cervical y a la existencia de un elemento de respuesta a E2 de papilomavirus en la región 5' distal de la región reguladora de IL-10, es probable que el HPV sea capaz de regular la expresión de IL-10.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel del virus de papiloma humano (HPV) en la inducción de la expresión de la interleucina 10 (IL-10).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Amplificar la región reguladora del gen de la interleucina 10 (IL-10) por PCR y clonar el producto amplificado en el vector pGL-2 vector, el cual contiene el gen de la luciferasa como gen reportero.
- Realizar deleciones de la región 5' no codificante del gen de IL-10 basada sobre los elementos de regulación transcripcional presentes en la secuencia.
- Subclonar las deleciones de la región reguladora de IL-10 en el vector pGL-2 vector para posteriormente realizar análisis de funcionalidad.
- Realizar análisis de funcionalidad, transfectando y co-transfectando la línea celular C33-A con la construcciones realizadas y el vector pCMV16E2 el cual codifica la proteína E2 de HPV 16 y analizar la expresión del gen de luciferasa.
- Determinar si el elemento de respuesta a E2 presente en la región reguladora es reconocido por la proteína de E2 de HPV y además, de ser capaz de transactivar al gen de la luciferasa.
- Obtención de la proteína recombinante E2 de HPV 31, por medio de un sistema de purificación por afinidad a GST.
- Mediante un ensayo de electroforesis de movilidad retardada (EMSA) determinar si la proteína E2 de HPV es capaz de reconocer el elemento de respuesta a la proteína E2 presente en la región reguladora de IL-10, utilizando la proteína E2 purificada y extractos nucleares de células HeLa y C33-A.

REACTIVOS Y EQUIPO

PLASMIDOS

pGEM-T (Promega)

pGL-2 vector (Promega)

pGL-2 Basic (Promega)

pET-22b (Novagen)

pCMV-16E2 y pC18Sp1-Luc (Donado por Dr. Veress, Depto. de Microbiología, Escuela de Medicina, Universidad de Debrecen, Hungría)

pGEX-31E2 (Donado por el Dr. Laimins, Depto. de Microbiología, Escuela de Medicina, Universidad de Northwestern Chicago, IL)

CEPAS BACTERIANAS

E. coli: DH5 α , JM109 y BL21.

ENZIMAS

Taq DNA Polimerasa (Life Technologies)

Enzimas de restricción: *Sma I*, *Xba I*, *Xho I*, *Kpn I*, *Hind III*, *Hae III*, *Dra I*,

Nco I, *Sac I*, *Sst I*, *Bgl II*, *BamH I*, *EcoR V*, *Pst I* (Life technologies, Biolabs)

T4 DNA polinucleótido cinasa (Life Technologies)

T4 DNA ligasa (Life Technologies)

DNA polimerasa I, Fragmento largo (Klenow) (Life Technologies)

Mung Bean Nucleasa (Life Technologies)

LINEAS CELULARES

C-33: HPV negativa, mutaciones en p53 R273 a C y pRB en el exon 20

HeLa: HPV-18, p53 y pRB wild type

REACTIVOS

[γ -³²P]-dATP (300Ci/mmol a 10 mCi/ml) (Dupont)

Azúl de Bromofenol (SIGMA)

Acilamida (Life Technologies)

Ampicilina 250 mg/ml (SIGMA)

Anticuerpo polivalente anti humano marcado con peroxidasa (SIGMA)

Azúl de Commasi R-250 (SIGMA)
Bis-acrilamida (Life Technologies)
BSA (Albumina bovina) (SIGMA)
Bromuro de etidio (SIGMA)
dNTPs 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Perkin Elmer)
Ficol 800 (SIGMA)
Fijador (KODAK)
Glicerol (Life Technologies)
Inhibidores de proteasas: Aprotinina, PMSF (Phenilmetilsulfonilfuorida), Aprotinina
IPTG (Isopropil-1-thio- β -galactopyranosido) (Life Technologies)
Rectivo de lipofectamina plus (Life Technologies)
Marcador de peso moléculal λ -Hind III y ϕ X 174 RF DNA/Hae III (Life Technologies)
Marcador para proteínas MW-SDS 70L (SIGMA)
Medio LB (Life Technologies)
2-Mercapto etanol (SIGMA)
Membranas de nitrocelulosa
NP-40 (Nonidet P-40)
Papel filtro
Films para autoradiografía Kodak
Placas de ELISA
Poli dl-dC (Farmacia)
Reactivo de Bradford (BioRad)
Revelador (KODAK)
Sales: APS, DTT, EDTA, EGTA, HEPES, Tis base, MgCl₂, NaCl, Tris- HCl, KCl,
SDS (Lauril sulfato de sodio)
Sepharex G-25 (SIGMA)
Solventes: Acido acetico, Metanol,
Spermidina (SIGMA)
TEMED (Life Technologies)
X-gal (Life Technologies)
Xilen cianol (SIGMA)

KITs

Ready Pak. Sistema para purificar proteínas fusionadas a GST (Pharmacia)

pGEM-T and pGEM-T Easy vector systems (Promega)

Luciferase Reporter Gene Assay (Boehringer)

Protein Assay Formats (Bio-Rad) *

Gen clean-II (BIO101)

EQUIPO

Contador Gayger, Modelo Pug IAB, Technical Associates

Termociclador MJ Research modelo PTC-200

Cámara de Electroforesis: Gel-Vertical modelo V16-2 (Life Technologies)

Workshield-acrílico (Stratagene)

Homogenizador para células

Sintetizador de oligonucleótidos "Applied Biosystems DNA Synthetizer"

Espectrofotómetro (UV) DU-7 (BECKMAN)

Lector de ELISA, Labsystems Mulyiskan MS

Fuente de poder para electroforesis (BIORAD)

Secador de Geles (LABCONCO)

Casset, Cronex Intensifying Screens

Luminómetro (AUTOCOP I).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MÉTODOS

DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS

Basados sobre la secuencia del promotor de hIL-10 reportada por Kube y cols. en 1995 (Kube et al., 1995) y sobre la secuencia del gen de IL-10 humano reportado en el Gen Bank (número de acceso: HSU 16720), y con la ayuda del programa Primer Selection, se diseñó un par de oligonucleótidos para amplificar la región reguladora del gen de IL-10 humano. El primer SENTIDO: IL-10XbaI (5'-TTTTCTAGATACCTCCCTTCTCCCTGAC-3', nt 1514-1535) y el primer ANTISENTIDO: IL-10XhoI (5'-TTTCTCGAGATCTCGAAGCATGTTAGGC-3', nt 4167-4188); los extremos 5' de cada oligonucleótido se le añadió un sitio de reconocimiento para las enzimas *Xba I* y *Xho I* respectivamente, para facilitar su donación (Tabla 6).

AMPLIFICACION DE LA REGION REGULADORA DEL GEN DE IL-10

Un μg de DNA de células HeLa se utilizó como templado para amplificar un fragmento de 2675 pb en presencia de buffer de amplificación 10X (200 mM de Tris-HCl pH 8.4, 500 mM de KCl), 2 mM de MgCl_2 , 200 mM de dNTPs, 2U de Taq DNA Polimerasa y 30 pmol de cada oligonucleótido, en volumen final de 50 μl . La reacción se amplificó en un DNA Thermal Cycle 480 (JM Research) por 40 ciclos. Cada ciclo consistió de una fase de desnaturalización a 95 °C por 1 min., una fase de alineamiento de 62 °C por 1.5 min. y un paso de extensión a 72 °C por 5 min. El amplificado se corrió en geles de agarosa al 1% y se visualizó por medio de bromuro de etidio bajo luz UV.

El producto amplificado fue comprobado por medio de un análisis de restricción de la región amplificada. Diez μl del amplificado se digirió con las enzimas de restricción *Dra I*, *Hind III* y *Nco I* por 3 hr y se separaron en geles de agarosa al 1.5%. El patrón de restricción se verificó de acuerdo con los productos esperados: *Dra I* (1531 pb y 1144 pb), *Hind III* (1556 pb, 906 pb y 213 pb) y *Nco I* (1197 pb, 998 pb y 480 pb). Adicionalmente el producto amplificado se confirmó por medio de secuenciación. El producto de PCR fue donado en el vector pGEM-T (Promega), este se utilizó junto con el primer sentido en una reacción de secuenciación automatizada, secuenciando aproximadamente 500 pb, en un equipo ABIPRISM, modelo 310. La secuencia obtenida coincidió con la secuencia reportada en el gen bank.

CLONACION EN EL VECTOR pGEM-T

Dos reacciones de PCR de 50 μl de volumen, fueron separadas en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en buffer TAE 1X. La banda que contenía el amplificado fue separada del resto de la agarosa y el fragmento fue purificado por medio de Gen Clean II. El DNA fue cuantificado con un espectrofotómetro DU/40

(Beckman). La reacción de ligación contenía 30 ng del DNA purificado, 50 ng del vector pGEM-T vector (Promega), 5 µl de buffer rápido de ligación, en presencia de 3 unades/µl de T4 DNA Ligasa. La reacción se incubó 1 hr a temperatura ambiente; la reacción se utilizó para transformar células JM109 calcio competentes, a un choque-térmico de 42°C durante 1 min., inmediatamente se colocan a 4°C. La reacción se incubó 30 min. en presencia de 300µl de medio LB a 37 °C. 100 µl del cultivo de transformación se creció en cajas de cultivo LB agar con 100 mg/ml de ampicilina, 0.5 mM de IPTG y 80 µg/ml de X-Gal. Se incubó a 24 hrs y se seleccionaron las colonias blancas que contienen el inserto, generando así la construcción pGEM-T/IL-10. Para corroborar el inserto, se cultivo la bacteria y se purificó el plásmido (Mini-prep), este se corrió en geles de agarosa al 1 % y se digirió con las enzimas *Xba I* y *Xho I* para liberar el inserto.

SUB-CLONACION DE LA REGION REGULADORA DE hIL-10 EN pGL-2 BASIC

La región reguladora de hIL-10 fue donada en el sitio único *Xho I* del vector pGL-2 vector basic (Promega). Un fragmento de DNA de aproximadamente 2675 pb fue liberado y purificado de la construcción pGEM-T/IL-10, con las enzimas *Xba I* y *Bgl II*, esta región fue subclonada en el vector PET en los mismos sitios de donación, generando la construcción pET/IL-10. Apartir de esta construcción la región reguladora de hIL-10 fue liberada en el sitio único *Xho I* y fue donada en el mismo sitio en el vector pGL-2 vector basic (Promega), generando la construcción pGL-2/IL-10. De esta manera la expresión del gen de liciferasa (gen reportero del vector pGL-2 vector basic) está sobre la influencia del promotor del gen de hIL-10.

ANALISIS DE DELECCIONES DE LA REGION REGULADORA DE hIL-10

Diferentes regiones deleciones fueron generadas apartir de la secuencia completa y un análisis de los elementos de regulación transcripcional presentes en la región 5' no codificante del gen de hIL-10. Se generaron dos deleciones. A partir de la construcción pGL-2/IL-10 (construcción A, región completa), se digirió el plásmido con las enzimas *Sma I* y *Pst I*, liberando un fragmento de 493 pb que contiene el elemento de respuesta E2, el resto del plásmido fué purificado por Gen Clean II, posteriormente fue digerido con la enzima Mung Bean nuclesa (Life Technologies), la cual rompe cadenas sencillas de DNA, generando extremos romos. El vector fue religado en presencia de T4 DNA ligasa, generando la construcción pGL-2/IL-10B, la cual se comprobó con los sitios internos *Dra III* y *Bgl II*. La siguiente construcción se generó considerando solo los elementos de transcripción basal del promotor de hIL-10, así un fragmento de DNA 1436 pb fue obtenido de la construcción pGEM-T/IL-10 digerida con las enzimas *EcoR V* y *Xho I*, tal fragmento fue donado en el vector pGL-2 basic, en los sitios *Sma I* y *Xho I* y de esta manera se obtiene la construcción pGL-2/IL-10C. Todas las construcciones fueron analizadas a partir de minipreparaciones rápidas reportadas por Liska y Ruprecht, 1988 y por el análisis de restricciones de las

construcciones de sitios internos. De esta manera se obtuvieron tres construcciones: pGL-2/IL-10A con la secuencia de la región reguladora de IL-10, pGL-2/IL-10B sin el elemento de respuesta a la proteína de E2 de HPV y pGL-2/IL-10C con los elementos de transcripción basal del promotor de hIL-10.

CULTIVO DE LINEAS CELULARES

Las líneas celulares HeLa y C-33A fueron cultivadas en medio modificado Eagle's Dulbecco's (DMEM), suplementado con 10% de suero bovino fetal (Life Technologies) y 10 μ g/ml de penicilina, 10 μ g/ml de estreptomicina y 2.5 % de anfotericina B incubadas a 37°C, con 95% de humedad y 5% de CO₂. Una vez alcanzadas las células en monocapa fueron separadas con 0.25% de tripsina/0.02% EDTA y cuantificadas con un contador de flujo en un espectrofotómetro en una dilución en medio a 37°C y preparadas para sub-cultivos.

TRANSFECCION EN CELULAS C33-A

Durante la transfección las células C33-A fueron cultivadas con DMEM sin suero y antibiótico. Cuando alcanzaron una densidad de aproximadamente 2×10^5 células/ml fueron cultivadas en cajas de 35 mm hasta alcanzar una confluencia del 50 al 70% (entre 20 a 25 hrs). La transfección se realizó por medio de Lipofectamina Plus (Life Technologies) en un volumen final de 2 ml. 2 mg de DNA de cada vector, purificado con Wizard plus maxi-preps (Promega) fue diluido en 100 μ l de medio DMEM sin suero y antibiótico, simultáneamente 10 μ l de Lipofectamina plus (Life Technologies) fue diluido en 100 μ l de medio DMEM sin suero y antibiótico, ambas reacciones fueron mezcladas durante 30 min. a temperatura ambiente, formando un complejo Lipofectamina-DNA plasmídico. Esta reacción fue añadida al cultivo y se agitó suavemente a poco con movimientos suaves sobre todo el cultivo. Posteriormente se incubó a 37 °C y con 5% de humedad relativa durante 24 hrs. Transcurrido el tiempo de transfección, se retiró el medio y se resuspendió con medio fresco, y se sembró en una nueva placa nuevamente. La actividad del gen reportero se cuantificó a las 48 hrs después de la transfección. Como controles se utilizaron los vectores pGL-2 control (Promega), el cual contiene el enhancer del virus de SV40 y el vector pSP1-luc, el cual contiene cuatro elementos de respuesta a la proteína E2 de HPV y dos elementos de respuesta a la SP1, como controles positivos para la reacción de transfección. El vector pGL-2 basic, fue utilizado como control negativo. Adicionalmente se realizaron cotransfecciones con las construcciones en estudio: pGL-2/IL-10A, pGL-2/IL-10B, pGL-2/IL-10C, y el vector pCMV-16E2 este último expresa la proteína E2 de HPV 16.

CUANTIFICACION DE LUMINISENCIA

La determinación de quimioluminiscencia se realizó por medio del Kit Luciferasa Reporter Gene Assay (Promega). Una vez realizada la transfección, las células fueron lavadas con PBS 1% dos veces, y fueron lisadas con un buffer de lisis. Las células solubilizadas fueron centrifugadas a revolución máxima durante 10 seg. El

PREPARACION DE EXTRACTOS NUCLEARES

Los extractos nucleares fueron preparados de acuerdo al método de Digman 1983., a partir de las líneas celulares C-33A y HeLa. Las células en cultivo fueron cosechadas y lavadas con PBS 1%, se colectaron por centrifugación a 4 °C por 5 min. y se resuspendieron en 5 ml del buffer A frío, el cual contiene: 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF y 4 mg/ml de inhibidores de proteasas; aprotinina, leupeptina y pepstatina, el resuspendido celular se homogenizó y se separaron las proteína citoplásmicas por medio de centrifugación a 4°C. El paquete nuclear fue resuspendido en el buffer B (20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF y 4 mg/ml de inhibidores de proteasas) y nuevamente se lizo en un homogenizador. El lisado fue centrifugado a 14 000 rpm durante 50 min. 4°C donde se obtuvieron la proteínas nucleares. La concentración de proteínas se cuantificó de acuerdo al método descrito por Bradford, 1976. Los extractos nucleares se almacenaron en alícuotas a – 70 °C hasta su utilización.

SINTESIS Y MARCAJE DE OLIGONUCLEOTIDOS CONSENSO E2

Se utilizaron tres oligos específicos con la secuencia de reconocimiento por la proteína E2, dos reportados por Ushikai y cols, 1994. El primero localizado en la posición 50-61 del LCR de HPV16: 5'-TGAACCGAAACCGGTTAG-3' designado E216. El segundo corresponde a la secuencia consenso del elemento de respuesta a E2 para papilomavirus, 5'-TCGACCGAT ATCGGTCGA-3' designado E2HPV, y el presente en la posición 5' distal de la región reguladora del gen de hIL-10, 5'-ATAACCACGTAGGGTTGC-3' designado E2IL-10 (Tabla 6). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Operon Technologies, Inc. y por Integrated DNA Technologies, Inc. y todos fueron hibridados con su cadena complementaria a fin de quedar de doble cadena. Adicionalmente se utilizó un fragmento de DNA 209 pb el cual contiene el elemento de respuesta a E2 presente entre la posición 284 y 493 de la región reguladora del gen de hIL-10. Este fue liberado de esta región con las enzimas *Sac I*/*Pst I* y purificado por medio de GenClean II y fue denominado E2A.

Los oligonucleótidos y el fragmento de DNA fueron marcados radioactivamente con [gama-³²P]-dATP en el extremo 5'-OP₄, 100 ng/μl de DNA de doble cadena se marco con 2 μl de [gama-³²P]-dATP 3,000 Ci/mmol y 10 U/μl de T4 polinucleótido cinasa a 37°C por 2 hrs. La sonda marcada fue purificada por medio de una columna de Sephadex G-25 y eluida con TE 1%.

ELECTROFORESIS DE MOVILIDAD RETARDADA (EMSA)

La reacción de unión DNA/proteína se realizó con 5 μg de extracto nuclear y 5 μl de la sonda marcada con [gama-³²P]-dATP en presencia de buffer 1X para band shift (HEPES 250 mM, MgCl₂ 50 mM y 340 mM KCL), 100 ng/μl de poli dl-dC, 15 mM de MgCl₂ y 5% de glicerol; la reacción se incubó a temperatura ambiente por 15 min.

Los complejos formados DNA/proteína fueron identificados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 4.5 % con bajas concentraciones iónicas de TBE. Los geles fueron pre-corridos por 30 min. a 150 volts y la electroforesis se realizó a 200 volts por 2 hr a 4°C con buffer TBE 0.5%. Los geles fueron transferidos a un papel filtro y secados en un secador de geles (LABCONCO) y se expusieron a películas radiográficas en cassetes con pantalla intensificadora por 24 a 48 hrs a -70 °C; posteriormente fueron revelados los complejos formados. En el ensayo se utilizó como control negativo, una reacción sin extractos nucleares y una con extractos nuclear sin poli dI-dC como control positivo, así mismo se manejaron concentraciones graduales de poli dI-dC para las reacciones. Para el caso de la proteína GST-E2 purificada, se utilizaron 5 µg de la proteína-quimérica y 5 µl de las sondas marcadas, bajo las mismas condiciones anteriores.

TABLA 6: SECUENCIA DE OLIGONUCLEOTIDOS

ORIGEN		OLIGO	SECUENCIA
AMPLIFICACION ¹ hIL-10	SENTIDO:	IL-10XbaI (1514-1553)	5'-TTTCTAGATACCTCCCTCTCCCTGAC-3'
	COMPLEMENTARIA:	IL-10XhoI (4167-4188)	5'-TTTCTCGAGATCTCGAAGCATGTTAGGC-3'
E2 EN LCR DE ² HPV 16	SENTIDO:	E216 (50-56)	5'-TGAACCGAAACCGGTTAG-3'
	COMPLEMENTARIA:	E216c	3'-ACTTGGCTTTGGCCAATC-3'
E2 CONSENSO ² PARA HPV5	SENTIDO:	E2HPV	5'-TCGACCGAT ATCGGTCGA-3'
	COMPLEMENTARIA:	E2HPVc	5'-AGCTGGCTATAGCCAGCT-3'
E2 EN PROMOTOR hIL-10	SENTIDO:	E2IL-10	5'-ATAACACGTAGGGTTGC-3'
	COMPLEMENTARIA:	E2IL-10c	5'-TATTGGTGCATCCCAACG-3'

¹ Oligos para amplificar la región reguladora de hIL-10.

² Oligos para los EMSA del elemento del respuesta a E2, (Ushikai et al., 1994).

RESULTADOS

Con el propósito de establecer la participación de la proteína E2 del virus del papiloma humano como la vía de la inducción de la IL-10 en cáncer cervical, se analizó si esta proteína es capaz de transactivar al gen de IL-10 reconociendo el elemento de respuesta a E2 presente en la región distal de la región reguladora del gen de IL-10. Para esto se amplificó y se donó la región reguladora del gen de IL-10 en el vector pGL-2 basic (Promega), que contiene el gen de luciferasa como gen reportero, posteriormente se realizaron ensayos de funcionalidad transfectando células C33-A junto con el vector pCMV-16E2, el cual contiene el ORF de E2 de HPV16 y dos deleciones de tal región clonada en el mismo vector. Adicionalmente el reconocimiento del elemento de respuesta a E2 presente en la región reguladora de IL-10 se estableció por medio de ensayos de electroforesis de movilidad retardada (EMSA), utilizando la proteína E2 purificada de HPV 31 y sondas marcadas radioactivamente conteniendo la secuencia de interés.

AMPLIFICACION DE LA REGION REGULADORA DE IL-10

Para poder amplificar esta región se basó en la secuencia del promotor de hIL-10 reportado por Burke y cols, 1995, posteriormente esta región fue identificada dentro de la secuencia completa del gen de IL-10 humana del gen bank (Número de acceso: HSU16720). Por medio del programa Primer Selection se diseñaron un par de oligonucleótidos que delimitaran esta región, tomando en cuenta el contenido de GC, el apareamiento entre el mismo oligo y entre ambos oligos, además en los extremos 5' de cada oligonucleótido se les adicionó un sitio de reconocimiento para las enzimas de restricción *Xba I* y *Xho I* para facilitar la clonación de la amplificación. Los oligos diseñados se reportan en la tabla 6, correspondiendo a las posiciones: Sentido: IL-10Xba I, nt 1514–1535 y el antisentido: IL-10Xho I, nt 4167–4188 (Figura 13, 14A), de la secuencia reportada del genbank del gen hIL-10. ®

Debido a que la línea celular HeLa expresa bajas cantidades de la IL-10, se utilizó 1 µg del DNA de esta célula como templado para amplificar la región reguladora de IL-10 cuyas condiciones de amplificación son reportadas en el método. El producto amplificado obtenido fue de un peso molecular de 2675 pb (Figura 14B), correspondiendo al tamaño del producto esperado según el patrón de restricción del amplificado con las enzimas de restricción, *Dra I* (1531 y 1144 pb esperados), *Hind III* (1556, 906 y 213 pb esperados) y *Nco I* (1197, 998 y 480 pb esperados) (Figura 15), según el análisis de restricción de tal secuencia. Adicionalmente para verificar que se trataba de la secuencia amplificada, la región fue secuenciada por medio de un sistema automatizado. Para realizar la secuencia, primeramente el producto amplificado fue donado mediante un sistema de vector T, utilizando al vector pGEM-T (Promega). La construcción obtenida (pGEM-T/IL-10) fue sometida a secuenciación automatizada basada en amplificación con el oligo sentido del amplificado original. Las primeras 530 bases de la secuencia obtenida (Figura 16) muestra dos inserciones de G y A respectivamente en las posiciones 364 y 460 de la

secuencia y correspondiendo a las posiciones 1906 y 2002 de la secuencia del gen de hIL-10 del genbank. Las mutaciones obtenidas no se localizan entre las posiciones 1843 y 1854 de la secuencia del genbank donde se ubica el elemento de respuesta a E2 de papilomavirus (Figura 13), por lo tanto no se afecta la unión de la proteína E2 a su secuencia blanco y su acción transactivadora de la proteína.

Adicionalmente se realizó un análisis con el programa Promotor San II de la región amplificada para identificar secuencias potenciales de reconocimiento para factores de transcripción (Figura 17). Donde se verificó el elemento de respuesta a E2 (ACCN₆GGT), además de localizarse secuencias adicionales previamente reportadas por Kube, tales como: 3 cajas TATA (TATAA), 2 cajas CAAT (CCAAT), 13 cajas PU (GAGAA), 4 secuencias de respuesta a glucocorticoides (GRE) (AGAACA) y secuencias identificadas no reportadas, como: un elemento de respuesta a AMPc (ACCTCA), 3 sitios de unión a CBP, CTF/NF-1 (CCAAT), 6 secuencias inducidas por INF (AAAGGA) y varias secuencias ricas en GC (CACCC) (Figura 17). Tales secuencias pueden ser reconocidas por factores celulares y posteriormente se plantea que algunas de ellas pueden ser reconocidas por proteínas de HPV.

CLONACION DE LA REGION REGULADORA DE hIL-10 EN EL VECTOR pGL-2.

Para poder clonar esta región se uso del vector pGEM-T, dado que durante la amplificación por PCR, la Taq DNA polimerasa adiciona a los extremos de cada hebra de DNA amplificada una adenina (A), la adición de este nucleótido facilita la clonación del producto amplificado por medio del sistema Vector T. De esta manera sé clono la región reguladora de IL-10, creando la construcción pGEM-T/IL-10 (Figura 18A). Esta construcción se verificó liberando el inserto, con las enzimas de restricción *Xba* I y *Xho* I localizados en los extremos 5' de los oligonucleótidos con los cuales se amplificó la región reguladora (Figura 18B). Adicionalmente también se realizo una segunda PCR de esta clona, debido a que la construcción generada partio de un producto de PCR (Figura 18).

Debido a que los sitios del polylinker del vector pGL-2 vector basic (Promega), no son del todo compatible con los de la región reguladora de IL-10, se decidió subclonar esta región de la construcción pGEM-T/IL-10 en el vector pET (Novagene), Así se libero el inserto de la construcción pGEM-T/IL-10 con los sitios (*Xba* I y *Bgl* II), y fue clonada en el vector pET generando la clona pET/IL-10. La construcción, de igual modo fue verificada liberando el inserto y con una reacción de PCR. De esta construcción se libero la región reguladora con el sitio único *Xho* I, el cual fue purificado y subclonado en el vector pGL-2 basic (Promega) en el mismo sitio, generando la construcción que contiene la región reguladora completa del gen de IL-10 humano, la cual se denominó pGL-2/IL-10A. (Figura 19).

ANALISIS DE DELECCIONES DE LA REGION REGULADORA DE hIL-10

Con el fin de determinar si el elemento de respuesta a la proteína E2 de papilomavirus presente en la posición 5' distal (nucleótidos 1843 y 1854) de la región reguladora de hIL-10, esta involucrado en regular la

expresión del gen de IL-10 en cáncer cervical, se decidió realizar una deleción en la posición donde se localiza el elemento de respuesta a E2, esta deleción se realizó digiriendo la construcción pGL-2/IL-10A con las enzimas *Sma I* y *Pst I*, liberan un fragmento de DNA de 493 pb conteniendo el elemento de respuesta a la proteína E2. El vector obtenido fue purificado y sometido a la digestión con la enzima Bung Bean nucleasa (Life Technologies) la cual genera cadenas de DNA con extremos cohesivos; el plásmido fué nuevamente purificado y religado en presencia de T4 DNA ligasa, generando la construcción pGL-2/IL-10B, la cual contiene la región reguladora de IL-10 sin elemento de respuesta a E2, la cual fue corroborada con un sitio interno *Dra III* y *Bgl II* (Figura 20).

Apartir del análisis para identificar secuencias potenciales de reconocimiento por factores de transcripción de la región reguladora de IL-10, se identificó que exactamente a la mitad de la región generada por PCR, dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción, se localizan todos los elementos de transcripción basal del promotor de IL-10; por lo tanto se decidió realizar una construcción que contuviera dichos elementos, así se genero la construcción pGL-2/IL-10C, a partir de la construcción pGEM-T/IL-10, esta se digirió con las enzimas *EcoR V* y *Xho I*, liberando un fragmento de 1436 pb, el cual fue clonado en el vector pGL-2 vector basic, en los sitios *Sma I* y *Xho I* (Figura 20).

De esta manera se generaron tres construcciones: pGL-2/IL-10A, conteniendo la secuencia completa de la región reguladora del gen de IL-10, pGL-2/IL-10B, la región reguladora, sin el elemento de respuesta a E2 y la construcción pGL-2/IL-10, conteniendo solo los elementos de transcripción basal del promotor de hIL-10. Las construcciones obtenidas contienen el gen de luciferasa como gen reportero, de esta manera la expresión del gen de lucifera esta regulado por un secuencia promotora del gen de IL-10 humana (Figura 21).

ANÁLISIS DE SECUENCIA DE RESPUESTA DE E2 EN EL PROMOTOR DE IL-10 POR EXPRESION DE LUCIFERASA

Para determinar el papel transactivador de la proteína de E2 sobre la región reguladora de IL-10, se realizaron análisis de funcionalidad transfectando la línea celular C33-A con las construcciones realizadas, dado que esta línea celular de origen epitelial es HPV negativa, se realizaron cotransfecciones con el plásmido pCMV-16E2, el cual contiene el marco de lectura abierta del gen E2 de HPV 16, por lo tanto al realizar las dobles transfeciones en las células C33-A, se tendrá tanto el plásmido de contenga la región reguladora de IL-10 y la expresión constitutiva de la proteína E2 de HPV 16. Por otro lado se manejaron dos controles positivos, es decir se transfecto con el plasmido pGL-2 control (Promega) el cual contiene el enhancer del virus de SV40, para determinar el fondo de la expresión de luciferasa y con el plasmido pC18SP1-Luc, el cual fue proporcionado por el grupo de Dr. Veress G, del departamento de Microbiología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Debrecen, Hungría; este plásmido contiene cuatro elementos de respuesta a la proteína E2 y un elemento de respuesta a SP1. Este vector fue usado

como un control positivo. Además se manejaron como controles negativos al vector pGL-2 basic sin inserto y a las células C33-A sin transfección.

Los valores de actividad del gen de luciferasa se muestran en la figura 21A y se reportan como unidades relativas de luz (URL) debido a que el luminómetro detecta la actividad del gen de luciferasa como fotones de luz, los cuales son convertidos a pulsos eléctricos para posteriormente ser transformados a URL. Las células C33-A sin transfección prácticamente no se registra luminisencia, de la misma forma cuando las células son transfectadas con el vector pGL-2 vector (sin promotor) se registran valores muy bajos de luminisencia (84 URL), aún y cuando esta presente el gen de luciferasa a las células C33-A, sin embargo, este gen carece de región promotora para su regulación, estos valores permanecen constantes aún con la cotransfección con el vector pCMV16E2. No obstante, cuando las células son transfectadas con el vector pGL-2 control, se registran 38593 URL, y estos valores no varían significativamente en presencia de la proteína E2 de HPV 16 (35287 URL). Una transfección adicional fue usada como control de transfección, cuando las células C33-A son transfectadas con el vector pC18SP1 se registran niveles bajos de luminisencia (937.5 URL), sin embargo, cuando se cotransfecta con el vector pCMV16E2, la expresión del gen de luciferasa se aumenta hasta 11121027.5 URL, indicando que la proteína E2 presente es un transactivador muy potente (Figura 22). Los valores registrados nos indican la seguridad de la expresión de la proteína E2 y su actividad sobre su secuencia blanco, de tal manera que este ensayo nos demuestra la eficiencia del sistema utilizado, sin embargo, estos valores no se consideraron para ser comparados con la actividad del promotor de la hIL-10, debido a que los picos registrados de actividad de luciferasa son muy altos, y solo se consideraron los obtenidos con las transfecciones con los vectores controles: pGL-2 vector y control (Figura 22).

Los análisis de funcionalidad con las construcciones pGL-2/IL-10A, B y C, registran valores muy cercanos entre ellos, 79834, 79157 y 82050 URL respectivamente, y estos al ser comparados con los obtenidos de la transfección con el vector pGL-2 control (Figura 22) se registra un aumento del 200% de la actividad del gen de luciferasa indicando que la maquinaria de transcripción celular esta reconociendo los elementos de transcripción presentes en la región reguladora del gen de hIL-10. Sin embargo, cuando las células C33-A son cotransfectadas con el vector pCMV16E2, la expresión del gen de luciferasa se ve muy aumentada en la construcción pGL-2/IL-10A, 4330972.6 URL, 54.3 veces más que sin la presencia de la proteína E2 de HPV 16, lo que indica que la proteína E2 de HPV 16 es capaz de transactivar al gen de luciferasa bajo el elemento de respuesta a E2 presente en la posición 5' distal de la región reguladora de hIL-10. Sin embargo, en las construcciones pGL-2/IL-10B y C, se observa una baja de la actividad del gen de luciferasa, 43638.5 y 35689.5 URL respectivamente, representando una disminución el 45.5 y 56.5% en presencia de la proteína E2 (Figura 21).

PURIFICACION DE LA PROTEINA E2 RECOMBINANTE DE HPV 31

Para determinar el reconocimiento de la proteína E2 a su secuencia blanco presente en la región reguladora de IL-10, primeramente fué necesario obtener la proteína recombinante E2 recombinante, la cual se utilizó para realizar los análisis de unión DNA/proteína.

La proteína E2 fue purificada a partir de la clona pGEX-31E2, donada por el Dr. Laiminis L, la cual contiene donada la secuencia codificante del gen de E2 de HPV 31 (nucleótidos 2692-3835), en el sitio único *BamH I* del vector pGex-KG de proteína de fusión a glutatión-S-transferasa (GST). La característica de este vector, es la facilidad de purificación de proteínas fusionadas a GST, además de la posibilidad de inducción de tales proteínas de fusión con IPTG. La proteína quimérica purificada consta de la secuencia aminoacídica de la proteína de E2 y un polipéptido de 27 Kda, fusionada.

La construcción pGEX-31E2 fue digerida con la enzima *BamH I* y libero un fragmento de 1143 pb correspondiendo al ORF del E2 de HPV 31 (Figura 23). A partir de esta clona transformada en la cepa *E. coli* BL21, fue cultivada a 25°C hasta llegar a la fase logarítmica, tiempo al cual se indujo la expresión de la proteína quimérica GST-E2 con 0.1 mM de IPTG. Aliquotas de la estimulación fueron tomadas a diferentes tiempos y se separaron en geles reductores SDS-poliacrilamida al 12% (Figura 24A). Para verificar la expresión de la proteína quimérica se realizó un Western Blot, a partir de extractos totales de la proteína inducida con IPTG y utilizando sueros de pacientes positivos a HPV. El Western Blot muestra una banda con un peso molecular aproximado de 72 kDa (Figura 24B) correspondiendo a la proteína GST-E2 inducida con IPTG y no presente en las bacterias BL21 no transformadas con el plásmido pGEX-31E2.

Una vez inducida la proteína GST-E2, se purificó bajo el sistema GST Fusion System (Pharmacia), el paquete bacteriano derivado de un cultivo fresco (inducido con IPTG) a gran escala, fué lisado por sonicación, el lisado bacteriano se paso por una columna empaquetada con glutatión sefarosa 4B (Redi Pack GST) y después de varios lavados con PBS 1%, se liberó la proteína de fusión del glutatión en presencia de un buffer de elución. Varias muestras fueron tomadas del eluido y se corrieron en geles de poliácilamina al 12% (Figura 25). La proteína purificada muestra un peso moleculas de 72 KDa muy similar a la banda detectada en el Western Blot, tal proteína se almaceno a 4°C hasta su uso en los ensayos de EMSA.

ANALISIS DE ELEMENTOS DE RESPUESTA A E2 EN EL PROMOTOR DE IL-10 POR ENSAYOS DE ELECTROFORESIS DE MOBILIDAD RETARDADA

Antes de realizar los ensayos de electroforesis de movilidad retardada (EMSA), se extrajeron extractos nucleares de las líneas celulares C33-A (HPV -) y HeLa (HPV 18), los extractos fueron preparados a partir de cultivos

frescos según el método descrito por Digman, 1983. Los extractos nucleares fueron cuantificados por el método de Bradford y almacenados a -70°C en presencia de inhibidores de proteasas.

Las secuencias específicas para los análisis de EMSA se sintetizaron basados en la secuencia de respuesta a E2 presente en la región reguladora del gen de IL-10. Un oligonucleótido de 18 pb cuya secuencia se reportó en los métodos denominada como E2IL-10 fue utilizada como secuencia problema (Tabla 6). Adicionalmente se obtuvo un fragmento de DNA de 209 pb, la cual contiene el elemento de respuesta a E2 presente en la región reguladora de IL-10, liberada con las enzimas Sac I y Pst I a partir de la clona pGEM-T/IL-10. Esta región fue denominada E2A y también fue utilizada como secuencia problema.

Como controles positivos para los análisis, se utilizaron dos secuencias reportadas por Ushikai y cols 1994, una secuencia corresponde a uno de los elementos de respuesta a E2 presente entre las posiciones 50-61 del LCR de HPV 16, el cual fue identificado como E216, un oligonucleótido que contiene la secuencia consenso para del elemento de respuesta a E2 para los papilomavirus, el cual fue designado como E2HPV (Tabla 6).

Todas las secuencias fueron marcadas radioactivamente con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ en el extremo 5' de cada oligonucleótido y se matuvieron a -20°C hasta su uso. Las reacciones de unión DNA/Proteína se realizaron a temperatura ambiente y fueron corridas en geles de poliacrilamida al 4.5% y revelados por autoradiografía.

Primeramente se incubaron los oligos E2HPV y E2IL-10 con los extractos nucleares de células HeLa, donde se identifica la formación de un complejo que se localiza al mismo nivel en las dos secuencias utilizadas (Figura 26); Sin embargo, para el caso del oligo E2HPV, se forman dos complejos adicionales menos fuertes, para cual se realizó una competencia inespecífica para determinar si tales complejos formados son de tipo inespecífico. Así se utilizaron concentraciones graduales del competidor inespecífico poli dl-dC, determinando que a una concentración de 10 ng/ul se desaparecen los complejos adicionales, con lo que se determinan que tales complejos son de tipo específico; Sin embargo, la banda detectada inicialmente se mantiene constante a concentraciones elevadas de poli dl-dC (300 ng) (Figura 27). En la mismo ensayo se utilizó un oligonucleótido que contiene una secuencia E2, localizada en la región reguladora del gene de TGF- β , y aún en este oligonucleótido también se detecta la banda localizada en los oligos E2HPV y E2IL-10 (Figura 26).

Cuando se incubaba el oligo E216 y el fragmento que contienen el elemento de respuesta a E2 liberado de la región reguladora de IL-10, se identifican los mismos complejos detectados con los oligos E2HPV y E2IL-10 (Figura 28). En este ensayo se detectan dos posible complejos muy juntos, al aumentar la concentración de poli dl-dC para el oligo E2A desaparece uno y uno se mantiene constante, y en el caso de E216 se define con mejor claridad la formación de un solo complejo, estos complejos adicionales se pueden deber al exceso de oligo marcado, ya que al bajar la concentración del oligo solo se observa un solo complejo.

Un dato muy interesante se determina cuando se incuban todas los oligos con extractos nucleares derivados de células C33-A, las cuales son HPV negativas. En estos ensayos se determino que se forma un complejo al mismo nivel, el cual se mantiene constante aún aumentando las concentraciones del competidor inespecífico (Figura 29). Estos resultados establecen nuevas a los objetivos del trabajo, ya que se conoce que la línea celular C33-A es negativa a papilomavirus y teóricamente la secuencia utilizada en las sondas son específicas para la proteína E2, así que la alternativa sería que proteínas de origen epitelial tienen la capacidad para reconocer esta secuencia viral, aún cuando las secuencias utilizadas solo contienen la secuencia consenso ACCN₆GGT de E2 y las 6 bases internas son variables en todas los oligos manejados. Adicionalmente cuando se reviso la bibliografía para analizar si la línea celular HeLa expresa la proteína E2, se determinó que esta línea celular no expresa tal proteína viral, dado que el genoma de HPV 18 esta integrado al genoma celular y se rompe el ORF del gen de E2 cuando se integra. Por lo tanto, el complejo detectado con extractos nucleares de células HeLa no es la proteína E2 sino es una proteína de origen celular.

Adicionalmente cuando se utiliza la proteína quimérica GST-E2 purificada (GST-E2) y el oligo E2IL-10, se detecta un complejo de mayor peso molecular que los detectados con los extractos nucleares de células HeLa y C33-A (Figura 30), por un lado este complejo detectado es de mayor peso molecular debido a que la proteína E2 utilizada deriva de una fusión del gen E2 de HPV 31 y la proteína glutation acetil transferasa, de esta manera se registra un complejo de mayor peso molecular. Estos resultados demuestran que la proteína E2 de HPV 31 reconoce el elemento de respuesta a E2 presente en la región reguladora del gen de hIL-10.

1514

ACATACCTCCCTTCTCCCTGACATTTTGTATGTGTGTGTGTGTATTACACACACATC
TCATATAAGGAAATTGAAGGGAGGCTGCCTGCATCCCTGAGTCACTCTCCCTCTCCCTCT
GAATGCTTACCTGTGCCAGACCACCTCCTTAGCCTCGCACCCCTCCAGGCTTACAGGGCA
CTCTTCTATGCCATCCCAAGTATAGCTGATACCTTCCAAGGGCCAGACTTGGTGCTAAG
TACCAAGTACGCAAAGATTAATAAAACAATGTCTGTTCAGGGAGCTCAAAGCTGATTC
GGCAGGGCATGGTGTGTACATGAATGATAACCACGTAGGGTTGCAGGTTTCTAGTGAGG
TAAGCACAAGGCAAGATGGGAAACAAAGGAGGGGTTTACAGCCTCACCCAGAGTCC
AGAACCCTGGCCTGCCTGGTGCCCATGCTGAGTCCACTTCTGGAACACCCAGCTCAGAG
AGGGGGTTAGACCTGCAGGCTAACACAGACACAGCCAGAAAACCCAGGAGCCGAGGGGG
AAGGAGAAAGGTGCAAGAAGGGGAAACCCAGGTCCTGGTCCCCTTCTCTCTGCTTCTGG
CAGCAGAACTCAGACAGAACCCTTAAGCCAGTCTAAGTCTGGCAGGACCAGTAAGTTCTG
AGTTAGCTCCATACTAGTTTCTAGCAGGCTCTTTCTCACTTCCCTGATTCTTAGGTTTCTA
CATTGACACTCCCTGAAGAGTTGGGAAGAGACACCACAGTCCCCTGACCCTGATCCATAG
GTCACACAGCAGGGACATCCACAGGGTGACGTGGGCCCTCTCATCCCTCCCTCCACTCA
CTTCACGCTGGCTGGGCCCAAGGTGTTTGCACCCCTTGCAGTGAGTGACCTTCTCTAGT
GCAGCAAGCTCAGAACCTGCTGCCACTGGAGTTGTCCATTGCTGATGCAGAAAGGTGAA
GAACTAGCAGAACACTGGAAATGCCCTCCATCTGGGTCCATGGCTACTTAAGCTCAATGC
TCCCTGGCAGGCAGGAGGACAGGTGCTATTGCCCTGTTGGGACAGATGAAAAACAGACAC
AGGGAGGATGAGTGATTTGCCCTGACTATAGAGTGGCAGGGCCAAGCAGAGCCCAGGCCT
CCTGCACCTAGGTCAATGTTCTCCAGTTACAGTCTAAACTGGAATGCAGGCAAAGCCC
CTGTGGAAGGGGAAGGTGAAGGCTCAATCAAAGGATCCCCAGAGACTTCCAGATATCTG
AAGAAGTCTGATGCTACTGCCCGGTCCTTCCCAGGTAGAGCAACACTCCTCGCTGCA
ACCCAACCTGGCTCCCCTTACCTTCTACACACACACACACACACACACACACACACACA
CACACACACACAAATCCAAGACAACACTACTAAGGCTTCTTTGGGAGGGGGAAGTAGGGA
TAGGTAAGAGGAAAGTAAGGGACCTCCTATCCAGCCTCCATGGAATCCTGACTTCTTTTC
CTTGTATTTCAACTTCTTCCACCCCATCTTTTAACTTTAGACTCCAGCCACAGAAGCT
TACAACATAAAGAACTCTAAGGCCAATTTAATCCAAGGTTTCATTCTATGTGCTGGAGA
TGGTGTACAGTAGGGTGAAGAAACCAATPCTCAGTTAGCACTGGTGTACCCCTGTACAG
GTGATGTAACATCTCTGTGCCTCAGTTTGTCTACTATAAAATAGAGACGGTAGGGTTCAT
GGTGAGCACTACCTGACTAGCATATAAGAAGCTTTCAGCAAGTGCAGACTACTCTTACCC
ACTTCCCCCAAGCACAGTTGGGGTGGGGGACAGCTGAAGAGGTGGAACATGTGCCTGAG
AATCCTAATGAAATCGGGGTAAGGAGCCTGGAAACACATCCTGTGACCCCGCTGTCCCTG
TAGGAAGCCAGTCTCTGGAAGTAAAATGGAAGGGCTGCTTGGGAACCTTGAGGATATTT
AGCCACCCCTCATTTTTACTTGGGGAAACTAAGGCCAGAGACCTAAGGTGACTGCCT
AAGTTAGCAAGGAGAAGTCTTGGGTATTTCATCCAGGTTGGGGGACCCAATTATTTCTC
AATCCCATTGTATTCTGGAATGGGCAATTTGTCCACGTCAGTGTGACCTAGGAACACGCG
AATGAGAACCACAGCTGAGGGCTCTGCGGACAGAACAGCTGTTCTCCCCAGGAAATCA
ACTTTTTTTAATTGAGAAGCTAAAAAATTATTCTAAGAGAGGTAGCCCATCTAAAAATA
GCTGTAATGCAGAAGTTCATGTTCAACCAATCATTTTTGCCTTACGATGCAAAAATTGAAA
ACTAAGTTTATTAGAGAGGTTAGAGAAGGAGGAGCTCTAAGCAGAAAAAATCCTGTGCCG
GGAAACCTTGATTGTGGCTTTTTAATGAATGAAGAGGCCCTCCCTGAGCTTACAATATAAA
AGGGGGACAGAGAGGTGAAGGTCTACACATCAGGGGGTTGCTCTTGCAAACCAAACCAC
AAGACAGACTTGCAAAGAAGGCATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTTGCCTGGTCCCTCC
TGACTGGGGTGAAGGGCCAGCCAGGCCAGGGCACCCAGTCTGAGAACAGCTGCACCCACT
TCCCAGGCAACCTGCCTAACATGCTTCGAGATCTC 4188

AP1

Elemento de respuesta a E2

CRE

GRE

SP1

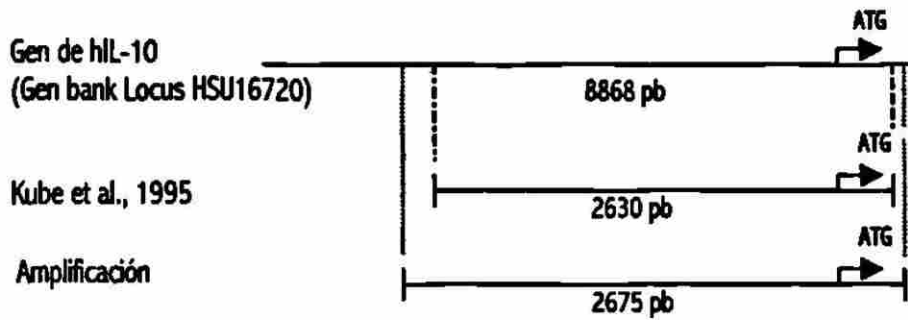
YY1

Caja CCAAT

Caja TATAA

Figura 13: Secuencia de la región reguladora del gen de hIL-10 (Gen Bank: HSU16720)

A



OLIGO SENTIDO: Posición 1514 - 1535

5'-TTT TCT AGA TAC CTC CCT TCT CCC TGA C'- 3'

OLIGO ANTISENTIDO: Posición 4167 - 4188

5'-TTT CTC GAG ATC TCG AAG CAT GTT AGG C- 3'

B

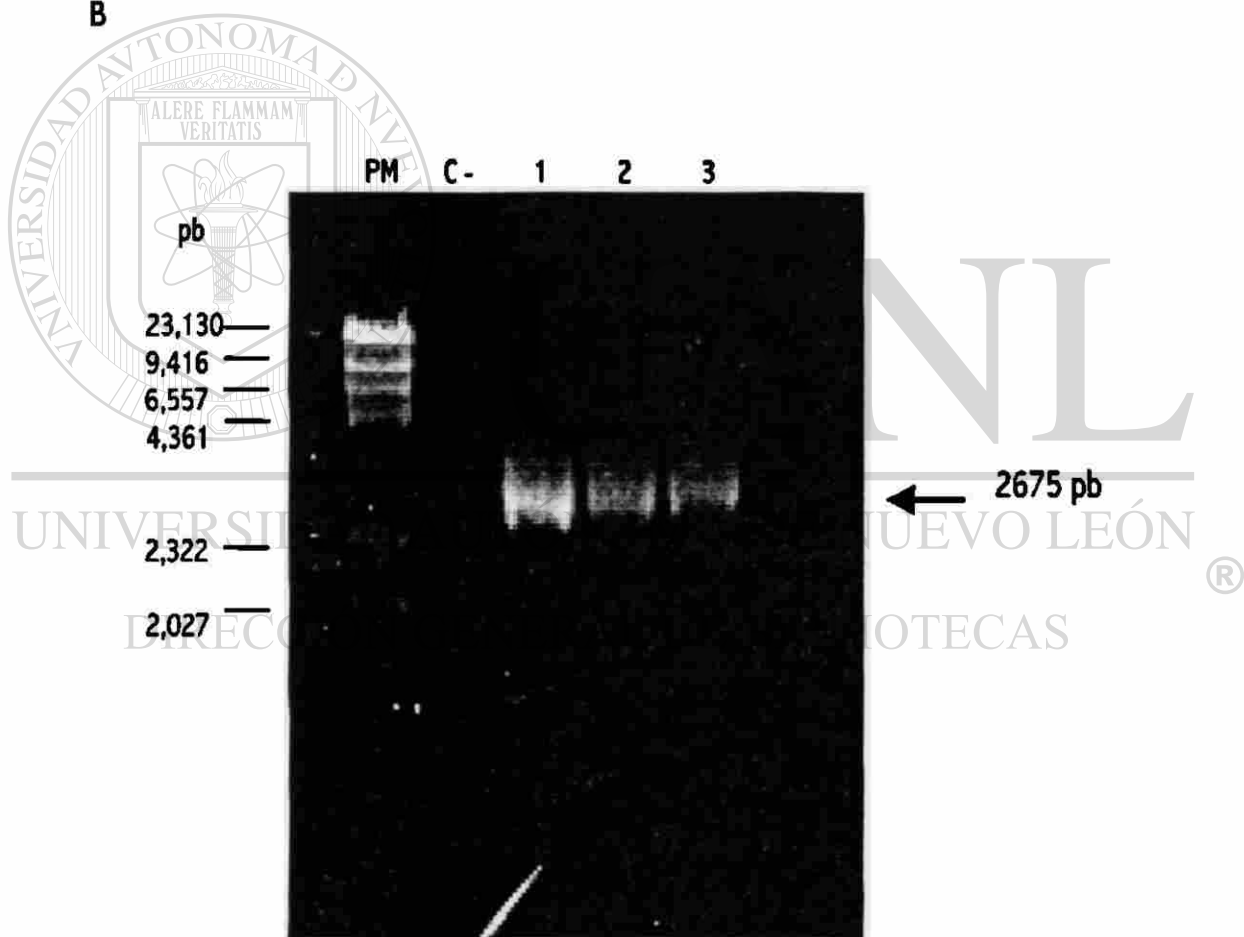


Figura 14. Amplificación de la región reguladora del gen de la hIL-10. A). Delimitación de oligonucleótidos para la amplificación por PCR de la región reguladora de hIL-10. B). Amplificación a partir de DNA de la línea celular HeLa. PM: λ DNA/Hind III, C-). Control negativo 1-3) DNA de células HeLa.

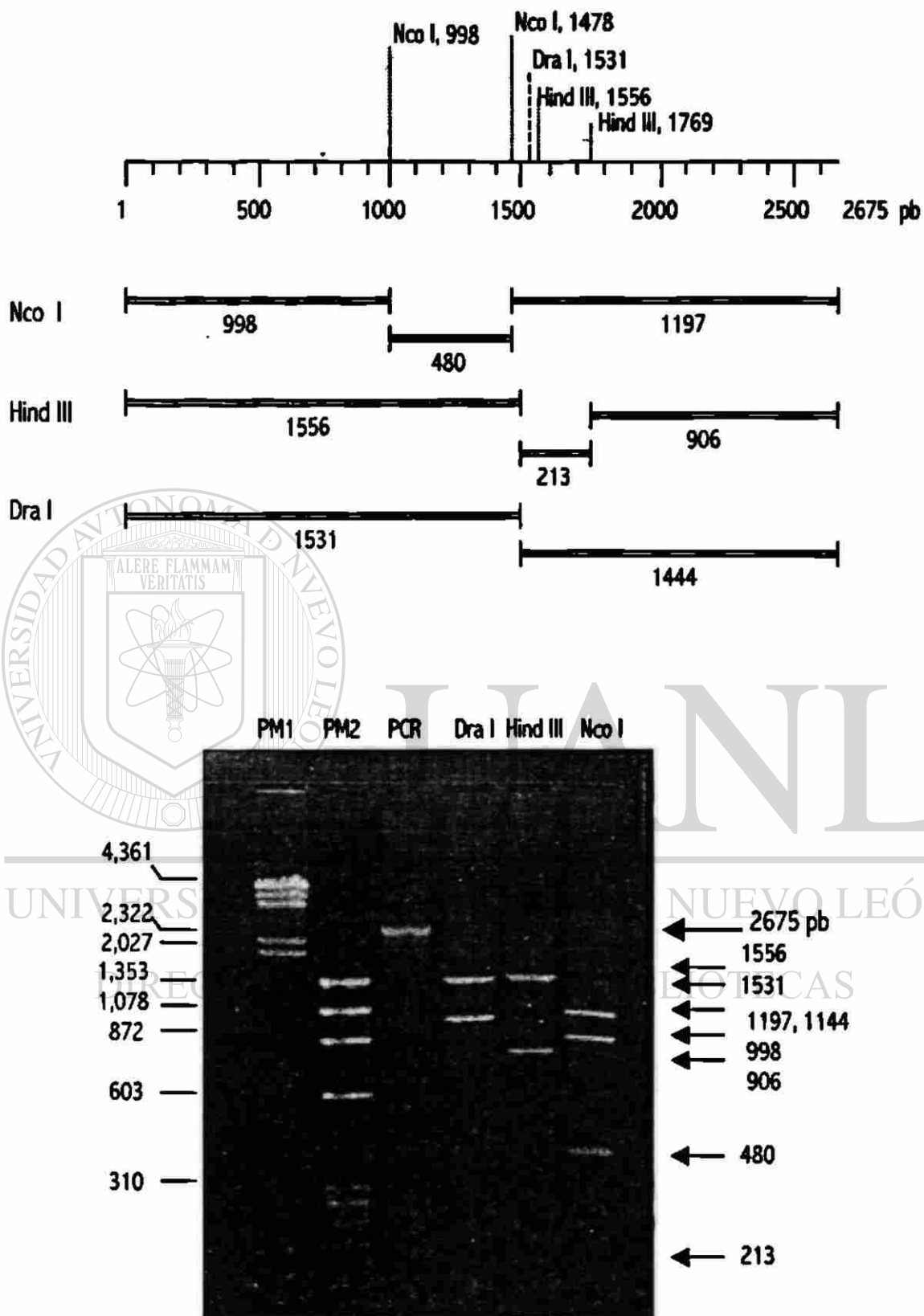


Figura 15 . Patrón de restricción de la región reguladora del gen de hIL-10 (PM1). ϕ X174 RF DNA/Hae III, (PM2). λ DNA/Hind III.

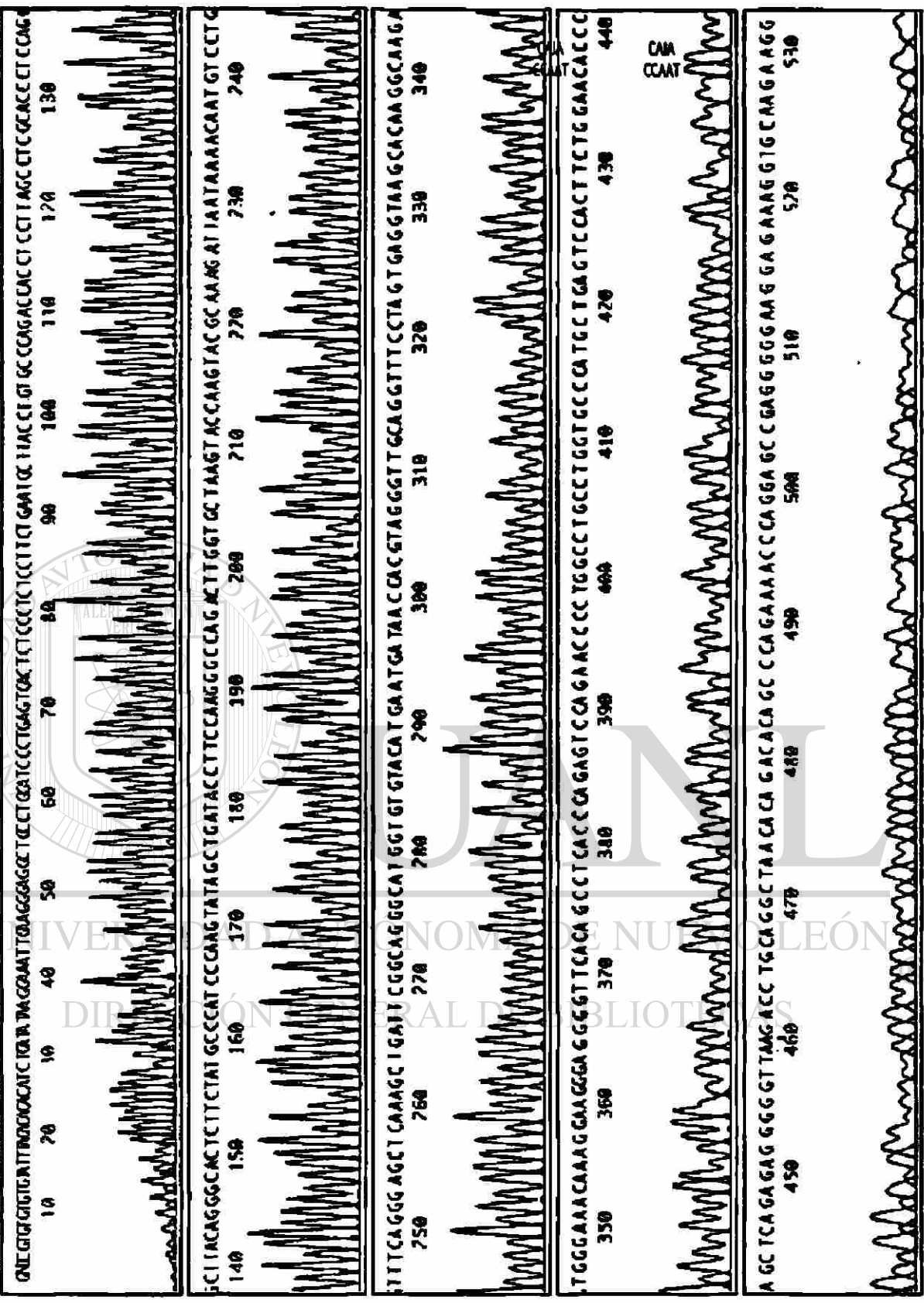
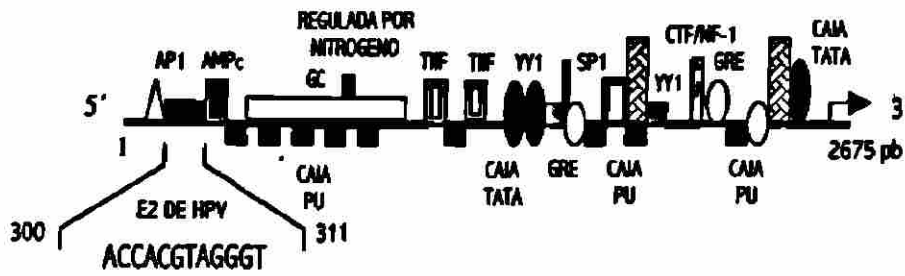
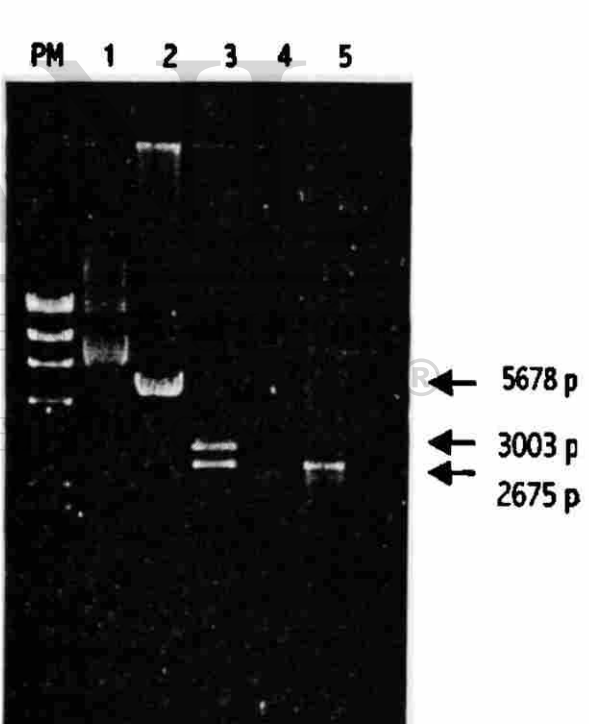
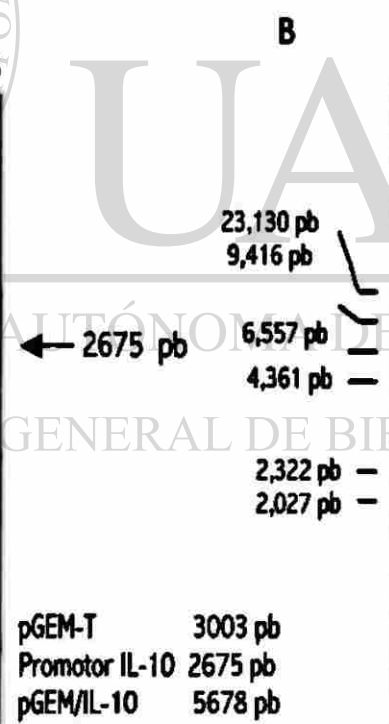
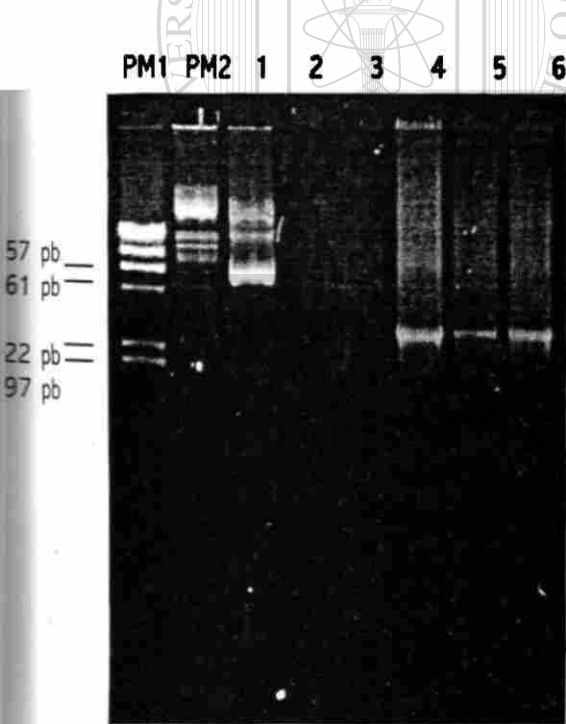
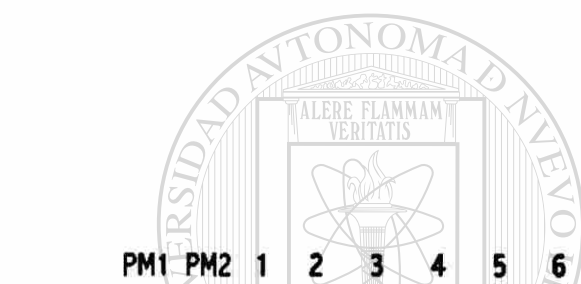
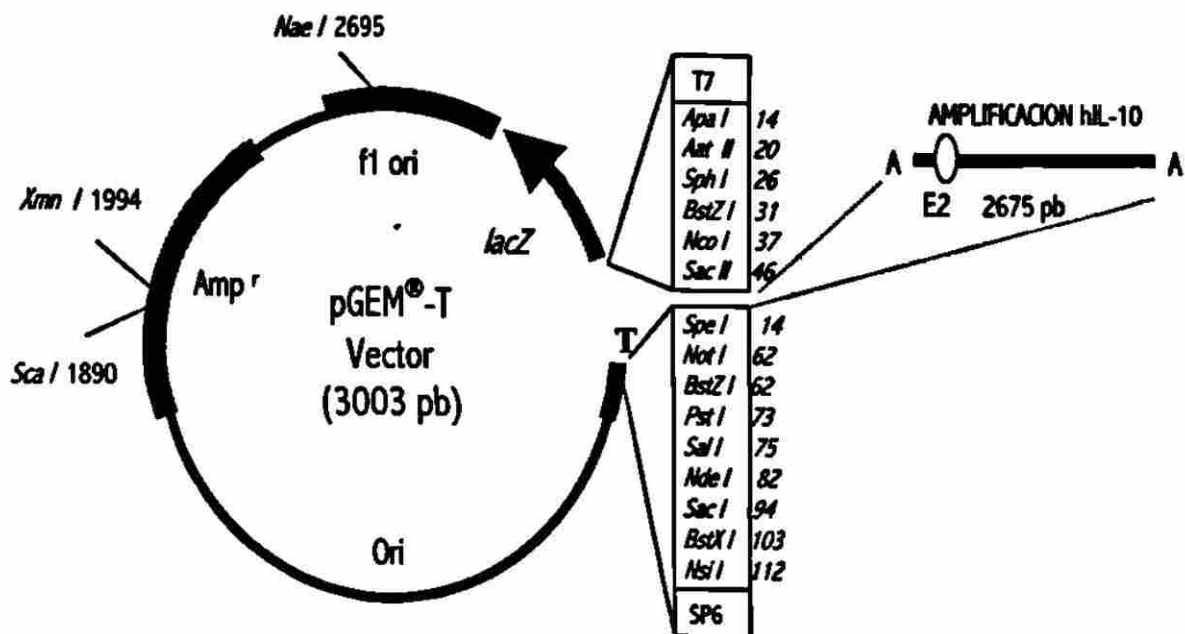


Figura 16. Secuencia de las primeras 530 pb de la región 5' distal de la región reguladora del gen de hIL-10



SECUENCIA	SIGNIFICADO	SITIOS	POSICION
TGAGTCA	AP1	1	98
GCACT	Consenso para metionina	6	178, 898c, 1659, 1746, 1781c, 2556
TGTCCT	Consenso para metionina	3	270, 1036c, 1914
ACCN ₆ GGT	Transactivado por E2 de PV	1	330
GATGGGAAACA	LMP2 similar EBNA2	1	375
AGGAAG	PEA1	4	387, 593c, 699c, 1922
GAGAA	Caja Pu	14	12c, 544, 584c, 693c, 892c, 1649c, 1858, 2052, 2096c, 2164, 2204c, 2234, 2363, 2622
GTTTGCA	Secuencia regulada por nitrógeno	1	866
GGGGGAAGT	Elemento similar a ETS	2	1427, 1801c
GAGA	TIF	3	1159c, 1448, 1637
GTGGAAA	Secuencia de respuesta a ainsulina	1	1842
TAATGAAAT	Elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE1)	1	1866
AGAACA	Elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE2)	4	969, 2194, 2202c, 2623
CGC	SP1	1	1908
AAAATGGAA	YY1	1	1944
CTTGGGAAGCTT	LMP2 similar a EBNA2	1	1959
TGTTCT	Elemento de respuesta a suero	4	969c, 2194c, 2202, 2623c
CCAAT	Caja CCAAT	3	1584, 2088, 2307
	Sitios de unión a CBP, CTF/NF-1, NF- γ	3	1584, 2088, 2307
TATAA	Caja TATA	4	64, 1715, 1763, 2455
ACCTCA	Elemento de respuesta a APMc	1	356c
AAAGG	Inducido por IFN	6	385, 547, 952, 1230, 1881, 2459
AAAGGA	Secuencia central del enhancer INF	3	385, 1230, 1881
CACCC	Secuencias ricas en GC	12	159, 409, 467, 804c, 871, 1521, 1633c, 1821c, 1985, 2587c, 2612, 2633, 1584, 2088, 2307

Figura 17. Elementos de regulación transcripcional presentes en la región reguladora del gen de hIL-10. Basados en el programa Promotor Scan II.



PM1). ϕ x174 RF DNA/Hae III, PM2). λ DNA/Hind III
1). pGEM-T/IL-10, 2). PCR control negativo 3). PCR de DNA de células HeLa 4-6). PCR de donas positivas.

PM). λ DNA/Hind III, 1). pGEM-T/IL-10, 2). pGEM-T/IL-10 linealizado con Xba I, 3). Digestión con Xba I y Xho I, 4-5). PCR de DNA de células HeLa y dona positiva.

Figura 18. Clonación de la región reguladora del gen de hIL-10 en el vector pGEM-T.
Construcción pGEM-T/IL-10

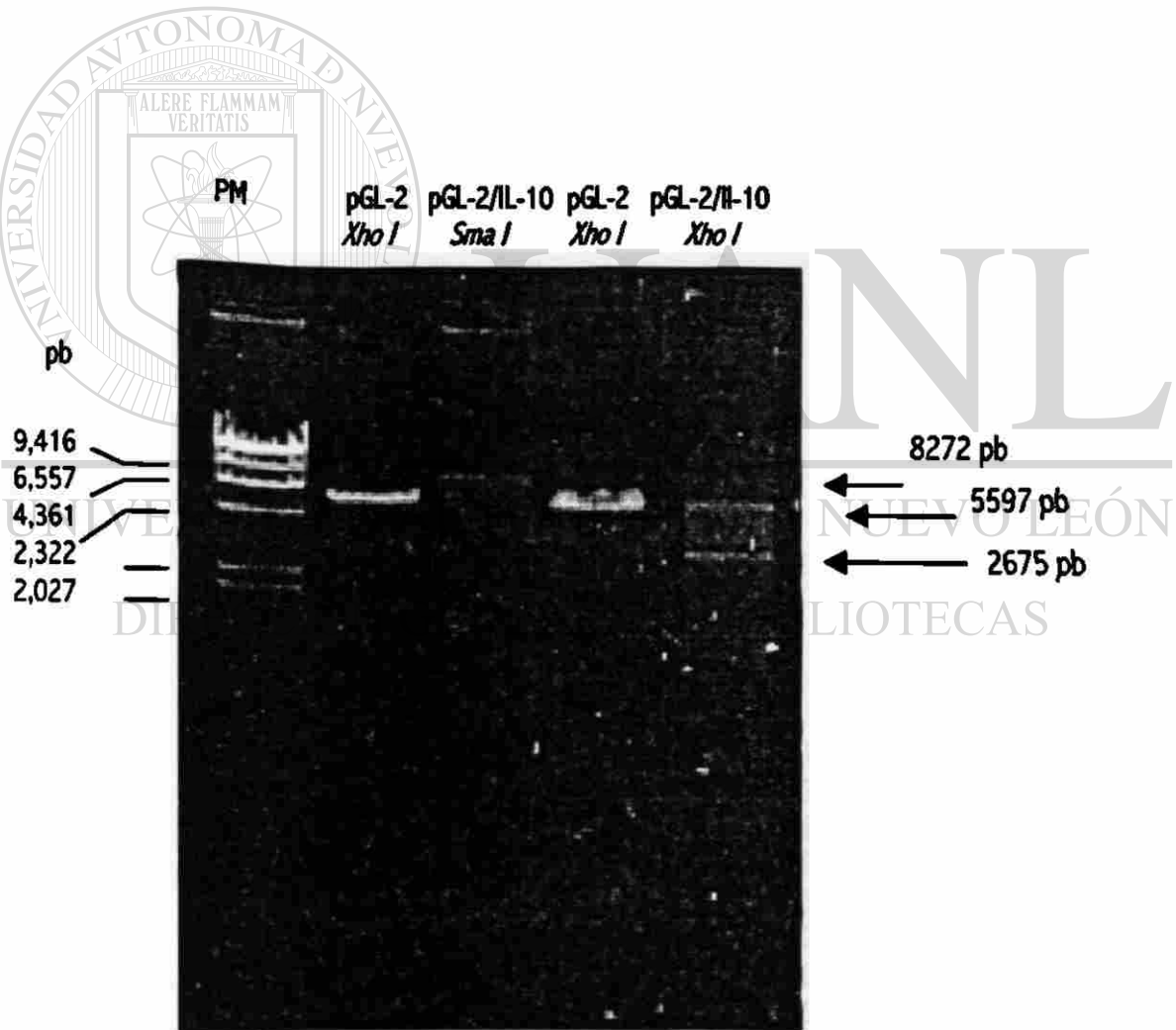
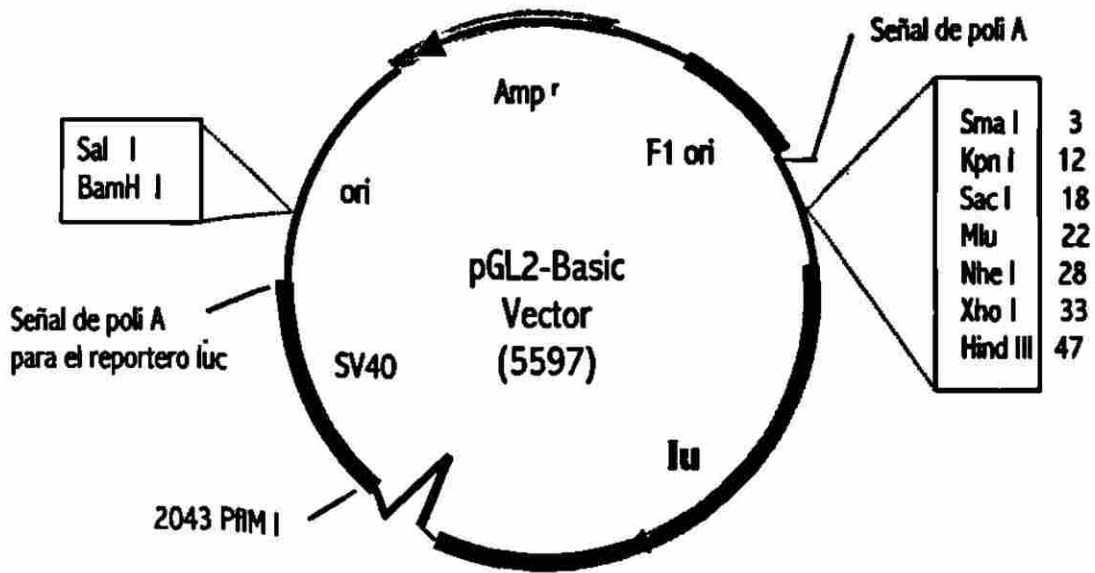


Figura 19. Clonación de la región reguladora del gen de la hIL-10 en el vector pGL-2 vector. Construcción pGL-2/IL-10.

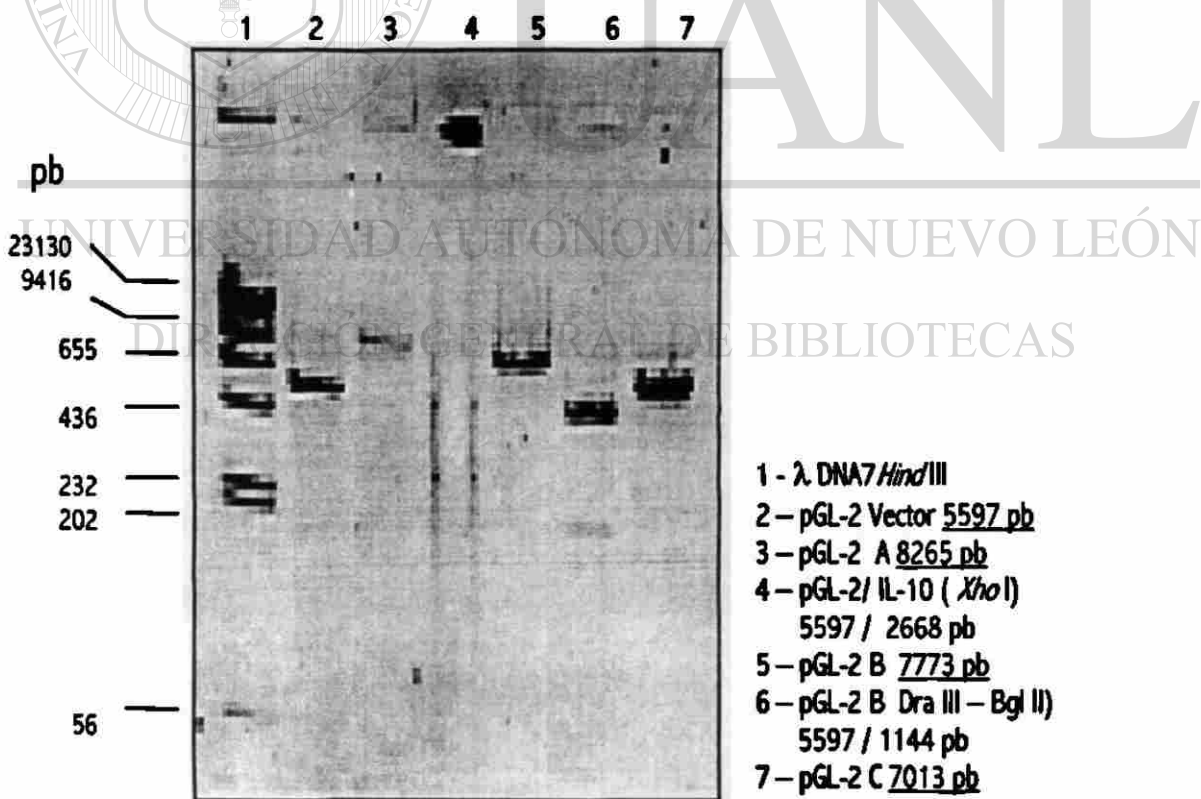
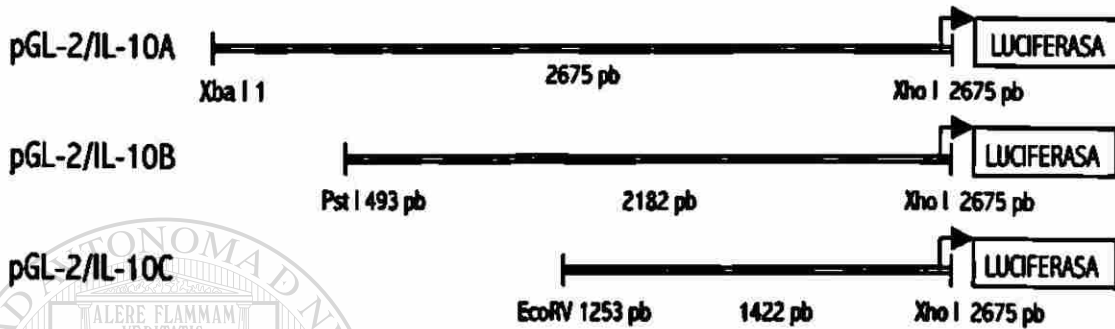
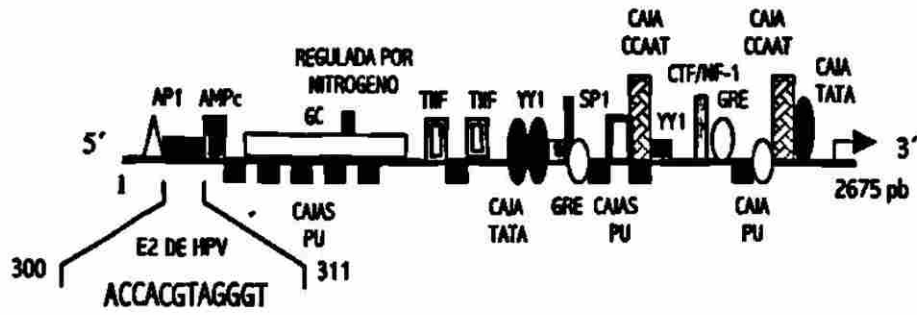


Figura 20. Análisis de deleciones de la región reguladora del gen de hIL-10 en el vector pGL-2 vector. Clonas pGL-2/IL-10A, pGL-2/IL-10B y pGL-2/IL-10C

A

VECTOR	TRANSFECCION (URL)	COTRANSFECCION (URL)
CELULAS C33-A	4*	
pGL-2 Control	38593	35287
pGL-2 Vector	84	83
pC18SP1-Luc	937.5	1121027.5
pGL-2/IL-10A	76252	430972.6
pGL-2/IL-10B	79157.5	43638.5
pGL-2/IL-10C	82050	35689.5

*Sin transfección

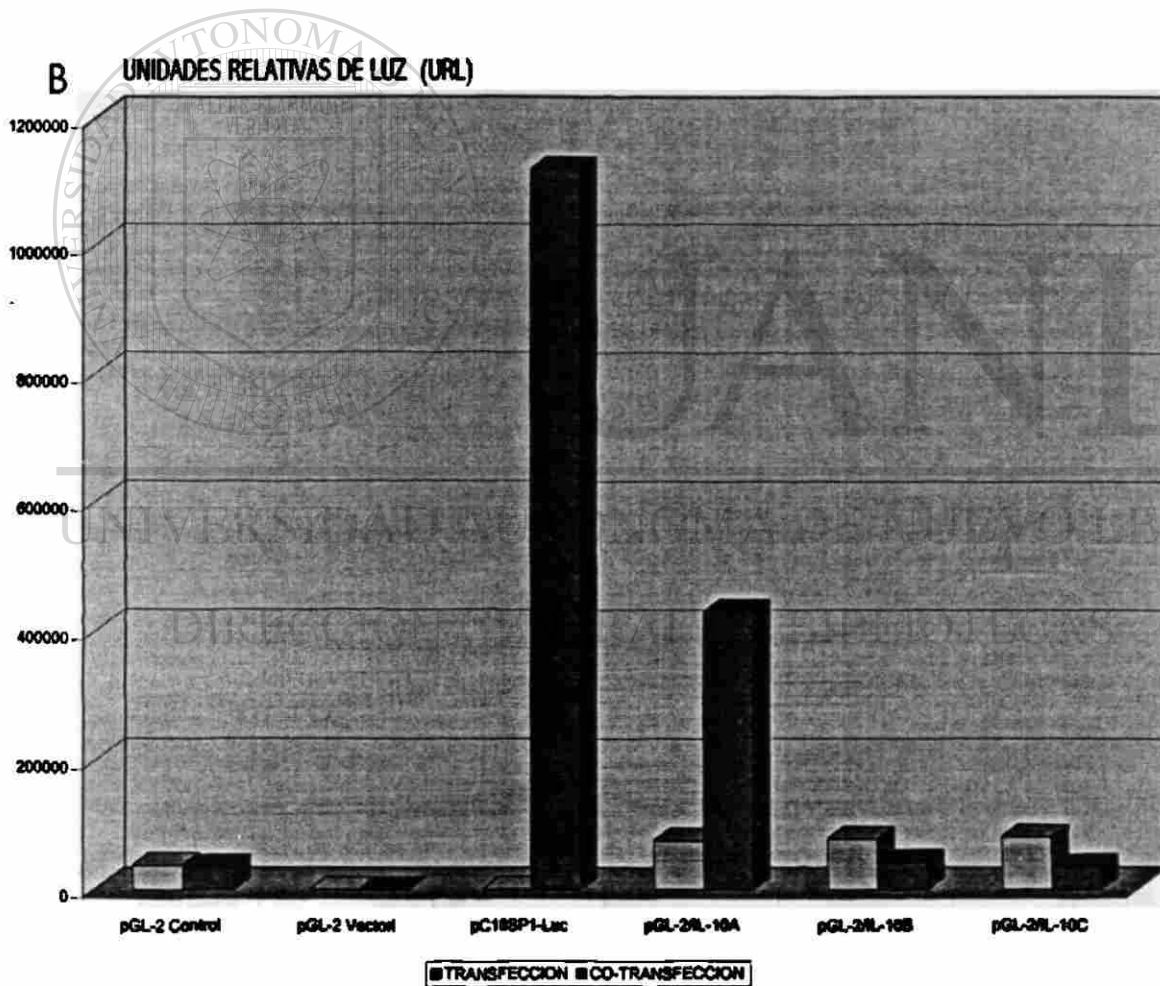


Figura 21. Análisis de funcionalidad: Transfección en células C33-A

VECTOR	TRANSFECCION (URL)	COTRANSFECCION (URL)
pGL-2 Control	38593	35287
pGL-2 Vector	84	83
pGL-2/IL-10A	76252	430972.6
pGL-2/IL-10B	79157.5	43638.5
pGL-2/IL-10C	82050	35689.5

UNIDADES RELATIVAS DE LUZ

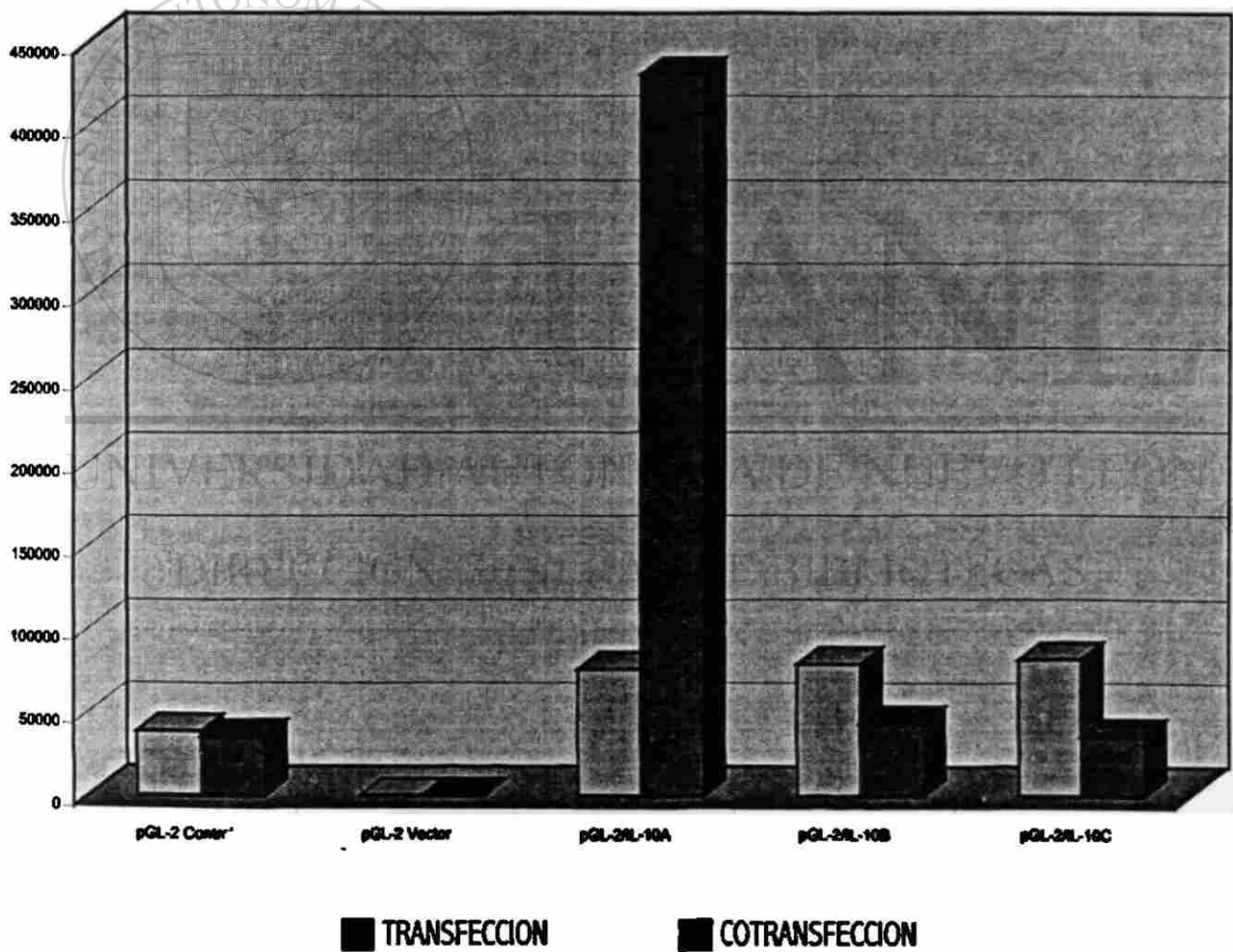


Figura 22. Análisis de funcionalidad: Transfección en células C33-A

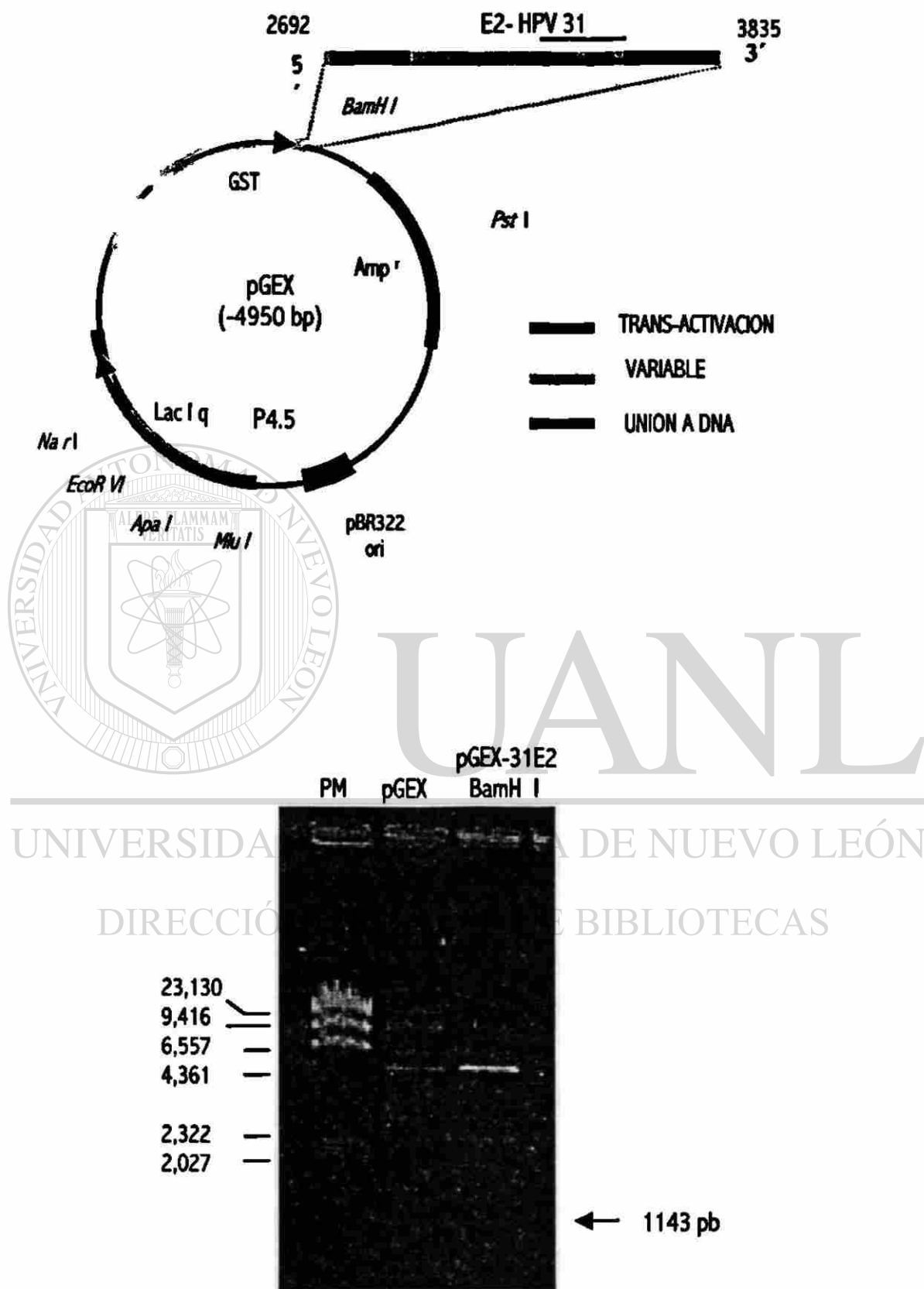


Figura 23. Caracterización de la construcción pGEX-31E2.

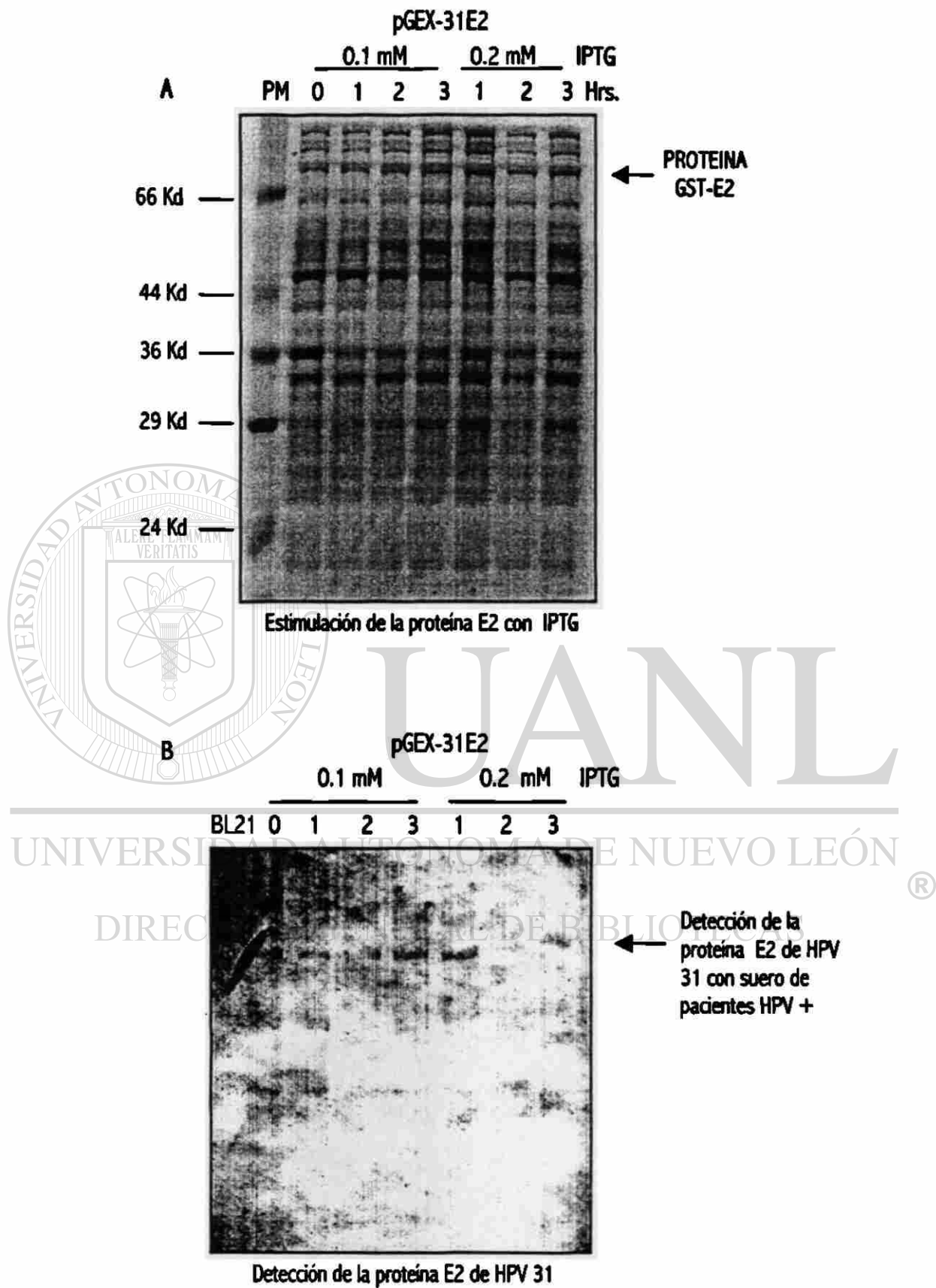


Figura 24. Inducción y detección de la proteína quimérica GST-E2 de HPV 31.



Lizado Bacteriano

Lavado

Elusión de la proteína GST-E2



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

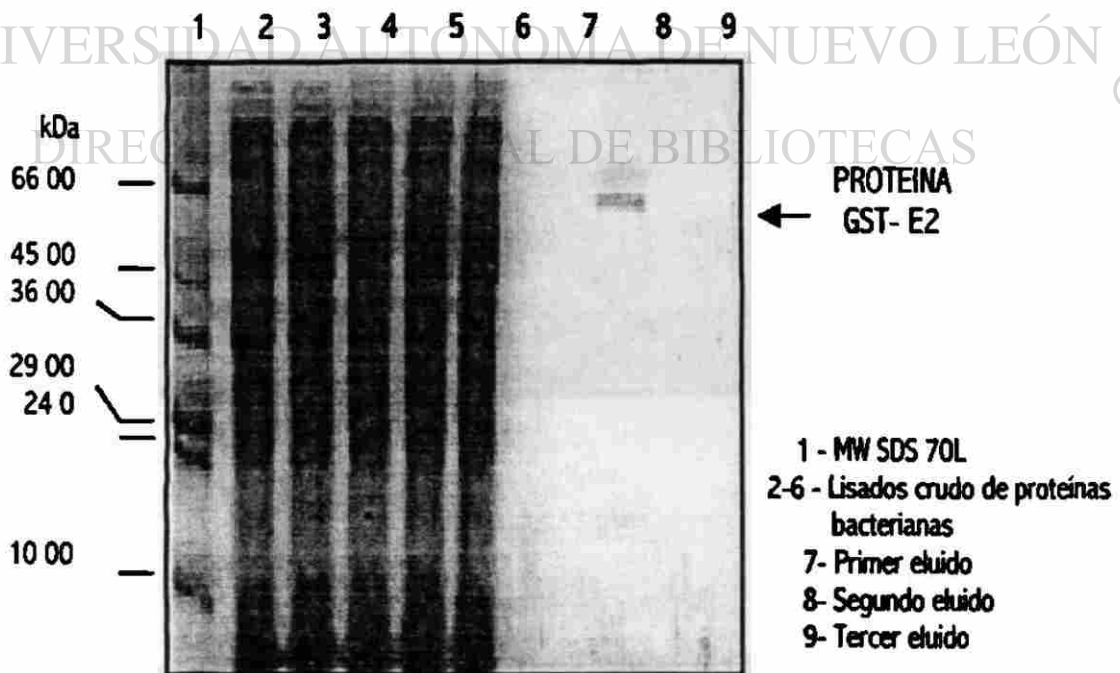


Figura 25. Purificación de la proteína quimérica GST-E2 de HPV 31.

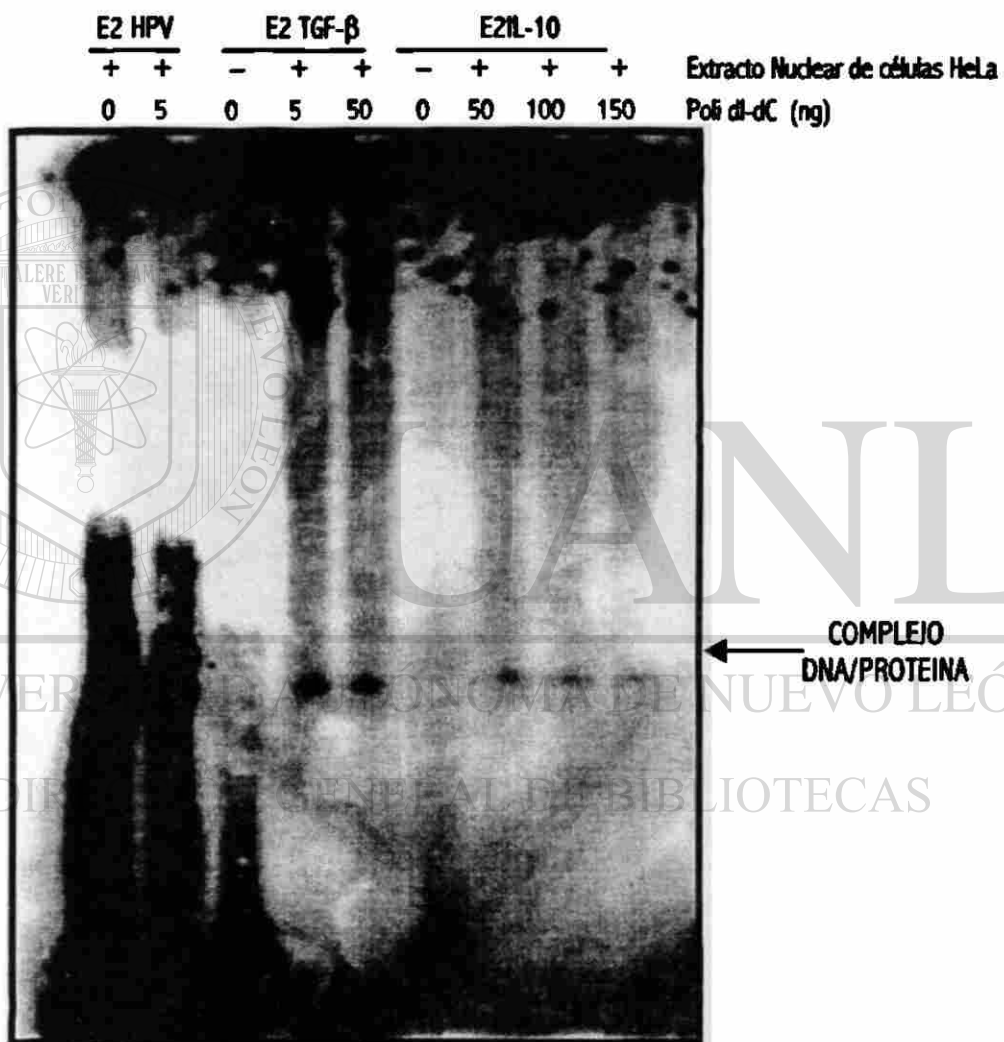


Figura 26. Ensayo de EMSA utilizando las sondas E2HPV, E2-TGF- β y E2IL-10 con Extratos nucleares de células HeLa.

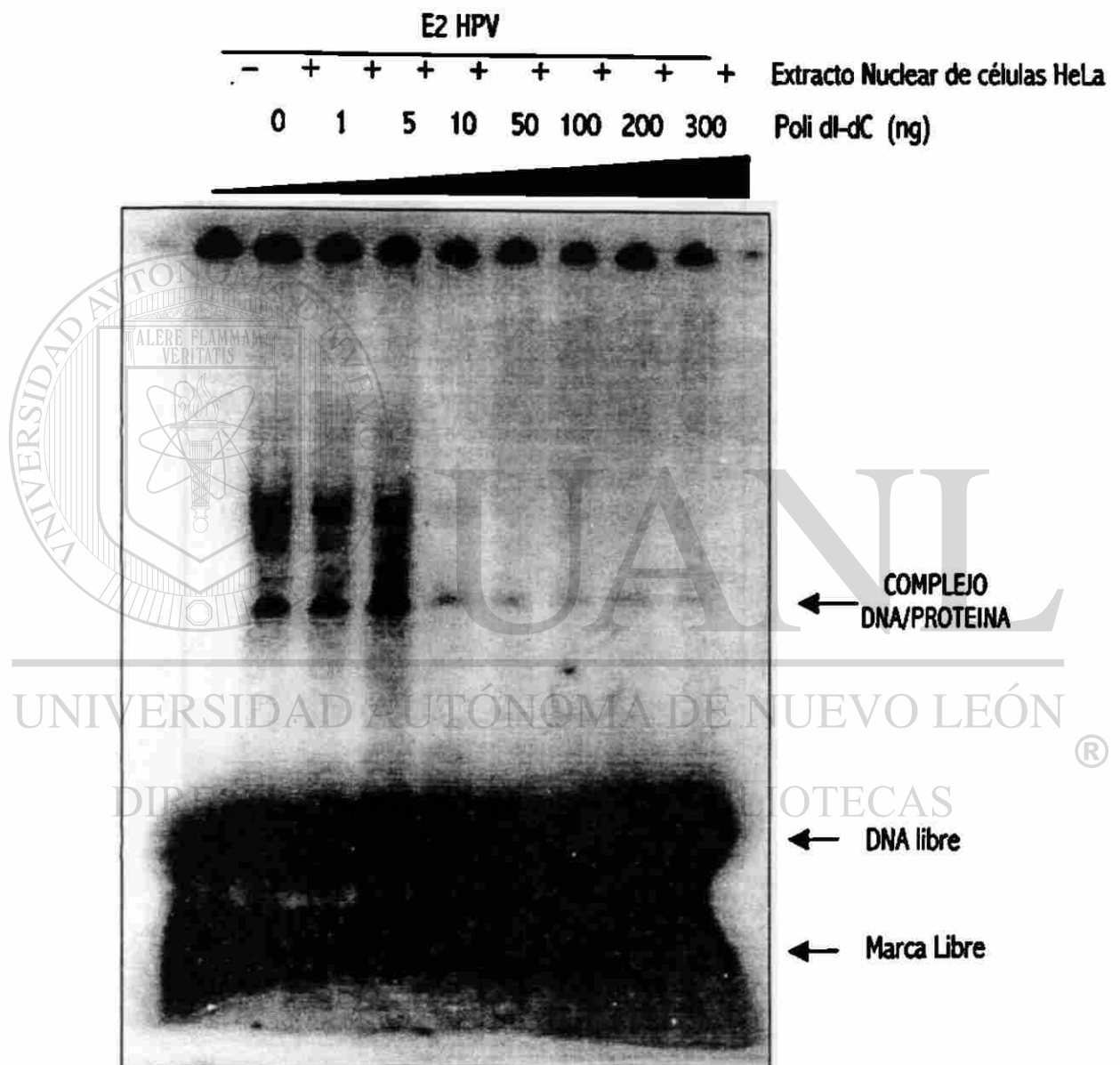
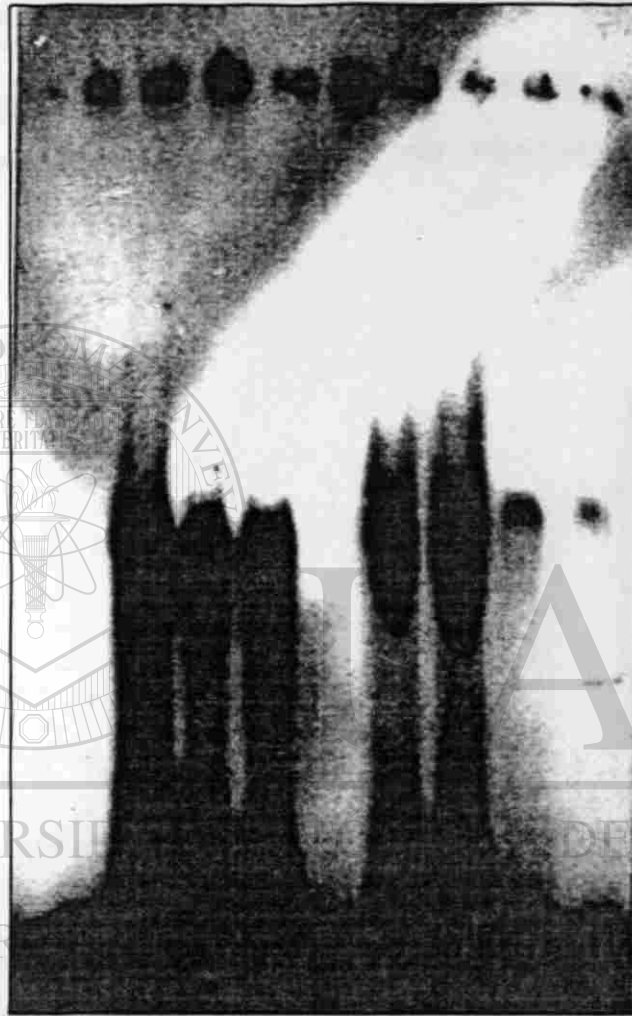


Figura 27. EMSA: Competencia heteróloga con la sonda E2HPV utilizando un gradiente de poli dI-dC y extractos nucleares de la línea celular HeLa.

E2 16				E2IL-10					
-	+	+	+	-	+	+	+	+	Extracto Nuclear de células HeLa
0	5	50	100	0	5	10	50	100	Poli dI-dC (ng)



← COMPLEJO
DNA/PROTEINA

Figura 28. Ensayo de EMSA utilizando las sondas E216 y E2IL-10 con extractos nucleares de la línea celular HeLa.

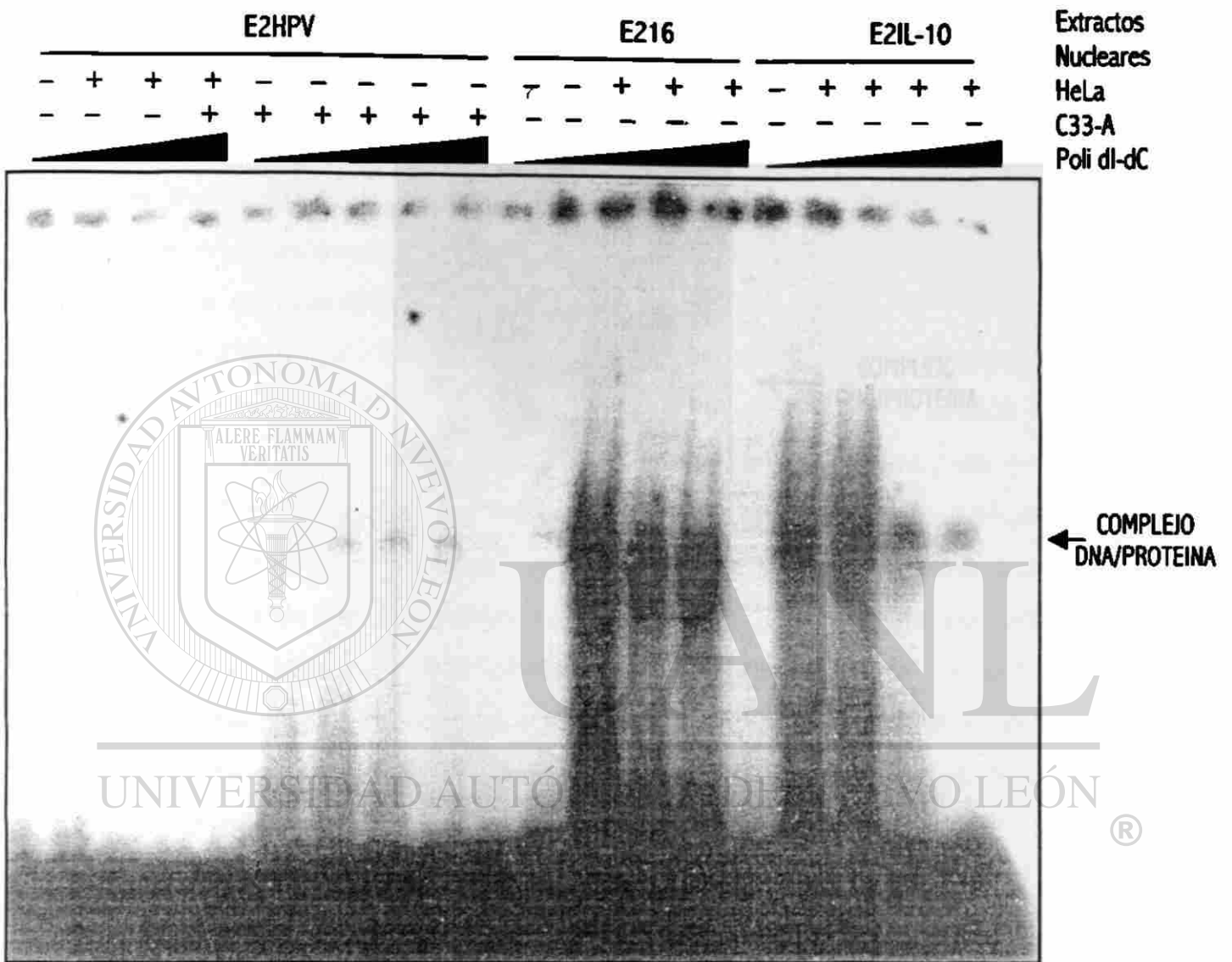


Figura 29. Ensayo de EMSA utilizando las sondas E2HPV, E216 y E2IL-10 con extractos nucleares de las líneas celulares HeLa y C33-A.

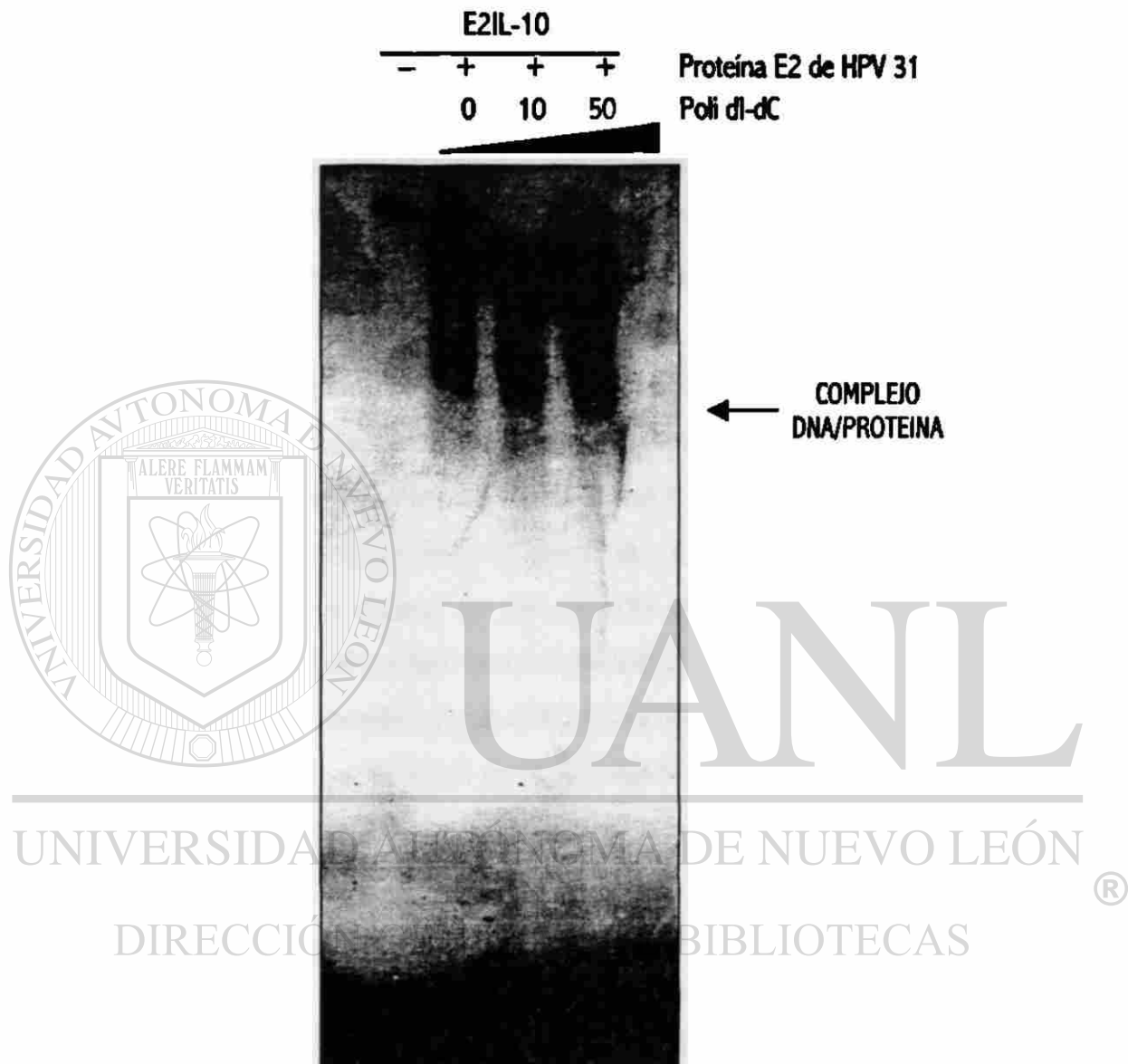


Figura 30. Ensayo de EMSA utilizando la sonda E2IL-10 con la proteína quimérica GST-E2 de HPV 31

DISCUSION

El virus del papiloma humano (HPV) es el principal agente viral asociado con la inducción de lesiones del tracto genital y del cáncer cervical; la infección por el HPV induce una serie de alteraciones celulares y genéticas produciendo la inmortalización y la transformación de la célula epitelial. Sin embargo, durante el desarrollo de esta neoplasia el sistema inmune establece una inmunovigilancia permanente para controlar la progresión de la enfermedad, no obstante, el virus del papiloma como manipulador de la célula tumoral puede generar varias vías de evasión a la respuesta inmune antitumoral, inhabilitando a esta última para eliminar a la célula transformada y de esta manera seguir proliferando. Tal es el caso de la producción local de ciertas citocinas de tipo Th2 y proinflamatorias en lesiones precancerosas y cancerosas del cervix, que suprimen a la respuesta inmune de tipo celular para eliminar a un tumor insipiente.

Previamente hemos demostrado que la expresión de la interleucina 10 es dependiente del desarrollo del cáncer cervical en presencia de HPV, los datos indicaban una estrecha relación entre la presencia del HPV y la expresión de la citocina en CaCu, de esta manera se propuso que el virus de papiloma podría ser el principal inductor de la expresión de esta citocina por medio de algunas de sus proteínas virales. Así analizando la región reguladora del gen de la hIL-10 se encontró un sitio potencial de reconocimiento por la proteína E2 de papilomavirus en la posición 5' distal del promotor de IL-10 (Kube et al., 1995), de esta manera nuestra hipótesis fue centrada en la participación de la proteína E2 como el inductor de la expresión de la IL-10 en cáncer cervical, así los objetivos del trabajo se centraron en demostrar por un lado que la proteína E2 de papilomavirus es capaz de reconocer el sitio de unión a E2 localizado en la región reguladora del gen de IL-10 y que además que transactivara al gen de esta citocina.

Para cubrir los objetivos, la estrategia experimental que se siguió, fue donar la región reguladora del gen de IL-10 en el vector pGL-2, el cual contiene el gen de luciferasa como gen reportero sin poseer promotor, así la expresión de este gen esta controlada por la región reguladora del gen de hIL-10, adicionalmente se deletó la secuencia donde se localiza el elemento de respuesta a la proteína E2 de papilomavirus para observar la influencia del elemento sobre la expresión del gen de luciferasa, con estas construcciones y una adicional donde solo contiene los elementos de transcripción basal de gen de hIL-10, se realizaron ensayos de funcionalidad transfectando la línea celular C33-A y co-transfectando con el plásmido pCMV16E2 el cual expresa la proteína E2 de HPV 16. Por otro lado, para determinar si la proteína E2 reconoce la secuencia consenso del elemento de respuesta a E2 presente en la región reguladora del gen de hIL-10, por medio de ensayos de electroforesis de movilidad retardada (EMSA) se determinaron los complejos formados entre la proteína E2 recombinante, extractos nucleares de las líneas celulares HeLa y C33-A y oligonucleótidos consenso con las secuencias de reconocimiento para E2.

Primeramente se amplificó la región reguladora del gen de hIL-10 por medio de PCR, para lo cual se diseñaron un par de oligonucleótidos que delimitaran tal región dentro de la secuencia completa del gen de hIL-10 en el genbank (Locus HSU16720). Utilizando DNA de la línea celular HeLa se pudo amplificar un producto de 2675 pb, el cual fué comprobado por medio del patrón de restricción del producto de PCR y por medio de una secuenciación automatizada de la región 5' distal del promotor, para lo cual el producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T, generando la construcción pGEM-T/IL-10, posteriormente fué sometido a secuenciación basada en amplificación con el oligonucleótido sentido del amplificado original. Las 530 bases obtenidas de la secuencia coinciden con la secuencia reportada, sin embargo, se localizaron dos inserciones en las posiciones 1906 y 2002, las cuales no se localizan en las posiciones 1843 y 1854, donde se ubica el elemento de respuesta a la proteína E2, por lo tanto estas mutaciones no afectan el reconocimiento de esta proteína a su secuencia blanco y la acción transactivadora.

Adicionalmente se realizó un análisis para identificar secuencias potenciales de reconocimiento para factores de transcripcionales, reportando secuencias consenso adicionales que no fueron reportadas por Kube y cols., 1995, tales como: 1 elemento de respuesta a AMPc, 3 sitios de unión a CBP y CTF/NF-1 y varias secuencias ricas en GC, además de secuencias adicionales ya reportadas, como: 2 Cajas TATAA, 11 Caja CCAAT, 10 Cajas Pu y 3 elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) (Figura 17).

A partir de la construcción pGEM-T/IL-10, la región reguladora fue subclonada en el vector pET-22b(+) en los sitios *Xba I* y *Bgl II*, creando la construcción pET/IL-10, liberando el inserto en el sitio único *Xho I*, así este fragmento de DNA fue clonado en el vector pGL-2 vector, creando la construcción pGL-2/IL-10A, la cual contiene toda la secuencia completa de la región reguladora del gen de hIL-10; adicionalmente para eliminar el elemento de respuesta a E2, la construcción anterior fue digerida con las enzimas *Sma I* y *Pst I*, el vector obtenido fue digerido con la enzima Mung Bean Nucleasa para generar extremos romos, posteriormente para obtener la construcción pGL-2/IL-10B. Una construcción adicional considerando solo los elementos de transcripción basal fué generada a partir de la construcción pGEM-T/IL-10, la cual fue digerida con las enzimas *EcoR V* y *Xho I*, y fue clonada en los sitios *Sma I* y *Xho I* del vector pGL-2, así fue creada la construcción pGL-2/IL-10C. De esta manera se generaron 3 construcciones pGL-2/IL-10A, B y C), las cuales fueron usadas junto con los vectores pC18Sp1-Luc (control positivo), pGL-2 control (control positivo), y pGL-2 vector (control negativo) y las células C33-A sin transfectar (como control negativo de la transfección), para transfectar la línea celular C33-A, además de cotransfecciones con el plásmido pCMV16E2, el cual contiene el ORF del gen de E2 de HPV 16.

Los análisis de funcionalidad establecen que cuando se transfecta la línea celular C33-A solo con el vector pGL-2 vector, se registran valores muy bajos de luminiscencia (84 URL) lo que indica que el gen de luciferasa presente en la construcción no se expresa ya que carece de promotor, y los valores registrados solo indican el fondo de la reacción, y estos valores son mantenidos cuando se cotransfecta con el vector pCMV16E2 (Figura 21 y 22). Por otro lado al transfectar con el vector pGL-2 control, el cual contiene el promotor de SV40 usado como control de la transfección, registra una expresión de 38593 URL estos valores se mantienen (35287) cuando se cotransfecta con el plásmido pCMV16E2, lo que indica que la proteína E2 de HPV 16 no es capaz de reconocer

una secuencia en el promotor de SV40. Al transfectar la línea celular C33-A con el vector pC18Sp1-Luc, el cual contiene cuatro elementos repetidos de reconocimiento por la proteína E2, se registran valores bajos luminisencia (937.5 URL) sin embargo, como es de esperarse cuando se cotransfecta con el vector pCMV16E2, los valores de luciferasa se incrementan de una manera exorbitante hasta 1,1121027.5 URL, lo que indica que al producirse la proteína E2, es suficiente para unirse a los elementos repetidos de E2 presentes en el promotor sintético del gen de luciferasa de la construcción pC18Sp1-Luc, y de esta manera se transactiva el gen de luciferasa a altos niveles.

Las transfecciones con las construcciones pGL-2/IL-10A, B y C, registran valores superiores al del vector pGL-2 control, hasta un incremento de 206%, estos valores de la actividad del promotor de IL-10 en estas construcciones no tienen mucha variación (79834, 79157.5 y 82050 URL respectivamente), lo que indica que dentro de la construcción pGL-2/IL-10C se localizan los principales elementos de regulación transcripcional de la región reguladora del gen de IL-10, y esto correlaciona con los elementos de transcripción basal reportados en esta región en particular. De esta manera la maquinaria de transcripción celular está reconociendo los elementos de transcripción presentes en la construcción, lo cual se traduce con la activación del gen reportero registrando actividad de luciferasa. Por otro lado cuando se cotransfectan estas células con las construcciones anteriores y con el vector pCMV16E2, la actividad de luciferasa se incrementa en la construcción pGL-2/IL-10A, hasta 4330972.6 URL, lo que indica que la proteína E2 está reconociendo el elemento de respuesta a E2 presente en la región 5' distal de la región reguladora del gen de hIL-10 y transactiva al gen reportero, cuando este elemento de respuesta a E2 es deletado (construcción pGL-2/IL-10B) no solo no se observa aumento en la actividad de luciferasa, sino que disminuye en presencia de la proteína E2 de HPV 16 (43638.5 URL), esta baja en la actividad del promotor también es registrada en la construcción pGL-2/IL-10C (35689.5 URL), donde solo contiene los elementos de transcripción basal, estos datos pudieran ser interpretados como un efecto represor de la proteína E2, sin embargo, se debe ser cauteloso, ya que por un lado en estas dos regiones no contienen alguna secuencia de reconocimiento para la proteína E2 de papilomavirus y por otra parte, la proteína E2 tiene la capacidad de interactuar con factores transcripcionales tales como SP1 (Li et al., 1991), TIIID y TFIIIB (Rank & Lambert, 1995 & Steger et al., 1995) y con la proteína celular AMF-1 (Breinding et al., 1997), de esta manera la proteína E2 puede estar interactuando con estas proteínas u otros factores transcripcionales impidiendo que interactúen a sus secuencias blanco y producir una baja de actividad del promotor de hIL-10 y como consecuencia la expresión de luciferasa se ve disminuida (Figura 21 y 22).

Para demostrar que la proteína E2 es capaz de reconocer el elemento de respuesta a E2 presente en la región reguladora del gen de IL-10, se realizaron análisis de EMSA, utilizando extractos nucleares de las líneas celulares HeLa y C33-A, HPV 18 y HPV negativas, además de la proteína E2 recombinante de HPV 31. Estos ensayos se realizaron con tres oligonucleótidos específicos marcados con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (Tabla 6), el oligonucleótido E216 contiene un elemento de respuesta a E2 presente en el LCR del genoma del virus de HPV 16, el oligonucleótido E2HPV contiene la secuencia consenso de E2 para papilomavirus genitales y el oligonucleótido E2IL-10 contiene la secuencia de E2 presente en la región reguladora del gen de hIL-10, adicionalmente se utilizó un fragmento de DNA de 209 pb liberado de la región reguladora de IL-10 con las enzimas *Sac*I y *Pst*I, las secuencias

fueron incubadas con los extractos nucleares de las líneas celulares C33-A y HeLa para identificar la formación de un complejo DNA proteína.

Al incubarse las sondas E2HPV, E216 y E2IL-10 con los extractos nucleares de células HeLa se forma un fuerte complejo que se localiza al mismo nivel en todas las secuencias (Figuras 26-29), solo en el oligo E2HPV se forman dos complejos adicionales (Figura 27), sin embargo, cuando se realiza una competencia heteróloga a concentraciones graduales de poli dI-dC, los dos complejos desaparecen, indicando que tales complejos son de tipo inespecífico. No obstante, en todos los casos los complejos formados se mantienen aún aumentando la concentración de poli dI-dC. Inicialmente estos ensayos se realizaron para identificar la formación de un complejo DNA/proteína E2 debido a que la línea celular HeLa contiene el genoma del virus HPV 18, sin embargo, cuando se realizaron los ensayos con extractos de células C33-A se detecta un fuerte complejo con todos oligonucleótidos al mismo nivel que el formado con los extractos nucleares de las células HeLa, indicando que el complejo DNA/Proteína detectado, no es producto de la unión con la proteína E2 de papilomavirus, ya que las células C33-A son negativas a esta, y revisando la literatura, indica que la línea celular HeLa no expresa la proteína E2 de papilomavirus, ya que el genoma del virus esta integrado al genoma celular, y al integrarse generalmente se rompe entre el gen E1 y E2 del genoma viral, quedando incompleto el marco de lectura de la proteína E2. Así el complejo detectado es formado por una proteína de origen celular que además reconoce la secuencia de respuesta a la proteína E2 del virus del papiloma y es específica, dado que al aumentar gradualmente la concentración del competidor inespecífico, poli dI-dC, el complejo se mantiene aun a concentraciones de 300 ng. Adicionalmente si se comparan los nucleótidos internos de la secuencia de reconocimiento por la proteína E2 (Tabla 6), se observa que estos varían entre todos, sin embargo la proteína identificada reconoce específicamente también los mismos nucleótidos que esta reconociendo la proteína E2 nativa de papilomavirus. Por otro lado en el mismo ensayo se utilizó una secuencia de E2 presente en el promotor del gen de otra citocina que esta muy expresada en cáncer cervical (TGF- β), y de igual forma se localiza este complejo (Figura 26), lo que indica que esta proteína puede estar involucrada en regular los promotores de ambas citocinas (IL-10 y TGF- β).

Adicionalmente cuando se realizan los ensayos de EMSA con la proteína GST-E2 purificada, se detecta un complejo más arriba (Figura 30), lo que indica por un lado que el complejo detectado anteriormente, efectivamente no se trata de la proteína E2 y por otro lado, se demuestra que la proteína E2 de HPV 31 es capaz de reconocer el elemento de respuesta a la proteína E2 presente en la región reguladora del gen de hIL-10, lo cual concuerda con los experimentos de funcionalidad.

Estos resultados apoyan de una manera consistente que la expresión de la interleucina 10 en cáncer cervical esta regulada por la infección del virus del papiloma humano, la proteína E2 de HPV fue capaz de reconocer el elemento de respuesta a E2 presente en la región 5' distal de la región reguladora del gen de hIL-10 y también fue capaz de transactivar al gen reportero en un sistema in vitro. Sin embargo nuestros datos sugieren una nueva posibilidad de inducción de la expresión de la IL-10, ya que si analizamos los niveles de expresión de esta proteína E2 durante el desarrollo del CaCu y de las evidencias de expresión de la hIL-10 que es dependiente del desarrollo del cáncer, los niveles de expresión se contraponen (Figura 31), es decir mientras en estadios iniciales del

desarrollo del CaCu (LLIS) se registran los niveles mas elevados de expresión del gen de E2 y sin embargo los niveles de la IL-10 no son tan elevados como en estadios avanzados (LIS de alto grado y carcinoma invasor), cuando el genoma viral se integra al genoma celular y se rompe el ORF del gen de E2 y en consecuencia baja o nula expresión del gen de E2, por lo que se plantea la existencia de vías alternativas que utiliza el virus para inducir la expresión de la interleucina 10.

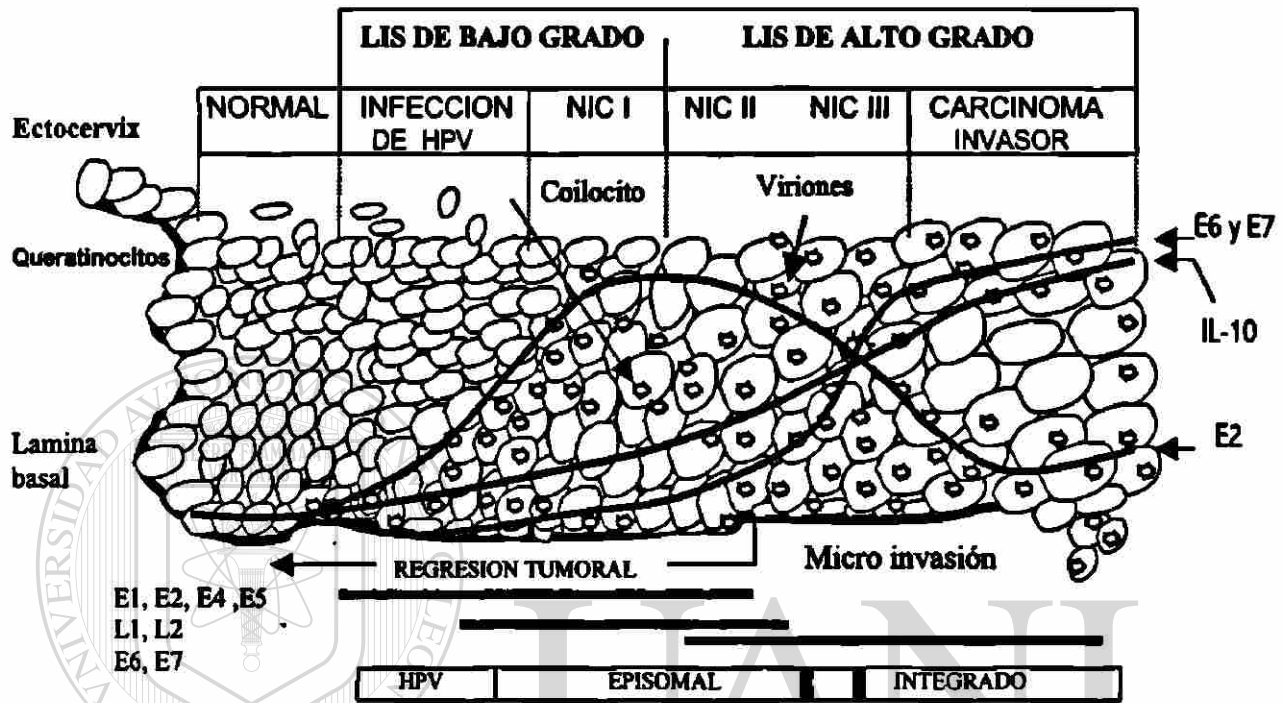


FIGURA 31: Niveles relativos de expresión de IL-10, E2, E6 y E7 durante la evolución del cáncer de cervix

Esta hipótesis esta apoyada por las actividades biológicas de otras proteínas virales, tales como las proteínas E6, E7 y la proteína E5. Estas proteínas se les ha encontrado propiedades activadoras en varios genes celulares (Tabla 7). La proteína E6, puede modular la transcripción del gen de fibronectina vía el elemento de respuesta a APMc, CRE (Shino et al., 1996), además de estimular el promotor de TGF- β por medio de secuencias ricas en GC (Dey et al., 1997), puede activar el promotor de la timidina cinasa por medio de secuencias GC y por medio de las cajas CAAT (Desaintes et al., 1992) y adicionalmente puede transactivar los promotores de la protirimosina α y el c-myc (Kinoshita et al., 1997) por su parte la proteína E7 de HPV 16 tiene la facilidad para interactuar con la proteína de unión a la caja TATA, TBP (Phillips & Vousden, 1997), y ambas proteínas E6/E7 pueden activar al gen de c-fos vía CRE (Morosov et al., 1994), y finalmente la proteína E5 de HPV 11 y 16 pueden activar el promotor de c-fos a través del elemento de unión a NF1 (Chen et al., 1996), si se analizan estos elementos que son regulados por estas proteínas virales en la región reguladora del gen de hIL-10 (Figura 17), observamos que estos elementos están presentes, con estos nos abre la posibilidad que la expresión de la interleucina 10 en cáncer cervical puede estar regulada por diferentes vías dependiendo del estado en que se encuentre la enfermedad, es decir que en estadios precancerosos, esta citocina puede estar regulada por la proteína E2 y la

proteína E5, además de la participación de los 5 elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) presentes en este promotor y en estadios avanzados cuando hay niveles muy bajos de la proteína E2, la expresión de la citocina puede estar controlada por las proteínas E6 y E7, cuya expresión constitutiva en estadios avanzados del cáncer es suficiente para activar al gen de la IL-10 (Figura 32). De esta manera la expresión del gen de IL-10 puede estar regulada por diferentes vías dependiendo de la evolución del cáncer y de la expresión de las proteínas virales.

TABLA 7: ACTIVIDAD DE LAS PROTEINAS E2, E5, E6 Y E7 DE HPV EN LA REGULACION DE PROMOTORES HETEROLOGOS

PROTEINA	FUNCION	REFERENCIA
E2 HPV	Secuencia de reconocimiento ACCN ₆ CGGT Posición 309 -320 región 5' distal de la región no codificante del gen de hIL-10	Haugen et al., 1988. Kube et al., 1995.
E6/E7 HPV 16	Activa al gen de c-fos vía CRE	Morosov et al., 1998.
E6 HPV 16	Modula la transcripción del gen de fibrinectina vía CRE (c-Jun/ATF)	Shino et al., 1997.
E6 HPV 16	Estimula el promotor de TGF- β por medio de secuencias ricas en GC (GGGGcGGGG: Sp1 consenso)	Dey et al., 1997.
E6 HPV 16	Activa el promotor de timidina cinasa por medio de secuencias ricas en GC y la caja CAAT	Desaites et al., 1992.
E6 HPV 16	Transactiva los promotores de la protimosina- α y c-myc.	Kinoshita et al., 1997
E7 HPV 16	Interacciona con TBP.	Phillips & Vousden, 1997.
E7 HPV 16	Reprime la transcripción del gen de fibronectina.	Rey et al., 2000
E5 HPV	Regula el promotor de c-Fos vía NF-1	Show-L et al., 1996.

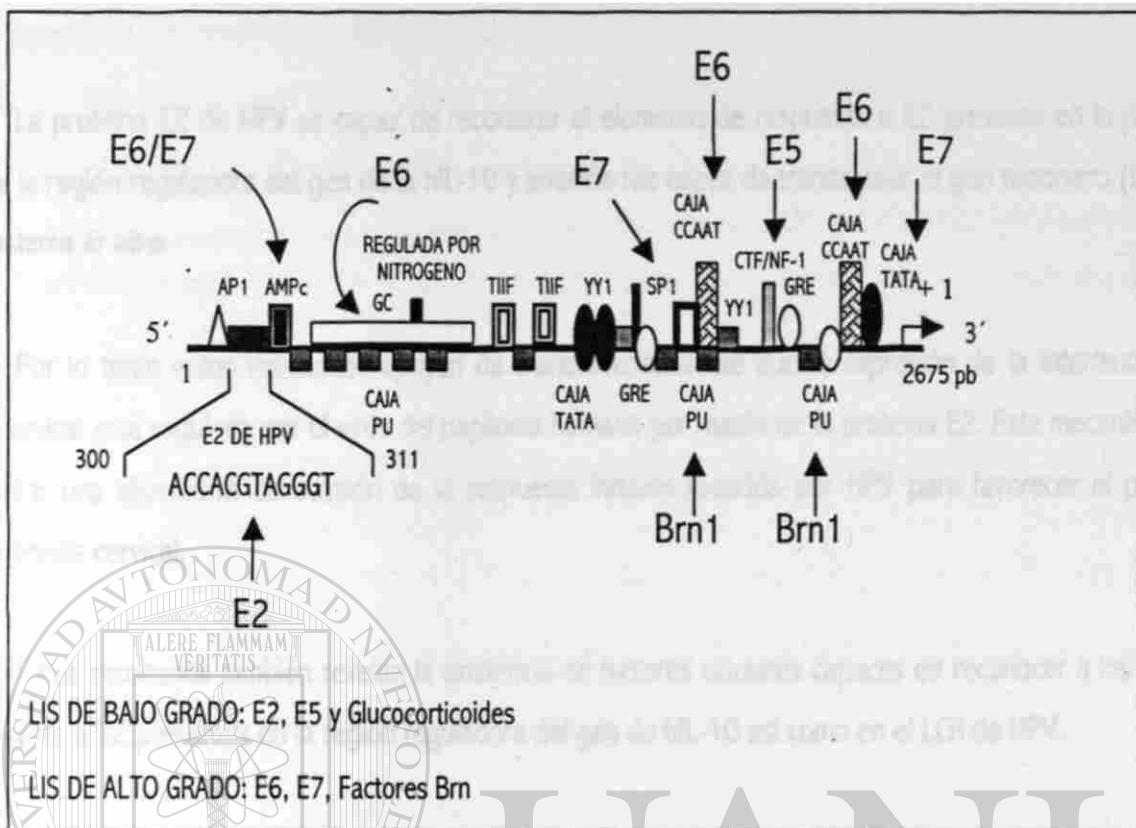


Figura 32: Vías probables de inducción de la expresión de la hIL-10 en cáncer cervical

CONCLUSIONES

La proteína E2 de HPV es capaz de reconocer el elemento de respuesta a E2 presente en la posición 5' distal de la región reguladora del gen de la hIL-10 y además fue capaz de transactivar el gen reportero (Luciferasa) en un sistema *in vitro*.

Por lo tanto estos resultados apoyan de manera consistente que la expresión de la interleucina 10 en cáncer cervical esta regulada por el virus del papiloma humano por medio de la proteína E2. Este mecanismo puede representar una alternativa de evasión de la respuesta inmune inducida por HPV para favorecer el proceso de carcinogénesis cervical.

Estos resultados también revelan la existencia de factores celulares capaces de reconocer a los elementos de respuesta a E2 presentes en la región reguladora del gen de hIL-10 así como en el LCR de HPV.

Adicionalmente, se plantea la posibilidad de nuevas vías de inducción de la expresión de interleucina 10 mediadas por las proteínas virales E5, E6 y E7, además de factores de tipo celular dependiente del desarrollo del cáncer cervical.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PERSPECTIVAS

Caracterizar la proteína nuclear de origen celular presente en las líneas celulares HeLa y C33-A, la cual forma un complejo DNA/Proteína con el elemento de respuesta a E2 presente en la región reguladora del gen de hIL-10, en el LCR de HPV 16 y el consenso par HPV.

Determinar la participación de las proteínas E2 truncadas y su papel activador o represor sobre el gen de hIL-10.

Determinar la participación de las variantes de las proteínas E2 oncogénicas de HPV 16 y su relación en la inducción de la expresión del gen de hIL-10.

Determinar la participación de las proteínas virales E5, E6 y E7 de HPV en la inducción de la expresión de la interleucina 10 en cáncer en un sistema *in vitro*.

Determinar la influencia de los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) presentes en la región reguladora del gen de hIL-10 sobre la inducción del gen de hIL-10.

Determinar si los factores transcripcionales Bm1 y Bm2 están involucrados en regular la expresión del gen de hIL-10 en cáncer cervical.

REFERENCIAS

- Abroi A, Kurg R & Ustav M. Transcriptional and replicational activation functions in the BPV 1 E2 protein are encoded by different structural determinants. *J Virol* 1996;70:6169-6179.
- Alexander KA & Phelps WC. A fluorescence anisotropy study of DNA binding by HPV-11 E2C protein: a hierarchy of E2-binding sites. *Biochemistry* 1996;35:9864-9872.
- Alloul N & Sherman L. Transcription-modulatory activities of differentially spliced cDNAs encoding the E2 protein of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 1999;80:2461-2470.
- Alvarez-Salas LM & Lopez-Bayghen E. Regulacion genetica de los papillomavirus genitales. *Revision de Salud Publica* 1995;37:240-247.
- Androphy EJ, Hubbert NL, Schiller JT & Lowy DR. Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *EMBO J* 1987;6:989-992.
- Angel PE, Allegretto A, Okino ST, Boyle WJ, Hunter T & Karin M. Oncogene Jun encodes a sequences-specific transactivator similar to AP-1. *Nature* 1988;332:166-171.
- Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM & Wheeler CM. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nature Genet* 1994;6:157-162.
- Apt D, Chong T, Lui Y & Bernard HU. Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *J Virol* 1993;67:4455-4463.
- Apt D, Liu Y & Bernard HU. Cloning and functional analysis of spliced isoforms of human nuclear factor I-X: interference with transcriptional activation by NF1/CTF in cell-type manner. *Nucleic Acids Res* 1994;22:3825-3833.
- Arroyo M, Bagchi S & Raychaudhuri. Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2F-cyclin A complex. *Molecular and Cellular Biology* 1993;13(10):6537-6546.
- Auborn KI & Steinberg BM. A key DNA-protein interaction determines the function of the 5' URR enhancer of human papillomavirus type 11. *Virology* 1991;181:132-138.
- Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deining PL, Farrell PL, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson GS, Satchwell SC, Seutin C, Tuffnell PS & Barrell BG. DNA sequence and expression of the B95 Epstein Barr virus genome. *Nature* 1984;310:207-211.
- Baker C & Calef C. Maps of papillomavirus mRNA transcripts, In Myers C, Bernard H-U, Baker A, Halpern A, Delius H & Icenogel J. *Human papillomavirus 1995* Los Alamos Nacional Laboratory. p. III-3-III-20.
- Baker CC & Howley PM. Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. *EMBO J* 1987;6:1027-1035.
- Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gona MA & Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1987;61(4):962-971.
- Baker CC. Sequence analysis of papillomavirus genomes, p.321-385. In M. P. Salzman & PM Howley (ed). *The papovaviridae*, vol. 2. The papillomaviruses. Plenum Press, New York.

- Balkwill F. Cytokines in health and disease. *Immunol Today* 1993;14:149-150.
- Band V, Dalal S, Delmolino L & Androphy EJ. Enhanced degradation of p53 protein in HPV-6 and BPV-1 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *EMBO J* 1993;12:1847-1852.
- Barbosa MS & Weststein FO. The two proteins encoded by the cottontail rabbit papillomavirus E6 open reading frame differ with respect to localization and phosphorylation. *J Virol* 1988;62:1088-1092.
- Barbosa MS & Weststein FO. E2 of cottontail rabbit papillomavirus is a nuclear phosphoprotein translated from an mRNA encoding multiple open reading frames. *J Virol* 1988;62:3242-3249.
- Barbosa MS, Vass WC, Lowy DR & Schiller JT. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *J Virol* 1991;65:292-298.
- Bardford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- Barrera RA, Peralta OZ, Madrid MV. Bases moleculares de la inmunología del cancer. *Revisión de Salud Pública*. 1995;37:344-353.
- Bauknecht T, See RH, & Shi Y. A novel C/EBP β -YY1 complex controls the cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region. *J Virol* 1996;70:7695-7705.
- Belyavski M, Miller J & Wilson V. The bovine papillomavirus E1 protein alters the host cell cycle and growth properties. *Virology* 1994;204:132-143.
- Belyavski M, Westetman M, Dimichele L & Wilson VG. Perturbation of the host cell cycle and DNA replication by the bovine papillomavirus replication protein E1. *Virology* 1996;219:206-219.
- Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F & Yaniv M. The human papillomavirus type 18 (HPV 18) E2 gene products is a repressor of the HPV 18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 1989;63:4317-4324.
- Berry JM & Palefsky JM. Pathogenesis and clinical manifestations of HIV-associated anogenital neoplasia. *AIDS Knowledge Base* 1998;
- Blanco G, Gianello P, Germana S, Baetscher M, Sachs DH & LeGuern C. Molecular identification of porcine interleukin 10: regulation of expression in a kidney allograft model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2800-2804.
- Blankenstein T, Rowley DA & Schreiber H. Cytokines and cancer: experimental systems. *Curr Opin Immunol* 1991;3:694-698.
- Blitz IL & Laimins LA. The 68-kilodalton E1 protein of bovine papillomavirus is a DNA-binding phosphoprotein which associates with the E2 transcriptional activator in vitro. *J Virol* 1991;65:649-656.
- Bochkarev A, Barwell JA, Pfuetzner RA, Furey WJ, Edwards AM & Frappier L. Crystal structure of the DNA-binding domain of the Epstein-Barr virus origin-binding protein EBNA 1. *Cell* 1995;83:39-46.
- Bohm S, Wilczynski SP, Pfister H & Iftner T. The predominant mRNA class in HPV16-infected genital neoplasias does not encode the E6 or the E7 protein. *Int J cancer* 1993;55:791-798.

Bosch FX & Muñoz N. Cáncer del cuello uterino: evidencia epidemiológica actual y nuevas hipótesis sobre los factores de riesgo. *Revisión en Salud Pública*. 1989;1:83-110.

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R & Shah K. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a world-wide perspective. International biological study on cervical cancer study group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.

Bouvard V, Matlashewski G, Gu ZM, Storey A & Bank L. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology* 1994; 203:73-80.

Bouvard V, Storey A, Pim D & Banks L. Characterization of the human papillomavirus e2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J* 1994;13:5451-5459.

Bouvard V, Storey A, Pim D & Banks L. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and repression in cervical keratinocytes. *EMBO J*. 1995;13:5451-5459.

Bream GL, Ohmstede CA & Phelps WC. Characterization of human papillomavirus type 11 E1 and E2 proteins expressed in insect cells. *J Virol* 1993;67:2655-2663.

Breiding D, Sverdrup F, Grossel MJ, Moscufo N, Boonchai W & Androphy EJ. Functional interaction of a novel cellular protein with the papillomavirus E2 transactivation domain. *Mol and Cell Biol* 1997;17:7208-7219.

Breitburd F, Croissant O & Orth G. Expression of human papillomavirus type-1 E4 gene products in warts. *Cancer Cells* 5. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 1987:115-122.

Broder S, Muul L & Waldmann AT. Suppressor cell in neoplastic disease. *J Natl cancer Inst* 1978;61:5.

Broder S, Muul L & Waldmann AT. The suppressor-cell network in cancer. *J Med* 1978;299:1335.

Brown DR, Bryan J, Rodriguez M, Rose RC & Strike DG. Detection of human papillomavirus type 6 and 11 E4 gene products in condylomata acuminatum. *J Med Virol* 1991;34:20-28.

Brown DR, Bryan JT, Rodriguez M & Katz BP. Factors associated with detection of human papillomavirus E4 and L1 proteins in condylomata acuminata. *J Inf Dis* 1992;166:512-517.

Brown DR, Chin MT & Strike DG. Identification of human papillomavirus type 11 E4 gene products in human tissue implants from athymic mice. *Virology* 1988;165:262-267.

Brown DR, Fan I, Jones J & Bryan J. Colocalization of human papillomavirus type 11 E1 (E4 and L1 proteins in human foreskin implants grown in athymic mice. *Virology* 1994;201:46-54.

Bubb V, McCance DJ & Schlegel R. DNA sequence of the HPV-16 E5 ORF and the structural conservation of its encoded protein. *Virology* 1988;163:243-246.

Burk RD, Kadish AS, Calderin S & Romney SL. Human papillomavirus infection of the cervix detected by cervicovaginal lavage and molecular hybridisation: correlation with biopsy results and papanicolaou smear. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:982-989.

- Burnett S, Ström AC, Jareborg N, Alderborn A, Dillner J, Moreno-Lopez J, Pettersson U & Kiessling U. Induction of bovine papillomavirus E2 gene expression and early region transcription by cell growth arrest: Correlation with viral DNA amplification and evidence for differential promoter induction. *J Virol* 1990;64:5529-5541.
- Carbone FR & Bevan MJ. Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J Exp Med* 1990;171:377-387.
- Cid A, Anuewarakul P, Garcia-carranca A, Ovseiovich R, Gaissert H & Gissmann L. Cell-type-specific activity human papillomavirus type 18 upstream regulatory region intransgenic mice and its modulation by tetradecanol phorbol acetate and glucocorticoids. *J Virol* 1993;67:6742-6752.
- Gemens KE, Brent R, Gyuris J & Münger K. Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein in vivo. *Virology* 1995;214:289-293.
- Certant P & Seif I. A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins. *Nature* 1984;311:276-279.
- Coleman N & Stanley M. Analysis of HLA-DR expression on keratinocytes in cervical neoplasia. *Int J Cancer* 1994;56:314-319.
- Coleman N, Greenfield IM, Hare J, Kruger-Gray H, Chain BM & Stanley MA. Characterization and functional analysis of the expression of intercellular adhesion molecule-1 in human papillomavirus-related disease of cervical keratinocytes. *Am J Pathol* 1993;143:355-367.
- Colombo PM & Parmiani G. Tumor-cell-targeted cytokine gene therapy. *Immunol Today* 1999;12:249-250.
- Connor ME & Stern PL. Loss of MHC class I expression in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 1990;46:1029-1034.
- Conrad M, Bubbs VJ & Schlegel R. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* 1993;67:6170-6178.
- Conrad M, Goldstein D, Andersson T & Schlegel R. The E5 protein of HPV-6, but not HPV-16, associates efficiently with cellular growth factor receptors. *Virology* 1994; 200:796-800.
- Corina K, Brossman SR, Barsoum J, Prakash SS, Androphy EJ & Pepinsky RB. The tryptophan bridge is a critical feature of the human papillomavirus E2 DNA binding domain. *Virology* 1993;391-396.
- Cornelissen MT, Smits HL, Briet MA, van den Tweel JG, Struyk AP, van der Noorda J, ter Schegget J. Uniformity of the splicing pattern of the E6/E7 transcripts in human papillomavirus type 16-transformed human fibroblasts, human cervical premalignant lesions and carcinomas. *J Gen Virol* 1990;71:1243-1246.
- Cripe TP, Hugen TH, Turk IP, Tabatabai F, Schmid HJ, Durst M, Gissmann L, Roman A & Turek LP. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocytes-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J* 1987;6:3745-3753.
- Croissant O, Breitbart F & Orth G. Specificity of the cytopathic effect of cutaneous human papillomaviruses. *Clin Dermatol* 1985;3:43-55.

Cromme F, Airey J, Heemels M, Ploegh HL, Keating PJ, Stern PL, Meijer CILM & Walbommers IMM. Loss of transporter proteinases, encoded by the Tap-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J Exp Med* 1994;179:335-340.

Cromme F, Meijer C, Snijders P, Uyterlinde A, Kenemans P, Helmerhous T, Stern PL, van den Brule AIC & Walbommers IMM. Analysis of MHC class I and II expression in relation to presence of HPV genotypes in premalignant and malignant cervical lesions. *Br J Cancer* 1993;67:1372-1980.

Crum CP, Barber S, Symbula M, Snyder K, Saleh AM & Roche JK. Coexpression of the human papillomavirus type 16 E4 and L1 open reading frames in early cervical neoplasia. *Virology* 1990;178:238-246.

Cullen A, Reind R, Campion M & Loicz AT. Analysis of the physical state of different HPV DNA in intraepithelial and invasive neoplasia. *J Virol* 1991;65:606-612.

Curm CP, Barber S & Roche J. Pathobiology of papillomavirus-related cervical diseases: Prospects for immunodiagnosis. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:270-285.

Curran T & Franza BR. Fos and Jun: The AP-1 connection. *Cell* 1988;55:395-397.

Cutchill S, Sibbet GJ & Campo MS. Characterization of a nuclear factor, papillomavirus enhancer binding factor-1, that binds to the long control region of human papillomavirus type 16 and contributes to enhancer activity. *Mol Carcinog* 1993;8:96-104.

Chan SY, Delius H, Halpern AL & Bernard HU. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* 1995;69:3074-3083.

Chan WK, Chong T, Bernard HU & Klock G. Two AP1 sites in the long control region of human papillomavirus type 16 lead to phorbol ester stimulation of the viral E6/E7 promoter. *Nucleic Acids Res* 1990;18:763-769.

Chan WK, Klock G & Bernard HU. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol* 1989; 63:3261-3269.

Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Münger K, Hwoley PM, Phelps WC & Nevins JR. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4549-4553.

Chen CH, Shyu M, Au L, Chu H, Cheng W & Choo K. Analysis of detection of the integrated human papillomavirus 16 sequence in cervical cancer: A rapid multiplex polymerase chain reaction approach. *J Med Virol* 1994;44:206-221.

Chen JJ, Reid CE, Band V & Androphy EJ. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science* 1995;269:529-531.

Chen SL & Mounts P. Transforming activity of E5a protein of human papillomavirus type 6 in NIH 3T3 and C127 cells. *J Virol* 1990;64:3226-3233.

Chen SL, Tsao YP, Yang CM, Lin YK, Huang CH & Kuo SW. Differential induction and regulation of c-jun, junB, junD and c-fos by human papillomavirus type 11 E5a oncoprotein. *J Gen Virol* 1995;76:2653-2659.

- Chiang CM, Broker TR & Chow LT. An E1/E2 fusion protein encoded by human papillomavirus type 11 is a sequence-specific transcription repressor. *J Virol* 1991;65:3317-3329.
- Chiang CM, Dong G, Broker TR & Chow LT. Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *J Virol* 1992;66:5224-5231.
- Chiang CM, Ustav M, Steulund A, Ho TF, Broker TR & Chow LT. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:5799-5803.
- Chin MT, Broker TR & Chows LT. Identification of novel constitutive enhancer element and an associated binding proteins: implications for human papillomavirus type 11 enhancer regulation. *J Virol* 1989;63:2967-2977.
- Choe J, Vaillancourt P, Stenlund A & Botchan M. Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: Structural and functional analysis of new viral cDNAs. *J Virol* 1989;63:1743-1755.
- Chong T, Apt D, Gloss B, Isa M & Bernard HU. The enhancer of human papillomavirus type 16: Binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NFI and Ap-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol* 1991;65:5933-5943.
- Chong T, Chan WK & Bernard HU. Transcriptional activation of human papillomavirus 16 by nuclear factor I, AP1, steroid receptors and a possibly novel transcription factor, PVF: a model for the composition of genital papillomavirus enhancers. *Nucleic Acids Res.* 1990;18:465-470.
- Chow L, Hirichika H, Nasser M, Stoler M, Wolinsky S & Chin M. Human papillomavirus gene expression in papillomaviruses. *Cancer Cells* 1987;5:55-72.
- Chow LT, Nasser M, Wolinsky SM & Broker TR. Human papillomavirus type 6 and 11 MRNAs from genital condylomata acuminata. 1987;61:2581-2588.
- De Villiers E. Heterogeneity of human papillomavirus grup. *J Virol* 1989;63:4898-4903.
- De Waal-Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor C & de Vries J. IL-10 inhibits cytokines synthesis by human monocytes: an autoregulatory role IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-1220.
- De Waal-Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo M-G, te Velde A, Figdor C, Jhanson K, Kastelein & Yssel H. IL-10 and viral IL-10 strongly reduce anti-gen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down-regulation of class II MHC expression. *J Exp Med* 1991;174:915-924.
- DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Lee CM, Marsilio E, Paucha E & Livingston DM. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988;54:275-283.
- Defrance T, Vanbervliet B, Brière F et al., Interleukin 10 and Transforming growth factor beta cooperative to induce anti-CD40-activated native human B cells to secrete immunoglobulins A. *J Exp Med* 1992;175:671-682.
- Del Vecchio AM, Romanczuk H, Howley PM & Baker C. Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J Virol* 1992;66:5949-5958.

Demeret C, Yaniv M & Thierry F. The E2 transcriptional repressor can compensate for SP-1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter. *J Virol* 1994;68:7075-7082.

Demers GW, Foster SA, Halbert CI & Galloway DA. Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papilloavirus 16 E7. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4382-4386.

Desaites C, Hallez S, Van Alphen P & Burney A. Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol* 1992;66:352-333.

Dey A, Atcha IA & Bagchi S. HPV 16 E6 oncoprotein stimulates the transforming growth factor- β 1 promoter in fibroblast through a specific GC-rich sequence. *Virology* 1997;228:190-199.

Dignam JD, Lebovitz RM & Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA pol II in a soluble extract from isolated mammalian nucleic. *Nuc Acids Research*. 1983;11:1475-1489.

DiMaio D. Transforming activity of bovine and human papillomaviruses in cultured cells. *Adv Cancer Res* 1991;56:133-159.

Dong G, Broker TR & Chow LT. Human papillomavirus type 11 E2 protein repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J Virol* 1994;68:1115-1127.

Doorbar J, Coneron I & Gallimore PH. Sequence divergence yet conserved physical characteristics among the E4 proteins of cutaneous human papillomaviruses. *Virology* 1989;172:51-62.

Doorbar J & Myers G. The E4 proteins, in Myres G. (ed). *Human papillomavirus 1996*, p, III-58 Los Alamos National Laboratory, LA-UR 96-3007 (1996).

Doorbar J, Campbell D, Grand RIA & Gallimore Ph. Identification of the human papillomavirus-1^a E4 gene products. *EMBO J* 1986;5:355-362.

Doorbar J, Ely S, Coleman N, Hibma M, Davies DH & Crawford L. Epitope mapped monoclonal antibodies against the HPV 16 E1AE4 protein. *Virology* 1992;187:352-359.

Doorbar J, Evans HS, Coneron I, Crawford LV & Gallimore PH. Analysis of HPV1 E4 gene expression using epitope-defined. *EMBO J* 1988;7:825-833.

Doorbar J, Medcalf M & Naphthine S. Analysis of HPV1E4 complex and their association with keratins in vivo. *Virology* 1996; 218:114-126.

Doorbar J, Parton A, Hartley K, Banks I, Crook T, Stanley M & Crawford L. Detection of novel splicing patterns in a HPV 16-containing keratinocytes cell line. *Virology* 1990;178:254-262.

Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C & Crawford L. Specific interaction between HPV 16 E1AE4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991;352:824-827.

Dostatni N, Lambert PF, Sousa R, Ham J, Howley PM & Yaniv M. The functional BPV-1 E2 transactivating protein can act as repressor by preventing formation of the initiator complex. *Gen Dev* 1991;5:1657-1671.

- Dyson N, Howley PM, Muger K & Harlow E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene products. *Science* 1989;243:934-937.
- Edwards RP, Kuykendall K, Crowley-Nowick P, partridge EE, Shingleton HM & Mestrecky I. T lymphocytes infiltrating advanced grades of cervical neoplasia. CD8-positive cells are recruited to invasion. *Cancer* 1995;76:1411-1415.
- Egawa K, Delius H, Matsukura T, Kawashima M & Villiers de EM. Two novel types of human papillomavirus, HPV 63 and HPV 65: Comparison of their clinical and histological features and DNA sequences to the HPV types. *Virology* 1993;94:51-62.
- Egawa K. New types of human papillomaviruses and intracytoplasmic inclusion bodies: a classification of inclusion warts according to clinical features, histology and associated HPV types. *B J Dermatol* 1994;130:158-166.
- Enk AH & Katz SI. Identification and induction of keratinocyte derived IL-10. *J Immunol* 1992;149:92-95.
- Etscheid BG, Foster SA & Galloway DA. The E6 protein of human papillomavirus type 16 functions as a transcriptional repressor in a mechanism independent of the tumor suppressor protein, p53. *Virology* 1994;205:583-585.
- Evans CH; Flugelman AA & DiPaolo JA. Cytokine modulation of immune defenses in cervical cancer. *Oncology* 1993;50:245-251.
- Fearon RE, Pardoll MD, Itaya T, Golumbek P, Levitsky YH, Simons WJ, Karasuyama H, Vogelstein B & Frost P. Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* 1990;60:397-403.
- Fiorentino DF, Bond MW & Mosmann TR. Two types of mouse T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081-2095.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard MH & O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147:3815-3822.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P et al., IL-10 acts on the antigen presenting cell to inhibits cytokeratine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991;146:344-3451.
- Fletcher C, Heintz N & Roeder RG. Purification and characterization of OTF-1, a transcription factor regulating cell cycle expression of human histone H2b gene. *Cell* 1987;51:773-781.
- Fluckiger A-C, Durand I & Banchereau J. Interleukin 10 induces apoptotic cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *J Exp Med* 1994;179:91-99.
- Forsberg M & Westin G. Enhancer activation by a single type of transcription factor shows cell type dependence. *EMBO J* 1991;10:2543-2551.
- Forsgren A, Suedjelund A & Wigzell H. Lymphocyte stimulation by protein A of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Immunol* 1976;6:207-213.

Foster SA, Demers GW, Etcheid BG & Galloway DA. The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J Virol* 1994;68:5698-5705.

Frazer Y & Tindle R. Cell-mediated immunity to papillomavirus. *Papillomavirus Rep* 1992;3:53-58.

Ferguson A, et al. Expression of MHC products and leucocyte differentiation antigen in gynaecological neoplasms: immunohistological analysis of the tumor cells and infiltrating leucocytes. *Br J Cancer* 1985;52:551-563.

Fuchs P, Girardi F & Pfister H. Human papillomavirus 16 DNA in cervical cancers and in lymph nodes of cervical cancer patients: a diagnostic marker for early metastases. *Int J Cancer* 1989;43:41-44.

Fujikawa K, Furuse M, Uwabe K, Maki H & Yoshie O. Nuclear localization and transforming activity of human papillomavirus type 16 E7-beta-galactosidase fusion protein: characterization of the nuclear localization sequence. *Virology* 1994;204:789-793.

Fujiwara H & Wright TC. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer* 1995;76:1902-1913

Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B & Galloway DA. Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Develop* 1997;11:2090-2100.

Furth PA & Baker CC. An element in the bovine papillomavirus late 3' untranslated region reduces polyadenylated cytoplasmic RNA levels. *J Virol* 1991;65:5806-5812.

Galloway DA & Jenison SA. Characterization of the humoral immune response to genital papillomavirus. *Mol Biol Med* 1990;7:59-72.

Gansbacher B, Zier K, Daniels B, Cronin K, Bannerji R & Gilbag E. Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective. *J Exp Med* 1990;172:1217-1224.

García-Carranca A, Thierry F & Yaniv M. Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J Virol* 1988;62:4321-4330.

Gauthier JM, Dillner J & Yaniv M. Structural analysis of the human papillomavirus type 16-E2 transactivator with antipeptide antibodies reveals a high mobility region linking the transactivation and the DNA-binding domains. *Nucleic Acids Res* 1991;19:7073-7079.

Giri I & Yaniv M. Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J* 1988;7:2823-2829.

Gissman L, Jochmus I, Nindl I & Muller M. Immune response to genital papillomavirus infections in women. Prospects for the development of a vaccine against cervical cancer. *Annu NY Acad Sci* 1993;690:80-85.

Glew SS, et al. HLA class II antigen expression in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Res* 1992;52:40009-4016.

- Glew SS, Duggan KM, Cabrera T & Stern PL. HLA class II antigen expression in human papillomavirus associated cervical cancer. *Cancer Res* 1992;52:4009-4016.
- Gloss B, Bernard HU, Seedorf K & Klock G. The upstream regulatory region of the human papillomavirus-16 contains an E2 protein independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J.* 19987;6:3735-3743.
- Gloss B, Chong T & Bernard HU. Numerous nuclear proteins bind the long control region of human papillomavirus type 16: A subset of 6 of 23 DNaseI-protected segments coincides with the location of the cell-type-specific enhancer. *J Virol* 1989;63:1142-1152.
- Go NF, Castle BE, Barret R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR, Moore KW & Howard M. Interleukin 10 (IL-10), a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med* 1990;172:1625-1631.
- Goodman RE, Oblak J & Bell RG. Synthesis and characterization of rat interleukin-10 (IL-10) cDNA clones from the RNA of cultured OX8- OX22- thoracic duct T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189:1-7.
- Gopalakrishnan V & Khan SA. E1 protein of human papillomavirus type 1^a is sufficient for initiation of viral DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;91:9597-9601.
- Grand RJA, Doorbar J, Smith KJ, Conero I, Gallimore PH. Phosphorylation of human papillomavirus type 1 E4 proteins in vitro. *Virology* 1989;170:201-213.
- Grosseol MJ, Barsoum J, Prakash SS & Androphy EI. The BPV-1 E2 DNA-contact helix cysteine is required for transcriptional activation but not replication in mammalian cells. *Virology* 1996;217:301-310.
- Gu Z & Matlashewski G. Effect of human papillomavirus type 16 oncogenes on MAP kinase activity. *J Virol* 1995;69:8051-8056.
- Hagensee ME, Olson NH, Baker TS & Galloway DA. Three-dimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids. *J Virol* 1994;68:4503-4505.
- Hagensee ME, Yaegashi N & Galloway DA. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 proteins alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 1993;67:315-322.
- Halbert CL, Demers GW & Galloway DA. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J Virol* 1992;66:2125-2134.
- Halpern A & McCance D. Papillomavirus E5 proteins, in Myers G. *Human papillomavirus* 1996, p. III-81, Los Alamos National Laboratory, LA-UR 96-3007 1996.
- Ham J, Dostatni N, Amos F & Yaniv M. Several different upstream promoter elements can potentiate transactivation by the BPV-1 E2 protein. *EMBO J* 1991;10:2931-2940.
- Hash SM, Brown WC & Rice FA. Characterization of a cDNA encoding bovine interleukin 10: kinetic of expression in bovine lymphocytes. *Gene* 1994;139:257-261.

- Haugen TH, Cripe TP, Ginder GD, Karin M & Turek LP. Trans-activation of an upstream early gene promoter of bovine papillomavirus-1 by a product of the viral E2 gene. *EMBO J* 1987;6:145-152.
- Haugen TH, Turek LP, Mercurio FM, Cripe TP, Olson BJ, Anderson RD, Seidl D, Karin M & Schiller J. Sequence-specific and general transcriptional activation by the bovine papilloma virus-1 E2 trans-activation require an N-terminal amphipathic hlx-containing E2 domain. *EMBO J* 1988;7:4245-4253.
- Hawley-Nelson P, Androphy EJ, Lowy DR & Schiller JT. The specific DNA recognition sequence of bovine papillomavirus E2 protein is an E2-dependent enhancer. *EMBO J* 1988;7:525-531.
- Heck DV, Yee CI, Howley PM & Münger. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(10):4442-4446.
- Hegde RS, Grossman SR, Laimins LA & Sigler PB. Crystal structure at 1.7^Å of the bovine papillomavirus-1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. *Nature* 1992;359:505-512.
- Helland A, Borresen A, Ronningent K & Thorsby E. HLA antigens and cervical carcinoma. *Nature* 1992;356:23.
- Hess JF, Fox M, Schmid C & Shen CKJ. Molecular evolution of the human adult alpha-globin-like gene region: insertion and deletion of Alu family repeats and non-Alu DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:5970-5974.
- Hickman ES, Baates S & Vousden KH. Perturbation of the p53 response by human papillomavirus type 16 E7. *J virol* 1997;71:3710-3718.
- Hickman ES, Picksley SM & Vousden KH. Cells expressing HPV16 E7 continue cell cycle progression following DNA damage induced p53 activation. *Oncogene* 1994;9:2177-2181.
- Higgins GD, Uzelin DM, Philips GE, McEvoy P, Marin R & Burrell CJ. Transcription patterns of human papillomavirus type 16 in genital intraepithelial neoplasia: evidence for promoter usage within the E7 open reading frame during epithelial differentiation. *J Gen Virol* 1992;73:2047-2057.
- Hirochika H, Hirochika R, Broker TR & Chow LT. Functional mapping of the human papillomavirus type 11 transcriptional enhancer and its interaction with the trans-acting E2 proteins. *Genes Dev* 1988;2:54-67.
- Hoppe-Seyler F, Butzk & zur Hausen H. Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer the cellular transcription factor Oct-1. *J Virol* 1991;65:5613-5618.
- Howard M & O'Garra A. Biological properties of interleukin 10. *Immunology Today* 1992;13:198-200.
- Hsieh C-S, Heimberger AB, Gold JS et al. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Hsu DH, de Waal MR, Fiorentino DF, Dang MN, Vieira P, de Vries J, Spits H, Mosmann TR & Moore KW. Expression of IL-10 activity by Epstein Barr virus protein BCRF1. *Science* 1990;250:830-832.
- Hsu EM, McNicol PJ, Guijon FB & Paraskevas M. Quantification of HPV-16 E6-E7 transcription in cervical epithelial neoplasia by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Int J Cancer* 1993;55:397-401.

- Hubbert NL, Schiller JT, Lowry DR & Androphy EJ. Bovine papillomavirus transformed cells contain multiple E2 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5864-5868.
- Hubbert NL, Sedman SA & Schiller JT. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J Virol* 1992;66:6237-6241.
- Hubert WG & Lambert PF. The 23-kilodalton E1 phosphoprotein of bovine papillomavirus type 1 is nonessential for stable plasmid replication in murine C127 cell. *J Virol* 1993;67:2932-2937.
- Hudson GS, Bankier AT, Satchwell SC & Barrell BG. The short unique region of the B95 8 Epstein Barr virus genomes. *Virology* 1985;147:81-98.
- Huibregtse JM, Scheffner M & Howley PM. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol* 1993;13:775-784.
- Hummel M, Hudson JB & Laimins LA. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31B in cell lines containing viral episomes. *J Virol* 1992;66:6670-6080.
- Hwang ES, Nottoli T & Dimaio D. The HPV 16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. 1995;211:227-233.
- Iftnet T, Oft M, Böhm S, Wilczynski P & Pfister P. Transcription of the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 in anogenital condylomata is restricted to undifferentiated cell layers of the epithelium. *J Virol* 1992;66:4639-4646.
- Imai Y, Tsunokawa Y, Sugimura T & Terada M. Purification and DNA-binding properties of human papillomavirus type 16 E6 protein expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;164:1402-1410.
- Ishiji T, Lacey MJ, Parkinen S, Anderson RD, Haugen RH, Cripe TP, Xiao JH, Davidson I, Chambon P & Turkek LP. Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific coactivator human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J.* 1992;11:2271-2281.
- Itoh K & Hirohata S. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation and differentiation. *J Immunol* 1995;154:4341-4350.
- Jackson & Campo. Both viral E2 proteins and cellular factor PEBP2 regulate transcription via E2 consensus sites within the bovine papillomavirus type 4 long control region. *J Virol* 1995;69:6038-6046.
- Jackson ME & Campo MS. Both viral E2 protein and cellular factor PEBP2 regulate transcription via E2 consensus sites within the bovine papillomavirus type 4 long control region. *J Virol.* 1995;69:6038-6046.
- Jaraquemada D, Marti M & Long EO. An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J Exp Med* 1990;172:947-954.
- Jareborg N, Anderborn A & Burnett S. Identification and genetic definition of a bovine papillomavirus type 1 E7 protein and the absence of a low-copy-number phenotype exhibited by E5, E6 or E7 viral mutants. *J Virol.* 1992;66:4957-4965.

- Leon S & Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of the E6 and E7 mRNAs: implication for cervical carcinogenesis. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995;92:1654-1658.
- Jones DL & Münger K. Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol* 1997;71:2905-2912.
- Jones DL, Alani RM & Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21^{Cip}-mediated inhibition of cdk2. *Genes & Develop* 1997;11:2101-2111.
- Jones KA, Kadonaga JT, Rosenfeld PJ, Kelly TJ & Tjian R. A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell* 1987;48:79-89.
- Keen N, Elston R & Crawford L. Interaction of the E6 protein of human papillomavirus with cellular proteins. *Oncogene* 1995;9:143-149.
- Kell B, Jewers RJ, Cason J & Best JM. Cellular proteins associated with the E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *Biochem Soc Trans* 1994;22:333S.
- Kell B, Jewers RJ, Cason J, Pakarian F, Kaye JN & Best JM. Detection of E5 oncoprotein in human papillomavirus type 16-positive cervical scrapes using antibodies raised to synthetic peptides. *J Gen Virol* 1994;75:2451-2456.
- Kennedy IM, Haddow JK & Clements JB. A negative regulatory element in the human papillomavirus type 16 genome acts at the level of late mRNA stability. 1991;65:2093-2097.
- Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Khan TA & Moore KW. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol* 1992;148:3618-3623.
- Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissman L, Lowy DR & Schiller JT. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 1993;67:6929-6936.
- Kinoshita T, Shirasawa H, Shino Y, Moriya H, Desbarats L, Eilers M & Simizu B. Transactivation of prothymosin α and c-myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein. *Virology* 1997;232:53-61.
- Klingelutz AJ. Alteration of the DCC tumor-suppressor gene in tumorigenic HPV-18 immortalized human keratinocytes transformed by nitrosomethylurea. *Oncogene* 1993;8:95-99.
- Kolvelman R, Bilter GK, Glezer E, Tsou AY & Barbosa MS. Enhanced transcriptional activation by E2 proteins from the oncogenic human papillomaviruses. *J Virol* 1996;70:7549-7560.
- Kristiansen E, Jenkins A & Holm R. Coexistence of episomal and integrated HPV 16 DNA in squamous cell carcinoma of the cervix. *J Clin Pathol* 1994;47:253-256.
- Kube D, Platzer C, von Knethen A, Straub H, Bohlen H, Hafner M & Tesh H. Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine* 1995;7:1-7.

- Kyo S, Inoue M, Nishio Y, Nakanishe K, Akira S, Inoue H, Yutssudo M, Tanizawa O & Hakura A. NF-IL6 represses early gene expression of human papillomavirus type 16 through binding to the noncoding region. *J Virol* 1993;67:1058-1066.
- Kyo S, Inoue M, Hayasaka N, Inoue T, Yutsudo M, Tanizawa C & Hakura A. Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. *Virology* 1994;200:130-139.
- Lambert PF & Howley PM. Bovine papillomavirus type 1 E1 replication-defective mutants are altered in their transcriptional regulation. *J Virol* 1988;62:4009-4015.
- Lambert PF, Hubbert NL, Howley PM & Schiller JT. Genetic assignment of multiple E2 gene products in bovine papillomavirus-transformed cells. *J Virol* 1989;63:3151-3154.
- Lambert PF, Spalholz BA & Howley PM. A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator. *Cell* 1987;50:69-78.
- Lamberti C, Morrissey LC, Grossman SR & Adrophy EJ. Transcriptional activation by the papillomavirus E6 zinc finger oncoprotein. *EMBO J* 1990;9:1907-1913.
- Larsen Pm, Storgaard L & Fey SJ. Proteins present in bovine papillomavirus particles. *J Virol* 1987;61:3596-3601.
- Lazcano PE, Néjera AP, Alonso RP, Buiatti E & Hernández A. Programa de detección oportuna de cáncer cervical en México: I Diagnóstico situacional. *Cancerología* 1996;42:123-140.
- Lechner MS & Laimins LA. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 1994;68:4262-4273.
- Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, Crook T, Vousden KH & Laimins LA. Human papillomavirus E6 protein binds p53 in vivo and abrogates p53-mediated repression of transcription. *EMBO J* 1992;11:3045-3052.
- Leechanachai P, Banks L, Moreau F & Matlashewski G. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene* 1992;7:19-25.®
- Lehman CW, King DS & Botchan MR. A papillomavirus E2 phosphorylation mutant exhibits normal transient replication and transcription but is defective in transformation and plasmid retention. *J Virol* 1997;71:3652-3665.
- Lehtinen M, Rantala I, Toivonen A, Luoto H, Aine R, Lauslahti K, Ylaoutinen A, Romppanen U & Paavonen J. Depletion of Langerhans' in cervical HPV infection is associated with replication of the virus. *Apms* 1993;101:833-837.
- Leptak C, Ramon Cajal, Kulke R, Horwitz BH, Riese DJ, Dotto GP & DiMaio D. Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. *J Virol* 1992;66:1833.
- Levy Y & Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the Bcl-2 protein. *J Clin Invest* 1994;93:424-428.

- Li R & Botchan MR. The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication. *Cell* 1993;73:1207-1221.
- Li R, Knight J, Bream G, Stenlund A & Botchan M. Specific recognition nucleotides and their DNA context determine the affinity of E2 protein for 17 binding sites in the BPV-1 genome. *Genes Dev* 1989;3:510-526.
- Li R, Knight JD, Jackson SP, Tjian R & Botchan MR. Direct interaction between Sp1 and BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription. *Cell* 1991;65:493-505.
- Li R, Yang L, Fouts E & Botchan MR. Site-specific DNA binding proteins important for replication and transcription have multiple activities. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1993;58:403-413.
- Liang H, Petros AM, Meadows RP, Yoon HS, Egan DA, Water K, Holzman TF, Robins T & Fesik SW. Solution structure of the DNA-binding domain of human papillomavirus E2 protein evidence for flexible DNA-binding regions. *Biochemistry* 1996;35:2095-2103.
- Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL & Harrison SC. Structure of simian virus 40 at 3.8 resolution. *Nature* 1991;354:278-284.
- Locker J, Buzard G. A dictionary of transcription control sequences. *DNA Sed J DNA Sed Map* 1990;1:3.
- Loeffler CM, Smyth MJ, Longo DL, Koop WC, Harvey LK, Tribble HR, Tase JE, Urba WJ, Leonard AS, Young HA, Ochoa AC. Immunoregulation in cancer-bearing hosts: down-regulation of gene expression and cytotoxic function in CD8+ T cells. *J Immunol* 1992;149:949.
- Lusky M & Botchan MR. A bovine papillomavirus type 1-encoded modulator function is dispensable for transient viral replication but is required for the establishment of the stable plasmid state. *J Virol* 1986;60:729-742.
- Lusky M & Fontane. Formation of the complex of bovine papillomavirus E1 and E2 proteins is modulated by E phosphorylation and depends sequences within the carboxyl terminus of E1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6363-6367.
- Lusky M, Hurwitz J & Seo YS. Cooperative assembly of the bovine papillomavirus E1 and E2 proteins on the replication origin requires an intact E2 binding site. *J Biol Chem* 1993;268:15775-15803.
- Mack DH & Laimins LA. A Keratinocyte specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP-1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9102-9106.
- MacNeil I, Suda T, Moore KW, Mosmann TR, Zlotnik A. IL-10: a novel cytokine growth cofactor for mature and immature T cells. *J Immunol* 1990;145:4167-4173.
- Malejczyk J, Malejczyk M, Majewski S, Orth G & Jablonska S. NK-cell activity in patients with HPV16-Associated anogenital tumors: defective recognition of HPV 16 harboring keratinocytes and restricted unresponsiveness to immunostimulatory cytokines. *Int J Cancer* 1993;54:917-921.
- Malik STA, Naylor SM, Eass N, Oliff A & Balkwill FR. Epithelial ovarian cancer; a cytokine propelled disease?. *1990;26:1031-1034.*

- Mallon RG, Wojciechowicz D & Defendi V. DNA-binding activity of papillomavirus proteins. *J Virol* 1987;61:1655-1660.
- Man S. Human cellular immune responses against human papillomavirus in cervical neoplasia. *Rev Mole Med* 1998;3:1-19.
- Marston et al. Interaction of p53 with MDM2 is independent of E6 and does not mediate wild type transformation suppressor function. *Oncogene* 1994;9:2707-2716.
- Massini P, Pim D, Storey A & Banks L. HPV-16 E7 and adenovirus E1a complex formation with TATA box binding protein is enhanced by casein II phosphorylation. *Oncogene* 1996;12:2325-2330.
- Matsukura T, Koi S, Sugase M. Both integrated and non-integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers. *Virology* 1989;172:63-72.
- May M, Dong XP, Beyer-Flinkler E, Stunnenrauch F, Fuchs PG & Pfister H. The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J* 1994;13:1460-1466.
- Mazzarelli JM, Atkins GB, Geisberg IV & Ricciardi RP. The viral oncoproteins Ad5E1A, HPV16 E7 and SV40 Tag bind a common region of the TBP-associated factor-110. *Oncogene* 1995;11:1859-1864.
- McBride A & Myers G. The E2 proteins
- McBride AA & Howley PM. Bovine papillomavirus with a mutation in the E2 serine 301 phosphorylation site replicates at a high copy number. *J Virol* 1991;65:6528-6534.
- McBride AA, Androphy E & Münger K. In Myers G. (ed.), *Viral regulatory structures and their degeneracy*. Addison-Wesley (1997).
- McBride AA, Bolen JB & Howley PM. Phosphorylation sites of the E2 transcriptional regulatory proteins of bovine papillomavirus type 1. *J Virol* 1989;63:5076-5085.
- McBride AA, Bryne JC & Howley PM. E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: Transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:510-514.
- McBride AA, Klausner RD & Howley PM. Conserved cysteine residue in the DNA-binding domain of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein confer redox regulation of the DNA-binding activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7531-7535.
- McBride AA, Romanczuk HR & Howley PM. The papillomavirus E2 regulatory proteins *J Biol Chem* 1991;266:18411-18414.
- McIntyre MC, Ruesch MN & Laimins A. Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology* 1996;215:73-82.
- Meanwell CA, Cox MF, Blackledge G & Maintians NJ. HPV 16 DNA and malignant cervical epithelium: implications for the etiology and behavior of cervical neoplasia. *Lancet* 1987;28:703-707.

- Meneguzzi G, Lathe R, Kiery MP & Vogt N. The E2 trans-activating protein of bovine papillomavirus type 1 (BPV1) serine-phosphorylated in vivo. *Oncogene* 1989;4:1285-1290.
- Moal Le MA, Yaniv M & Thierry F. The bovine papillomavirus type 1 (BPV1) replication protein E1 modulates transcriptional activation by interacting with BPV 1E2. *J Virol* 1994;68:1085-1093.
- Moan E & Mathews MB. Multiple functional-domains in the adenovirus E1A gene. *Cell* 1987;48(2):177-178.
- Mohr II, Clark R, Sun S, Adrophy AJ, MacPherson P & Botchan MR. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 1990;250:1694-1699.
- Mok YK, de Prat GG, Butler PJ & Bycroft M. Equilibrium dissociation and unfolding of the dimeric human papillomavirus strains-16 E2 DNA-binding domain. *Protein Sci* 1996;5:310-319.
- Monini P, Grossman SR, Pepinsky B, Adrophy EJ & Laimins LA. Cooperative binding of the E2 protein of bovine papillomavirus to adjacent E2-responsive sequences. *J Virol* 1991;65:2124-2130.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P & Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165-190.
- Moore KW, Roussel F & Banchereau J. Evolving principles in immunopathology: interleukin 10 and its relationship to Epstein Barr virus protein BCRF1. *Springer Semin Immunopathol* 1991;13:157-166.
- Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA & Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein Barr virus gene BCRF1. *Science* 1990;248:1230-1234.
- Morelli AE, Sananes C, Di PG, Paredes A & Fainboim L. Relationship between types of human papillomavirus and Langerhans' cells in cervical condyloma and intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 1993;99:200-206.
- Morosov A, Phelps CW & Raychaudhuri P. Activation of the c-fos gene by the HPV16 oncoprotein depends upon the cAMP-response elements at -60. *J Biol Chem* 1994;269:18434-18440.
- Morozov A, Shiyonov P, Barr E, Leiden JM & Raychaudhuri P. Accumulation of human papillomavirus type 16 E7 protein bypasses G1 arrest induced by serum deprivation and by the cell cycle inhibitor p21. *J Virol* 1997;71:3451-3457.
- Morrison EAB. Natural history of cervical infection with human papillomaviruses. *Clin Infect Dis* 1994;18:172-180.
- Morrison EA, Ho GYF, Vermund SH et al. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasias: A case-control study. *Int J Cancer* 1991;49:6-13.
- Moscicki & Herman. Abstract 47, 14th International papillomavirus conference, Quebec, 23-28 July 1995.
- Mosmann TR & Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-173.
- Mosmann TR & Moore KW. The role of IL-10 in cross-regulation of Th1 and Th2 responses. *Immunol Today* 1991;12:A49-A53.
- Mosmann TR. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 1994;56:1-26.

Muller F, Giroglou T & Sapp M. Characterization of the DNA-binding activity of the E1 and E2 proteins and E1/E2 complex of human papillomavirus type 33. *J Gen Virol* 1997;78:911-915.

Münger K & Halpern A. E7: Primary structure and biological properties, in this volume, p. III-17.

Münger K & Phelps WC. The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. *Biochimica et Biophysica Acta* 5 1993;1155(1):111-123.

Münger K, Yee CL, Phelps WC, Pietsenpol JA, Moses HL & Howley PM. Biochemical and biological differences between E7 oncoproteins of the high- and low-risk human papillomavirus types are determined by amino-terminal sequences. *J Virol* 1991;65:3943-3948.

Myers G & Androphy E. The E6 proteinase, in Myers G. (ed). *Human papillomavirus 1995*, p.III-47. Los Alamos National Laboratory, LA-UR 95-3675 (1995).

Nasseri M, Gage JR, Lorincz A & Wettstein FO. Human papillomavirus type 16 immortalized cervical keratinocytes contain transcripts encoding E6, E7, and E2 initiated at the P97 promoter and express high levels of E7. *Virology* 1991;184:131-140.

Nasseri M, Hirochika R, Broker TR & Chows L. A human papillomavirus type 11 transcript encoding an E1/E4 protein. *Virology* 1987;433-439.

Neary K & DiMaio D. Open reading frames E6 and E7 of bovine papillomavirus type 1 are both required for full transformation of mouse C127 cells. *JVI* 1989;63:259-266.

Nevins JR. E2F: A link between the RB tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 1992;258:424-442.

Nilsson CH, Bakos E, Perry KU, Schneider A & Durst M. Promoter usage in the E7 ORF of HPV16 correlates with epithelial differentiation and is largely confined to low-grade genital neoplasia. *Int J Cancer* 1996;65:6-12.

Nordt-Weber RM, Henschler R, Schott E, Wehinger J, Behringer D & Mertelsmann R. Interleukin-10 increases Bcl-2 expression and survival in primary human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996;88:2549-2558.

Nuchtern JG, Biddison WE & Klausner RD. Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature* 1990;343:74-76.

O'Garra A, Chang R, Go N, Hasting R, Haugton G & Howard M. Ly 1B (B 1) cells are the main source of B-cell derived IL-10. *Eur J Immunol* 1992;22:711-717.

O'Garra A, Stapleton G, Dhar V, Pearce M, Schumacher J, Rugo H, Barbis D, Stall A, Cupp J, Moore K, Vieira P, Mosmann T, Whitmore A, Arnold L, Haugton G & Howard M. Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal Bcell produce interleukin 10. *Int Immunol* 1990;2:821-832.

O'Connor M & Bernard M. Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NF1 at a conserved composite regulatory elements. *Virology* 1995;207:77-88.

- O'Connor M, Chan S-Y & Bernard H-U. Transcription factor binding sites in LCR of genital HPVs, in Myers G. (ed). Human papillomavirus 1995, p. III-21, Los Alamos National Laboratory, LA-UR 95-UR 95-3675 (1995).
- O'Connor M, Chan SY & Bernard HU. Transcription factor binding sites in the long control region of the genital HPVs, In Myers G, Bernard H, Baker C, Halpern A, Delius H & Icenogel J. Human papillomavirus 1995. Los Alamos National Laboratory p. III-21-III-40.
- Oelze I, Kartenbeck J, Crusius K & Alonso A. Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line. 1995;69:4489-4494.
- Oettgen FH. Cytokines in clinical cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 1991;3:699-705.
- Offord EA & Beard P. A member of the activator protein 1 family found in keratinocytes but not in fibroblasts required for transcription from a human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9102-9106.
- Oliff A, Defeo-Jones D, Boyer M, Martinez D, Kiefer D, Vuocolo G, Wolfe A & Sacher HS. Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. *Cell* 1987;50:555-563.
- Orth G, Breitburd F & Favre M. Evidence for antigenic determinants shared by the structural polypeptides of rabbit papillomavirus and human papillomavirus type 1. *Virology* 1978;91:243-255.
- Ostrow RS, Liu Z, Schneider JF, McGlennen RC, Forslund K & Faras AJ. The products of the E5, E6 or E7 open reading frames of RhPV 1 can individually transform NIH 3T3 cells or in cotransfections with activated ras can transform primary rodent epithelial cells. *Virology* 1993;196:861-867.
- Pagano M, Durst M, Joswig S, Draetta G & Jensen-Durr P. Binding of human E2F transcription factor to the retinoblastoma protein but not to cyclin A is abolished in HPV-16-immortalized cell. *Oncogene* 1992;7:1681-1686.
- Palermo-Dilts DA, Broker TR & Chows LT. Human papillomavirus type 1 produces redundant as well as polycistronic mRNAs in plantar warts. *J Virol* 1990;64:3144-3149.
- Pater MM, Hughes GA, Hyslop DE, Nakshatri H & Patern A. Glucocorticoid-dependent oncogenic transformation by type 16 but not by type 11 human papillomavirus DNA. *Nature* 1988;335:832-835.
- Patrick DR, Oliff A & Heimbrook DC. Identification of the novel retinoblastoma gene product binding site of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J Biol Chem* 1994;269:6842-6850.
- Pepinsky RB, Prakash SS, Corina K, Grossel MJ, Barsoum J & Androphy EI. Sequence flanking the core DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E2 contribute to DNA-binding function. *J Virol* 1997;71:828-831.
- Pfister H. The role of human papillomavirus in anogenital cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1996;23:579-595.
- Phelps W & Howley PM. Transcriptional transactivation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product. *J Virol* 1987;61:1630-1638.

Phelps WC, Bagchi S, Barnes JA, Raychaudhuri P, Kraus V, Münger K, Howley PM & Nevins JR. Analysis of transactivation by the human papillomavirus 16 E7 and adenovirus 12S E1A suggests a common mechanism. *J Virol* 1991;65:6922-6930.

Phelps WC, Yee CL, Münger K & Howley. The human papillomavirus type E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 1988;53:539-547.

Phillips AC & Vousden KH. Analysis of the interaction between human papillomavirus type 16 E7 and TATA-binding protein, TBP. *J Gen Virol* 1997;78:905-909.

Pietenpol JA, Stein RW, Moran E, Yaciuk P, Schlegel R, Lyons RM, Pittelkow MR, Münger K, Howley PM & Moses HL. TGF-beta 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRb binding domains. *Cell* 1990;61:777-785.

Piirson M, Ustav E, Mandel T, Stenlund A & Ustav M. Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. *EMBO J* 1996;15:1-11.

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

Prakash SS, Grossman SR, Pepinsky RB, Laimins LA & Androphy EJ. Amino acids necessary for DNA contact and dimerization imply novel motifs in the papillomavirus E2 transactivator. *Gene Dev* 1992;6:105-116.

Pray TR & Laimins LA. Differentiation-dependent expression of E1(E4 proteins in cell lines maintaining episomes of human papillomavirus type 31b. *Virology* 1995;206:679-685.

Rank NM & Lambert PF. Bovine papillomavirus type 1 E2 transcriptional regulators directly bind two cellular transcription factors, TFIID and TFIIB. *J Virol* 1995;69:6323-6334.

Rawls JA, Pusztain & Green. Chemical synthesis of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein: autonomous protein domains for induction of cellular DNA synthesis and for trans activation. *J Virol* 1990;64:6121-6129.

Reley LB, Pellis NR, Schantz SP, Freedman RS, Balch CM & Itoh K. Humoral modulation of lymphokine-activated killer (LAK)-cell induction in human: IgG-related and non-IgG inhibitors in sera from cancer patients. *Int J Cancer* 1990;46:785

Riese DJ, Settleman J, Neary K & DiMaio D. Bovine papillomavirus E2 repressor mutant display a high-copy-number phenotype and enhanced transforming activity. *J Virol* 1990;64:944-949.

Roberts S, Ashmole I, Gibson L, Rookes SM, Barton GI & Gallimore PH. Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: Identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. 1994;68:6432-6455.

Roberts S, Ashmore I, Sheehan TMT, Davies AH & Gallimore PH. Human papillomavirus type 1 E4 is a zinc binding protein. *Virology* 1994;202:865-874.

Roberts S, Ashmole I, Johnson GD, Kreider JW & Gallimore PM. Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology* 1993;197:176-187.

- Rogel-Gailard C, Pehau-Arnaudet G, Breitbart F & Orth G. Cytopathic effect in human type 1-induced inclusion warts: In vitro analysis of the contribution of two forms of the viral E4 protein. *J Invest Dermatol* 1993;101:843-851.
- Rogel-Gailard C, Breitbart F & Orth G. Human papillomavirus type 1 E4 proteins differing by their N-terminal ends have distinct cellular locations when transiently expressed in vitro. *J Virol* 1992;66:816-823.
- Rohlf M, Winkenbach S, Meyer S, Rupp T & Durst M. Viral transcription in human keratinocyte cell immortalized by human papillomavirus type-16. *Virology* 1991;183:331-342.
- Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. *Int Arch Allergy Immunol* 1992;98:279-285.
- Romanczuk H, Thierry F & Howley PM. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 17 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol* 1990;64:2849-2859.
- Rosl et al. Differential regulation of the JE gene encoding the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in cervical carcinoma cells and derived hybrids. *J Virol* 1994;68:2142-2150.
- Roth EJ, Krurz B, Liang L, Hasen CL, Dameron CT, Winge DR & Smotkin D. Metal thiolate coordination in the E7 proteins of human papillomavirus 16 and cottontail rabbit papillomavirus as expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1992;267:16390-16395.
- Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW & Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for Activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1890-1893
- Royer HD, Freyaldenhoven MP, Napierski I, Spitkovsky DD, Bauknecht T & Dathan N. Delineation of human papillomavirus type 18 enhancer binding proteins: The intracellular distribution of a novel octamer binding protein p92 is cell cycle regulated. *Nucleic Acids Res* 1991;19:2363-2371.
- Rusech MN & Laimins LA. Initiation of DNA synthesis by human papillomavirus E7 oncoproteins is resistant to p21-mediated inhibition of cyclin E-cdk2 activity. *J Virol* 1997;71:5570-5578.
- Russell JS & Botchan MR. Cis-acting components of human papillomavirus (HPV) DNA replication: linker substitution analysis of the HPV type 11 origin. *J Virol* 1995;69:651-660.
- Russell JS. Lymphokine gene therapy for cancer. *Immunol Today* 1990;11:196-200.
- Russell SJ, Eccles SA, Flemming CL, Johnson CA & Collins MKL. Decreased tumorigenicity of a transplantable rat sarcoma following transfer and expression of an IL-2 cDNA. *Int J Cancer* 1991;47:244-251.
- Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL & Bloom BR. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4+ and CD8 T cell clones. *Science* 1991;254:279-282.
- Sanders CM & Maitland NJ. Kinetic and equilibrium binding studies of the human papillomavirus type 16 transcription regulatory protein E2 interacting with core enhancer elements. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4890-4897.

Sanders CM, Stern PL & Maitland NJ. Characterization of human papillomavirus type 16 E2 protein and subdomain expressed in insect cells. *Virology* 1995;211:418-433.

Sandler AB, Vande Pol SB & Spalholz BA. Repression of bovine papillomavirus type 1 transcription by the E1 replication protein. *J Virol* 1993;67:5079-5087.

Santoro C, Mermod N, Andrews PC & Tjian R. A family of human CAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature* 1988;334:218-224.

Santucci S, Adrophy E, Bonne-Andrea C & Clerfant P. Proteins encoded by the bovine papillomavirus E1 open reading frame: expression in heterologous systems and in virally transformed cells. *J Virol* 1990;64:6027-6039.

Sasaga T, Pushko P, Steers G, Gschmeissner SE, Hajibagheri MA, Finch J, Crawford L & Tommasino M. Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomavirus type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology* 1995;206:126-135.

Sawadogo M. RNA polymerase B (II) and general transcription factors. *Annu Rev Biochem* 1990;59:711-754.

Swartz E, Freese UK, Gissman L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A & zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314:111-114.

Scheffner M, Romanczuk H, Munger K, Huibregtse JM, Mietz JA & Howley PM. Functions of human papillomavirus proteins. *Curr Topics Microbiol Immunol* 1994;186:83-99.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ & Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990;63:1129-1136.

Schiffman MH. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:394-398.

Schneider-Gradicke A & Schwarz E. Different human cervical carcinoma lines show similar transcription patterns of the human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J* 1986;5:2285-2292.

Sedman J & Stenlund A. Co-operative interaction between the initiator e1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus *in vivo* and *in vitro*. *EMBO J* 1995;14:6219-6228.

Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, Hubbert NI, Haas JA, Lowy DR & Schiller JT. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and transactivating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* 1991;65:4860-4866.

Seto E, Usheva A, Zambetti GP, Momand J, Horikoshi N, Weinman R et al. Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:12028-12032.

Sheffner Munger K, Huibregtse JM & Howley PM. Targeted degradation of the retinoblastoma protein by human papillomavirus E6-E7 fusion proteins. *EMBO J* 1992;11:2425-2431.

Sherman L & Alkoul N. Human papillomavirus type 16 expresses a variety of alternatively spliced mRNA putatively encoding the E2 protein. *Virology* 1992;191:953-959.

Sherman L, Allou N, Golan I, Durst M & Baram A. Expression and splicing patterns of human keratinocytes immortalized by HPV 16, and in cell lines established from cervical cancers. *Int J Cancer* 1992;50:356-364.

Shino Y, shirasawa H, Kinoshita T & Simizu B. Human papillomavirus type 16 e6 protein transcriptionally modulates fibronectin gene expression by induction of protein complex binding to the cyclic AMP response element. *J Virol* 1997;71: 4310-4318.

Shirasawa H, Jin MH, Shimizu k, Akutsu N, Shino Y & Simizu B. Transcription modulatory activity of full-length E6 and E6*1 proteins of human papillomavirus type 16. *Virology* 1994;203:36-42.

Show-Li C, ying-kuang L, Long-yuan L, Yeou-Ping T, Hsiang-Yun L, Won-Bo W & Tzung-Chieh T. E5 proteins of human papillomavirus types 11 and 16 transactivate the c-fos promoter through the NF1 binding element. *J Virol*. 1996;70:8558-8563.

Sibbet GJ & Campo MS. Multiple interactions between cellular factors and non-coding region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 1990;71:2699-27077.

Skiadopoulos MH & McBride AA. The BPV-1 E2 transactivator and E2-TR repressor use different nuclear localization signals. *J Virol* 1996;70:1117-1124.

Slebos RIC, Lee MH, Plunkett BS, Kessis TD, Williams BO, Jacks T, Hedrick L, Kastan MB & Cho KR. p53-dependent G(1) arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5320-5324.

Smotkin D, Prokoph H & Wettstein FO. Oncogenic and nononcogenic human genital papillomavirus generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J Virol* 1989;63:1441-1447.

Snijders PIF, van den Brule AIC, Schrijnemakers HFI, Raaphorst PMC, Meijer CLM & Walboomers JMM. Human papillomavirus type 33 in a tonsillar carcinoma generates its putative E7 mRNA via two E6* transcript species which are terminated at different early region poly (A) sites. *J Virol* 1992;66:3172-3178.

Spalholz BA, Lambert PF, Yee CL & Howley PM. Bovine papillomavirus transcriptional regulation: localization of the E2-response elements of the long control region. *J Virol* 1987;61:2128-2137.

Spalholz BA, Yang YC & Howley PM. Transactivation of a bovine papilloma virus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell* 1985;42:183-191.

Spalholz BA, Yang YC & Howley. Transactivation of bovine papilloma virus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell* 1985;42:183-191.

Speidel K et al. Priming cytotoxic T lymphocytes by five heat-aggregated antigens in vivo: conditions, efficiency, and relation to antibody responses. *Eur J Immunol* 1997;27:2391-2399.

Steger G, Ham J, Lefebvre O & Yaniv M. The bovine papillomavirus 1 E2 protein contains two activation domains: one that interacts with TBP and another that functions after TBP binding. *EMBO J* 1995;14:329-340.

Sterling JC, Skepper JN & Stanley Ma. Immunoelectron microscopical localization of the human papillomavirus type 16 L1 and E4 proteins in cervical keratinocytes cultured in vitro. *J Invest Dermatol* 1993;100:154-158.

Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ & McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol* 1993;67:4521-4532.

Stubenrauch F, Malejczyk J, Fuchs PG & Pfister H. Late promoter of human papillomavirus type 8 and its regulation. *J Virol* 1994;66:3485-3493.

Suda T, O'Garra A, MacNeil I et al., Identification of a novel thymocytes growth-promoting factor derived from B cell. *Cell Immunol* 1990;129:228-240.

Sun S, Thorner L, Lentz M, MacPherson P & Botchan M. Identification of a 68-kilodalton nuclear ATP-binding phosphoprotein encoded by bovine papillomavirus type 1. *J virol* 1990;64:5093-5105.

Sverdrup F & Khan SA. Two E2 binding sites alone are sufficient to function as the minimal origin of replication of human papillomavirus type 18 DNA. *J Virol* 1995;69:1319-1323.

Sverdrup F & Myers G. The E1 proteins p. III-37.

Taja-Chayeb L, Salas M & Salcedo M. Bases moleculares de la carcinogenesis viral del papiloma y polioma. *Revisión de Salud Publica*. 1996;30:47-57.

Tamanoi F & Stillman BW. Initiation of Adenovirus DNA replications in vitro requires a specific DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci* 1983;80:6446-6450.

Tan SH, Leong LE, Walker PA & Bernard HU. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIIID. *J Virol* 1994;68:6411-6420.

Tay SK, et al. Subpopulation of Langerhans cells in cervical neoplasia. *Br. J. Obstet gynaecol* 1987;94:10-15. ®

Ter Schegget J & van der Noordaa J. Proteinase phosphatase 2^a and the regulation of human papillomavirus gene activity. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;186:121-129.

Thain A, Jenkins O, Clarke AR & Gaston K. CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *J Virol* 1996;70:7233-7235.

Thain A, Webster K, Emery D, Clarke AR & Gaston K. DNA binding and bending by the human papillomavirus type 16 E2 protein. Recognition of an extended binding site. *J Biol Chem* 1997;272:8236-8242.

The Bethesda System Editorial Committee. The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: Report of the 1991 Bethesda workshop. *Hum Pathol* 1992;23:719-721.

Thierry F & Howley PM. Functional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P105 promoter. *New Biol* 1991;3:90-100.

- Thierry F, Spryrou G, Yaniv M & Howley PM. Two AP1 sites binding junB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J Virol* 1992;66:3740-3748.
- Thorner L, Bucay N, Choe J & Botchan M. The product of the bovine papillomavirus type 1 modulator gene (M) is a phosphoprotein. *J Virol*. 1988;2474-2482.
- Tomita Y, Fuse A, Sekine H et al., Human papillomavirus type 6 and 11 E4 gene products in condyloma acuminata. *J Gen Virol* 1991;72:731-734.
- Tosi P et al. Prognostic factor in invasive cervical carcinoma associate with human papillomavirus (HPV). *Path Res Pract* 1992;188:866-873.
- Townsend A & Bodmer H, Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1989;7:601
- Turek LP. The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. *Adv Virus Res* 1994;44:305-356.
- Ushikai M, Lacey MI, Yamakawa Y, Kono M, Anson J, Ishiji T, Parkkinen S, Wicker N, Valentine M, Davison I, Turek LP & Haugen TH. trans Activation by full-length E2 proteins of human papillomavirus type 16 and bovine papillomavirus type 1 in vitro and in vivo: Cooperation with activation domain of cellular transcription factors. *J Virol* 1994;68:6655-6666.
- Ustav M & Stenlund A. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by E1 and E2 open reading frames. *EMBO J* 1991;10:449-457.
- Valle GF & Bank L. The human papillomavirus (HPV)-6 and HPV-16 E5 proteins co-operate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells. *J Gen Virol* 1995;76:1239-1245.
- Van Ranst M, Kaplan JB, Burk RD. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestation. *J Gen Virol* 1992;73:2653-2660.
- Vande Pol SB & Howley PM. Negative regulation of the bovine papillomavirus E5, E6 and E7 oncogenes by the viral E1 and E2 genes. *J Virol* 1995;69:395-402.
- Vernon SD, Holmes KK & Reeves WC. Human papillomavirus infection and associated disease in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clinic Infect Diseases* 1995;(Supp11):S121-S124.
- Viac J, Soler C, Chardonnet Y, Euvrard S & Schmitt D. Expression of immune associated surface antigens of keratinocytes in human papillomavirus-derived lesions. *Immunobiology* 1993;188:392-402.
- Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang M-N, Johnson KE, Kastelein R, Fiorentino DF, de Vries JE, Roncarolo MG, Mosmann TR & Moore KW. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF/IL10) cDNA clones: homology to Epstein Barr virus open reading frames BCRF1. *Proc Natl Acad Sc USA* 1991;88:1172-1176.
- Volpers C, Schirmacher P, Streeck RE & Sapp M. Assembly of the major and minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particules and tubular structures in insect cells. *Virology* 1994;200:504-512.

- Vousden KH, Vojtesek B, Fisher C & Lane D. HPV-16 E7 or adenovirus E1A can overcome the growth arrest of cells immortalized with a temperature-sensitive p53. *Oncogene* 1993;1697-702.
- Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snuders PJF, Peto J, Meijer CILM & Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.
- Wank R & Thomssen C. High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQW3. *Nature* 1991;352:723-725.
- Watanabe S, Sato H, Komiyama N, Kanda T & Yoshiike K. The E7 functions of human papillomaviruses in rat 3Y1 cells. *Virology* 1992;187:107-114.
- Waters CM, Overholser KA, Sorkin A & Carpenter G. Analysis of the influences of the E5 transforming protein on kinetic parameters of epidermal growth factor binding and metabolism. *J Cell Phys* 1992;152(2):253-263.
- Wazer DE, Liu XL, Chu Q, Gao Q & Band V. immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papillomavirus 16 E6 or E7. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3687-3691.
- Werness BA, Levine AJ & Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*;248:76-79.
- Winokur PL & McBride AA. Separation of the transcriptional activation and replications functions of the bovine papillomavirus-1 E2 protein. *EMBO J* 1992;11:4111-4118.
- Wu EW, Clemens KE, Heck DV & Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein and cellular transcription factor E2F bind to separate sites on the retinoblastoma tumor suppressor protein. *J Virol*. 1993;67:2402-2407.
- Wu TC & Kurman RJ. Analysis of cytokine profiles in patients with human papillomavirus-associated neoplasms. *J Nat Cancer Inst* 1997;89:185-187.
- Wu TC, Immunology of the human papillomavirus in relation to cancer. *Curr Opin Immunol* 1994;6:746-754.
- Xi SZ & Banks LM. Baculovirus expression of the human papillomavirus type 16 capsid proteins: detection of L1-L2 protein complexes. *J Gen Virol* 1991 ;72:2981-2988.
- Yamamura M, Modlin LR, Ohmen JD & Moy LR. Local expression of antiinflammatory cytokines in cancer. *J Clin Invest* 1993;91:105-110.
- Yang L, Li R, Mohr U, Clark R & botchan MR. Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. *Nature* 1991;353:628-632.
- Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R & Howley PM. Presence and expression of human papillomavirus sequence in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 1985;119:361-366.
- Yssel H, de Waal Malefyt R, Roncarolo M-G, Abrams JS, Lahesman R, Spits H, de Vries J. Interleukin 10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. *J Immunol*.
- Zdanov A, Schalk-Hihi C, Gustchina A, Tsang M, Weatherbee J & Wlodawer A. Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon γ *Structure* 1995;3:591-601.

Zemlo TR, Lohrbach B & Lambert PF. Role of transcriptional repressors in transformation by bovine papillomavirus type 1. *J Virol* 1994;68:6787-6793.

Zheng et al. Keratinocyte growth factor is a bifunctional regulator of HPV 16 DNA-immortalized cervical epithelial cells. *J Cell Biol* 1995;129:843-851.

Zhou J, Doorbar J, Sun XJ, Crawford LV, McLean CS & Frazer IH. Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 6 L1 proteins. *Virology* 1991;185:625-632.

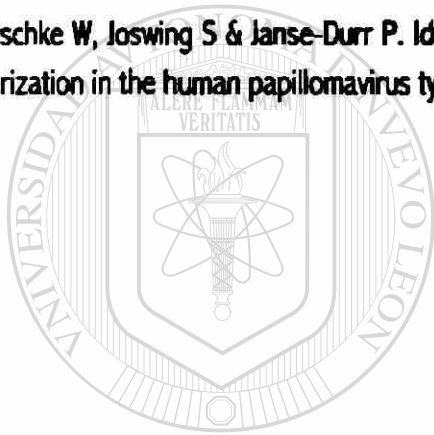
Zhou J, Sun XY & Frazer IH. Glycosylation of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology* 1993;194:210-218.

Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ & Frazer IH. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* 1991;185:251-257.

Zou et al., 14th international Papillomavirus Conference, Quebec, 23-28 July, Abstrac 150.

Zur Hausen H & de Villiers EM. Human papillomavirus. *Annual Review of Microbiology* 1994;48:427-447.

Zwerschke W, Joswing S & Janse-Durr P. Identification of domains required for transcriptional activation and protein dimerization in the human papillomavirus type-16 E7 protein. *Oncogene* 1996;12:213-220.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APENDICE I

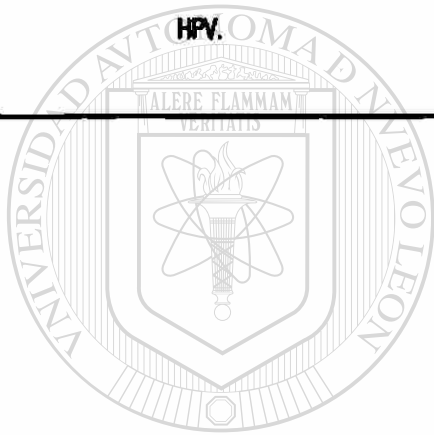
PAPILOMAVIRUS Y PROTEINAS CELULARES

En la siguiente tabla se muestran algunas proteínas celulares y su hipotética interacción o son afectadas por papilomavirus.

NOMBRE	INTERACCION	REFERENCIA
16E1-BP	Proteína que se une a E1	Sverdrup & Myers,
16K ATPasa	Subunidad 16 kDa vacuolar ATPase de unión a E5 de BPV-1 y algunos HPVs	Halpern et al., 1996
AMF1	Proteína celular que interactúa con E2	McBride et al., 1997
AP-1	Regulador transcripcional del LCR de HPV Interacciona con E7	O'Connor et al., 1995
bcl-2	Se incrementa la expresión de esta proteína apoptótica en presencia de HPV	Moscidi & Herman, 1995
b-myb	Gen activado por E7	O'Connor et al., 1995
c-fos	Factor de transcripción sobre-regulado en células transfectadas con E5 HPV 16. Aumentado por E7	Halpern & McCance, 1996
c-jun	Factor de transcripción sobre regulado por E5	Halpern & McCance, 1996
CKII	Proteína kinasa que fosforila las proteínas E7 y E1. Además se ha visto que las proteínas kinasa PKA, PKC, CKI, p34cdc2, son dependientes de DNA.	Münger & Halpern
c-myc	La secuencia de HPV puede ser integrada cerca del locus de myc e interrumpe el gen. E7 impide TGF- β reprimiendo el promotor de c-myc	Münger & Halpern
c-raf	Factor de crecimiento (Ser/Thr kinasa) sobre regulado por E5	Halpern & McBride, 1996
Ciclina A	La ciclina A y E2F forman un complejo al cual se asocia E7 en la fase S. El gen de la ciclina A es activado por E7	Münger & Halpern
DCC	El gen supresor de tumor DCC se ha encontrado deletado o mutado en tumores de ratones desnudos derivados de células transformadas de HPV-18	Klingelutz, 1993
E6AP	Forma un complejo con E6 es blanco para la degradación de p53.	Myers & Androphy, 1995.
E6BP	La posición C-terminal de ERC-55 se une a E6 en ausencia de p53.	Myers & Androphy, 1995
E2F1	Factor transcripcional celular el cual forma un complejo con pRb. La proteína E7 de HPVs de alto riesgo disrumpen este complejo.	Münger & Halpern
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal activado por E5.	Halpern & McCance, 1996
EPOC1	Activador transcripcional de E6 y E7 en virus de alto riesgo.	O'Connor et al., 1995
ErbB2	Expresión incrementada en carcinomas endoteliales positivos a	Halpern & McCance, 1996

	HPV. Forma un complejo in vitro con E5.	
GR	Elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) localizados en el LCR de HPVs.	O'Connor et al., 1995
HUBC9	Enzima conjugado-ubiquitina que interactua con E1.	1
IGFR	Un requerimiento específico para IGF-1R (receptor del factor de crecimiento parecido a insulina) en la transformación mediado por E7.	9
JunB	JunB se une a sitios AP-1 en el LCR de HPV	Thierry et al., 1992
Keratinas	Filamentos de keratina asociados a la proteína E4 de algunas células epiteliales	Doorbar & Myers, 1996
KGF	Factor de crecimiento de keratinocitos reportero a baja regulación de los genes tempranos de HPV	Zheng et al., 1995
MAP Kinasas	Factor de crecimiento sobre regulado por E5	Halpern & McCance, 1996
MAP Kinasa Kinasa	Enzima sobre-regulada por E5	Halpern & McCance, 1996
MCP1	Proteína quimiotractiva de monocitos reprimida en células de carcinoma cervical positivas HPV-18.	Rosl et al., 1994
MDM2	Interacciona con p53.	Marston et al., 1994
NF1	Factor nuclear 1 (factor de transcripción) une al LCR de HPV	O'Connor et al., 1995
OCT1	Regulador transcripcional de LCR de HPV	O'Connor et al., 1995
P12'	Proteína de HTLV que resemble y coopera con E5	Halpern & McCance, 1996
P21cip1	Modulador de crecimiento modulado por p53 arrestado. Unido a E7	Münger & Halpern,
p27kip1	Inhibidor de kinasas dependiente de ciclinas unido a E7	Münger & Halpern,
p34cdc2	Proteína kinasa que es fosforilada por E1. Se ha observado que PKA, PKC, CKI, CKII y DNA dependen de proteína kinasa	1
P53	Proteína supresora de tumor, su transcripción y degradación es afectada por E6.	Myers & Androphy, 1995
p107	Proteína pocket relacionada con Rb unida a E7. P107 regula a b-myc.	Münger & Halpern
p125	Proteína que se une a E5 (proteína de reparación)	Halpern & McCance, 1996
Paxillin	Par de traducción de señales al citoesqueleto, interacciona con E6	McBride et al., 1997
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de platelet forma un complejo in vitro con E5 y con erb-2 y EGF.	Halpern & McCance, 1996
PEPB2	Factor de crecimiento que se une al sitio de unión de E2 en el LCR de BPV4	Jackson & Campo, 1995
polo-primasa	Atrae al origen de replicación a E1, cuya función es helicasa.	1
PP2A	Proteína fosfatasa 2A, se inactiva por la expresión del LCR de HPV.	ter Schegget & van der Noordaa, 1994
pRb	Proteína retinoblastoma, una importante proteína pocket a la cual	Münger & Halpern

	se une E7.		
ras	Señal de traducción que coopera con RbPV1 E5 para transformar células de roedor. C-ras sobre regulada por E5	Halpern & McCance, 1996	
SP1	Enhancer y factor de transcripción, se unen al LCR.	O'Connor et al., 1995	
TBP	Proteína de unión a la caja TATA la cual interactúa con E7 y e2.	Münger & Halpern Myers,	McBride &
TEF	Factor y enhancer transcripcional se une a LCR	O'Connor et al., 1995	
Telomeras	Estimulada por E6	McBride et al., 1997	
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta, un supresor de crecimiento inhibido por HPV.	Münger & Halpern	
TNFα	Factor de necrosis tumoral alpha, represor transcripcional del LCR de HPV en líneas de células tumorogénicas	Kyo et al, 1994	
YY1	Yin y Yang 1, factor de transcripción que interactúa con el LCR de HPV.	O'Connor et al., 1995	

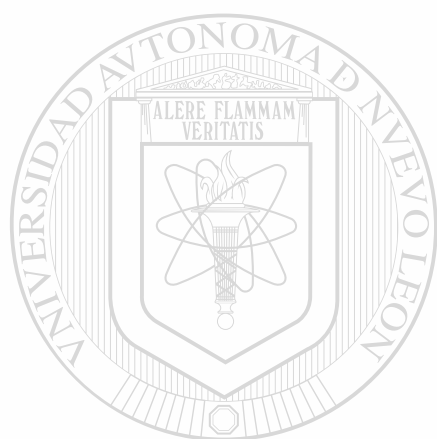


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



